



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Σχεδίαση και παραγωγή καινοτόμων τροφίμων με τη διαδικασία  
μακροενθυλάκωσης και μελέτη των βιοδραστικών συστατικών τους.**

**ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2020**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Σχεδίαση και παραγωγή καινοτόμων τροφίμων με τη διαδικασία μακροενθυλάκωσης και μελέτη των βιοδραστικών συστατικών τους.**

**ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**A.M.: 51701**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Προεστός Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Προεστός Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ**

**Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ**

**Γαρδέλη Χρυσαιγή, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 06/02/2020**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματεύεται τη σχεδίαση καινοτόμων προϊόντων μέσω της μεθόδου της μακροενθυλάκωσης. Η ανάγκη χρήσης της επιστημονικής χημικής γνώσης στη μαγειρική αποτέλεσε το έναυσμα για τη δημιουργία καινοτόμων προϊόντων έχοντας ως βασικά υλικά το μέλι και το σταφυλόμελο.

Για τη δημιουργία των νέων προϊόντων μελιού και σταφυλόμελου χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά πηκτικά μέσα. Με τη χρήση αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου, άγαρ, κόμμεος ξανθάνης, ζελατίνης και κόμμεος χαρουπιού παράχθηκαν μικρής και μεγάλης διάστασης πέρλες έτοιμες προς απλή κατανάλωση αλλά και συνοδεία ποικίλων φαγητών και γλυκών. Επίσης, προστέθηκε ποσότητα αιθέριων ελαίων (γαρίφαλου και μίγματος βοτάνων) στα προϊόντα μελιού με αλγινικό νάτριο, άγαρ, ξανθάνη, ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού, για να μελετηθεί η συμβολή τους στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ιδιότητα των νέων προϊόντων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μέλι και αντίστοιχα το σταφυλόμελο φέρουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Μελετήθηκε λοιπόν, συγκριτικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα των παραχθέντων δειγμάτων μελιού και σταφυλόμελου ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση των πηκτικών μέσων στην πρώτη ύλη. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του συνόλου των δειγμάτων προσδιορίστηκε μέσω των μεθόδων DPPH και Folin-Ciocalteu.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των παραχθέντων προϊόντων, μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων. Μελετήθηκαν τα προϊόντα όσον αφορά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα εμβολιάζοντας σε θρεπτικό υλικό Nutrient ενώ παράλληλα έγινε έλεγχος της μυκητιακής χλωρίδας σε θρεπτικό υλικό γενικής φύσεως Sabouraud agar και σε εκλεκτικό, για αφλατοξινογόνους μύκητες, θρεπτικό υλικό AFPA (*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar). Ακολούθησε μικροσκοπική εξέταση (χρώση-παρατήρηση).

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Χημεία & Τεχνολογία Τροφίμων, Μικροβιολογία Τροφίμων

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Μακροενθυλάκωση, Μέλι, Σταφυλόμελο, Σφαιροποίηση, Αντιοξειδωτική ικανότητα.



## ABSTRACT

This postgraduate thesis deals with the design of innovative products through the macroencapsulation method. The need to use scientific chemical knowledge in cooking has triggered the creation of innovative products, having as basic materials honey and grape molasses.

Five different thickeners were used to create the new honey and grape products. Small and large-dimension pearls were produced by using sodium alginate and calcium chloride, agar, xanthan gum, gelatin and carob gum. The produced pearls are intended for simple consumption or accompanying variety of food and sweets. The addition of a quantity of essential oils (clove and herb mixture) to honey products with sodium alginate, agar, xanthan gum, gelatin and carob gum was also studied in order to determine the antioxidant and antimicrobial status of new products.

According to the literature, honey and grape molasses exhibit strong antioxidant activity. In comparison, the antioxidant capacity of the honey and staphylomelo (grape molasses) in produced samples was studied in order to determine the effect of thickener, in the raw material. The antioxidant capacity of all samples was estimated by DPPH and Folin-Ciocalteu methods.

Finally, tests were carried out to determine the shelf life of the produced products through microbiological analyses. The products were studied with regard to the total mesophilic flora using Nutrient agar while the fungal flora was tested in a substrate of a general nature Sabouraud agar and in a favorable substrate for aflatoxin-nourishing fungi, AFPA material (*Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar). A microscopic examination (staining-observation) was followed.

**SUBJECT AREA:** Food Chemistry, Food Technology, Food Microbiology

**KEYWORDS:** Macroencapsulation, Honey, Grape Molasses, Spherification, Antioxidant ability.





## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή και Επιβλέπων της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Προεστό Χαράλαμπο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρ. Φωτάκη Χαράλαμπο για τη σημαντική βοήθεια, τις πληροφορίες και την πολύτιμη καθοδήγηση του.

Τη Διδάκτορα Κόλλια Ελένη, για τη βοήθεια της στην επιτυχή διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας, την αμέριστη συμπαράσταση και τις συμβουλές της οι οποίες ήταν καθοριστικές σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της.

Την Υποψήφια διδάκτορα Πασβάνκα Κωνσταντίνα για τη βοήθεια, τη στήριξη και τις κατευθύνσεις της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους η οποία απέβη σημαντική για την επιτυχή εκπόνηση της παρούσας εργασίας.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>25</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>27</b>
1.1 Μοριακή Γαστρονομία.....	27
1.2 Ενθυλάκωση.....	29
1.3 Ζελατινοποίηση.....	30
1.3.1 Πηκτώματα σχηματισμένα με πρωτεΐνες .....	31
1.3.2 Σφαιροποίηση .....	31
1.4 Πηκτικά μέσα .....	32
1.4.1 Αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο .....	32
1.4.2 Άγαρ.....	34
1.4.3 Κόμμι ξανθάνης .....	35
1.4.4 Ζελατίνη.....	35
1.4.5 Κόμμι χαρουπιού.....	36
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....</b>	<b>37</b>
2.1 Γενικά.....	37
2.2 Τρόποι δράσεις αντιοξειδωτικών ουσιών .....	39
2.3 Φυτοχημικά συστατικά .....	40
2.3.1 Φλαβονοειδή .....	41
2.3.2 Φαινολικά οξέα .....	42
2.3.3 Τοκοφερόλες .....	42
2.4 Τα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα – Μέθοδοι προσδιορισμού .....	43
2.5 Αντιοξειδωτικά στην ανθρώπινη υγεία .....	43
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ .....</b>	<b>45</b>
3.1 Αλλοίωση τροφίμων και ανάπτυξη μικροβίων.....	45
3.2 Ανάλυση μικροβιακής δράσης στα τρόφιμα .....	46

3.2.1	Βακτήρια και τρόφιμα .....	46
3.2.2	Μύκητες και τρόφιμα.....	47
3.2.3	Ζύμες και τρόφιμα.....	49
3.3	Μυκοτοξίνες .....	50
3.3.1	Αφλατοξίνες.....	51
3.3.2	Ωχρατοξίνη Α.....	53
<b>4.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΛΙ .....</b>	<b>55</b>
4.1	Τι είναι το μέλι; .....	55
4.2	Σύσταση μελιού .....	55
4.3	Είδη μελιού .....	57
4.4	Διατροφική αξία μελιού .....	58
4.5	Αντιβακτηριακή δράση .....	59
4.6	Αντιοξειδωτική δράση .....	60
<b>5.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΛΑΣΕΣ .....</b>	<b>63</b>
5.1	Τι είναι οι μελάσες;.....	63
5.2	Σύσταση μελασών .....	63
5.3	Μελάσες από σταφύλι.....	64
5.3.1	Γλεύκος (Μούστος).....	64
5.3.2	Πετιμέζι.....	64
5.4	Αντιμικροβιακή δράση.....	65
5.5	Αντιοξειδωτική δράση .....	66
<b>6.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ.....</b>	<b>67</b>
6.1	Γενικά.....	67
6.2	Σύσταση αιθέριων ελαίων .....	67
6.3	Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων .....	68
6.4	Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων.....	75
6.5	Αρνητικές δράσεις αιθέριων ελαίων .....	78

<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>79</b>
<b>7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>81</b>
7.1 Παρασκευή προϊόντων .....	81
7.1.1 Προσθήκη αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου .....	81
7.1.2 Προσθήκη άγαρ.....	83
7.1.3 Προσθήκη κόμμεος ξανθάνης.....	84
7.1.4 Προσθήκη ζελατίνης .....	84
7.1.5 Προσθήκη κόμμεος χαρουπιού .....	85
7.1.6 Προσθήκη και παραγωγή αιθέριων ελαίων.....	85
7.1.7 Τελικά προϊόντα.....	87
7.2 Αναλυτικό μέρος .....	90
7.2.1 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu.....	90
7.2.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια .....	91
7.2.1.2 Όργανα και Εξοπλισμός .....	91
7.2.1.3 Παρασκευή Διαλυμάτων .....	92
7.2.1.4 . Πειραματική Πορεία.....	92
7.2.1.5 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	93
7.2.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της σταθερής ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο (DPPH). .....	94
7.2.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια .....	95
7.2.2.2 Όργανα και εξοπλισμός .....	95
7.2.2.3 Παρασκευή Διαλυμάτων .....	95
7.2.2.4 Πειραματική Πορεία .....	96
7.2.2.5 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	97
7.3 Μικροβιολογικό μέρος.....	98
7.3.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών.....	98
7.3.1.1 Σύσταση θρεπτικών υλικών .....	98
7.3.1.2. Υλικά – Εξοπλισμός.....	99
7.3.1.3. Πορεία παρασκευής θρεπτικών υλικών .....	100
7.3.2. Μικροβιολογικός έλεγχος των προϊόντων .....	101

7.3.2.1. Έλεγχος Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ) <sup>16,4</sup> .....	102
7.3.2.2 Έλεγχος παρουσίας ζυμών και μυκήτων (Sabouraud).....	103
7.3.2.3. Έλεγχος παρουσίας αφλατοξινογόνων μυκήτων <sup>16</sup> .....	103
<b>8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>105</b>
8.1 Αντιοξειδωτικά .....	105
8.1.1 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin—Ciocalteu των δειγμάτων μελιού και σταφυλόμελου ....	106
8.1.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH• από τα παραχθέντα προϊόντα μελιού και σταφυλόμελου .....	109
8.1.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης των παραχθέντων προϊόντων .....	113
8.2 Μικροβιολογικά .....	114
8.2.1 Αποτελέσματα της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των δειγμάτων	114
8.2.2 Αποτελέσματα ανάπτυξης ζυμών και μυκήτων.....	116
8.2.3 Αποτελέσματα ελέγχου παρουσίας αφλατοξινογόνων μυκήτων..	118
8.2.4 Αποτελέσματα χρώσης – Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	119
8.2.5 Συζήτηση αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων.....	123
<b>9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ:ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>125</b>
9.1 Αντιοξειδωτική δράση .....	125
9.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά.....	126
<b>ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....</b>	<b>127</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>129</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>131</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<i>Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας Folin-Ciocalteu .....</i>	<i>93</i>
<i>Διάγραμμα 2: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Ασκορβικού οξέος.....</i>	<i>97</i>
<i>Διάγραμμα 3: Γράφημα σύγκρισης της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε μέλι και σταφυλόμελο .....</i>	<i>107</i>
<i>Διάγραμμα 4: Γράφημα σύγκρισης της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε μέλι με πηκτικά μέσα και σε μέλι με πηκτικά μέσα και αιθέρια έλαια γαριφάλου και μίγματος βοτάνων.....</i>	<i>108</i>
<i>Διάγραμμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας των αντιοξειδωτικών μεταξύ των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα .....</i>	<i>110</i>
<i>Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας των αντιοξειδωτικών μεταξύ των προϊόντων μελοστάφυλου με πηκτικά μέσα .....</i>	<i>111</i>
<i>Διάγραμμα 7: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας αντιοξειδωτικών των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα έναντι προϊόντων σταφυλόμελου με πηκτικά μέσα .....</i>	<i>111</i>
<i>Διάγραμμα 8: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας αντιοξειδωτικών των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα και προσθήκης αιθέριων ελαίων .....</i>	<i>112</i>





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1: Αντιπροσωπευτικά πιάτα που αναπτύχθηκαν με χρήση της επιστήμης και της τεχνολογίας τροφίμων. ....</i>	<i>28</i>
<i>Εικόνα 2: Διαδικασία σφαιροποίησης με την ανάμειξη διαλύματος αλγινικού νατρίου σε πουρέ φρούτων φραγκοστάφυλου και προθήκης σταγόνων αυτού σε λουτρό ασβεστίου .....</i>	<i>33</i>
<i>Εικόνα 3: Μόριο άγαρ .....</i>	<i>34</i>
<i>Εικόνα 4: Χημικές Δομές συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών.....</i>	<i>39</i>
<i>Εικόνα 5: Γενική δομή φλαβονοειδών και υποκατηγορίες .....</i>	<i>42</i>
<i>Εικόνα 6: Δομή και ανάπτυξη μούχλας, Αριστερά αναπαρίσταται μικρογραφία τυπικής μούχλας. Τα κονίδια διακρίνονται ως σφαιρικές δομές σταάκρα των εναέριων υφών. Δεξιά αναπαρίσταται η ο κύκλος ζωής της μούχλας.....</i>	<i>47</i>
<i>Εικόνα 7: Εκβλαστήματα στην επιφάνεια των κυττάρων Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>49</i>
<i>Εικόνα 8: Οι κυριότερες αφλατοξίνες.....</i>	<i>52</i>
<i>Εικόνα 9: Δομή Ωχρατοξίνης.....</i>	<i>53</i>
<i>Εικόνα 10: Διάταξη συσκευής υδροαπόσταξης .....</i>	<i>69</i>
<i>Εικόνα 11: Διάταξη συσκευής απόσταξης μεθ'υδρατμών .....</i>	<i>71</i>
<i>Εικόνα 12: Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη.....</i>	<i>72</i>
<i>Εικόνα 13: Συσκευή Soxhlet.....</i>	<i>73</i>
<i>Εικόνα 14: Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας .....</i>	<i>74</i>
<i>Εικόνα 15: Μηχανισμοί δράσης των αιθέριων ελαίων και πιθανές περιοχές του βακτηριακού κυττάρου που μπορούν να φθείρουν. ....</i>	<i>76</i>
<i>Εικόνα 16: Ζυγός ακριβείας εύρους ζύγισης 0,01-500g και πολυπιπέτα .....</i>	<i>81</i>
<i>Εικόνα 17: Πέρλες σταφυλόμελου και πέρλες μελιού .....</i>	<i>83</i>
<i>Εικόνα 18: Παρασκευή προϊόντων στο εργαστήριο .....</i>	<i>85</i>
<i>Εικόνα 19: Μορφή παραχθέντων προϊόντων μελιού .....</i>	<i>89</i>
<i>Εικόνα 20: Δείγματα μελιού με τα πηκτικά μέσα στη σειρά: αλγινικό νάτριο, άγαρ, κόμμι ξανθάνης, ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού .....</i>	<i>89</i>

Εικόνα 21: Δείγματα έτοιμα σε κυψελίδες για μέτρησης τους σε φασματοφωτόμετρο.....	93
Εικόνα 22: Η ρίζα DPPH και η σταθερή της μορφή.....	94
Εικόνα 23: Υπό μελέτη δείγματα και παρασκευή προτύπων .....	96
Εικόνα 24: Δείγματα έτοιμα για φασματοφωτομέτρηση.....	97
Εικόνα 25: Τα παραχθέντα τρυβλία με τα θρεπτικά υλικά.....	101
Εικόνα 26: Δείγματα 1 <sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ, 2 <sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, 3 <sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και 4 <sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με άγαρ. Αποτελέσματα 1 <sup>η</sup> ημέρας μελέτης μετά την παραγωγή του προϊόντος (απουσία μικροβιακής ανάπτυξης) .....	115
Εικόνα 27: Αριστερά απεικονίζονται 1 <sup>η</sup> στήλη μέλι με αγγλικό νάτριο, 2 <sup>η</sup> στήλη μέλι με αγγλικό νάτριο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, 3 <sup>η</sup> στήλη μέλι με αγγλικό νάτριο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων την 6 <sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους. Δεξιά απεικονίζονται ίδιες στήλες με προσθήκη της 4 <sup>ης</sup> που αφορά σταφυλόμελο με αγγλικό νάτριο, τα αποτελέσματα αφορούν μελέτη 12 <sup>η</sup> ημέρας από την παραγωγή τους. ....	117
Εικόνα 28: Και στις δύο εικόνες η 1 <sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο, η 2 <sup>η</sup> στήλη μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, η 3 <sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και η 4 <sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με πηκτικό μέσο. Αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα για το κόμμα ξανθάνης 6 <sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους ενώ δεξιά απεικονίζονται δείγματα με κόμμα χαρουπιού 1 <sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους. ....	117
Εικόνα 29: Και στις δύο εικόνες η 1 <sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο, η 2 <sup>η</sup> στήλη μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, η 3 <sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και η 4 <sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με πηκτικό μέσο. Αριστερά το πηκτικό μέσο είναι η ζελατίνη κατά την 6 <sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή και δεξιά το πηκτικό μέσο είναι άγαρ κατά τη 12 <sup>η</sup> ημέρα.....	119
Εικόνα 30: Ζυμομύκητες που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο.....	121
Εικόνα 31: Μύκητας <i>Penicillium</i> ο οποίος παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ..	121
Εικόνα 32: Μύκητας <i>Aspergillus</i> που απομονώθηκε από τα δείγματα.....	122

Εικόνα 33: Μύκητας <i>Penicillium</i> παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο .....	122
--	-----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σημαντικά αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές .....	44
Πίνακας 2: Σύσταση μελιού % .....	56
Πίνακας 3: Παράγοντες που συνεισφέρουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού.....	60
Πίνακας 4: Τελικά προϊόντα, υφή και οι προτεινόμενες χρήσεις τους .....	87
Πίνακας 5: Συστατικά θρεπτικού υλικού <i>Nutrient Agar</i> .....	99
Πίνακας 6: Συστατικά θρεπτικού υλικού <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> .....	99
Πίνακας 7: Σύσταση θρεπτικού υλικού <i>AFPA (Aspergillus Flavus Parasiticus Agar)</i> .....	99
Πίνακας 8: Συγκέντρωση του φαινολικού περιεχομένου των προϊόντων εκφρασμένη σε $\mu\text{g GAE/g}$ τροφίμου. ....	106
Πίνακας 9: Συγκέντρωση του φαινολικού περιεχομένου των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα και προσθήκη αιθέριων ελαίων εκφρασμένη σε $\mu\text{g GAE/g}$ τροφίμου. ....	108
Πίνακας 10: Συγκέντρωση περιεχομένου αντιοξειδωτικών των παραχθέντων προϊόντων εκφρασμένη σε $\mu\text{g AAE/g}$ τροφίμου. ....	109
Πίνακας 11: Συγκέντρωση περιεχομένου αντιοξειδωτικών προϊόντων μελιού με την προσθήκη αιθέριων ελαίων εκφρασμένη σε $\mu\text{g AAE/g}$ τροφίμου.....	112
Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάπτυξης <i>OMX</i> στα προϊόντα μελιού και μελοστάφυλου εκφρασμένα σε $\text{cfu/g}$ προϊόντος .....	114
Πίνακας 13: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων ή ζυμών των δειγμάτων .....	116
Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων ή ζυμών των δειγμάτων .....	118
Πίνακας 15: Μικροοργανισμοί που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο .....	120



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών σπουδών στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στον τμήμα Χημείας με κατεύθυνση τη Χημεία Τροφίμων. Το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου και κάποιο μέρος της παραγωγής των νέων προϊόντων καθώς και η παραγωγή των αιθέριων ελαίων έλαβε χώρα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής ήταν η δημιουργία καινοτόμων προϊόντων έχοντας ως βασικό συστατικό το μέλι και το σταφυλόμελο. Με τη χρήση πηκτικών μέσων δημιουργήθηκαν πέρλες μελιού μικρής και μεγάλης διάστασης αποτελώντας μία νέα κατηγορία προϊόντων της ελληνικής γαστρονομίας. Τα δείγματα που παρήχθησαν αναλύθηκαν όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ιδιότητα κατόπιν της προσθήκης των πηκτικών μέσων καθώς και των αιθέριων ελαίων γαρίφαλου και ενός μίγματος βοτάνων. Επίσης, κατόπιν μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε μελέτη της διάρκειας ζωής τους.

Για την μελέτη του αντιοξειδωτικού δυναμικού εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι η Folin-Ciocalteu για την μέτρηση ολικών φαινολικών και η μέτρηση της ελεύθερης ρίζας DPPH. Επίσης, για τις μικροβιολογικές αναλύσεις εμβολιάστηκαν τα δείγματα σε θρεπτικά υλικά κατάλληλα για τη μέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των μυκήτων καθώς και ειδικότερα την ύπαρξη μυκήτων που είναι ικανοί να παράγουν αφλατοξίνες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η προσθήκη μικρής ποσότητας αιθέριων ελαίων στο μέλι με τα πηκτικά μέσα βοηθάει πολύ στη διατηρησιμότητα των προϊόντων καθώς και προσδίδει στην αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών.

Φιλοδοξία της παρούσας εργασίας είναι εκτός από την ανάδειξη της αντιοξειδωτικής ιδιότητας των προϊόντων και της αντιμικροβιακής ιδιότητας των αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν, η δημιουργία καινοτόμων προϊόντων που έχουν βάση τους φυσικά υλικά υψίστης θρεπτικής σημασίας όπως το μέλι και το σταφυλόμελο αξιοποιώντας την επιστήμη της σφαιροποίησης.



## **Κάτι από την αρχαιότητα:**

Δημόκριτος ρωτήθηκε τι πρέπει να κάνουμε για να ζήσουμε υγιείς είπε: «*Ει τα έξωθεν ελαίω του σώματος, τα δε ένδοθεν μέλιτι χρίσονται*» - Να αλείφουμε το εξωτερικό μας δέρμα με λάδι και το εσωτερικό μας με μέλι.



***Η μοριακή γαστρονομία είναι ο όρος που μετατρέπει την μαγειρική, σε επιστήμη!***







## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



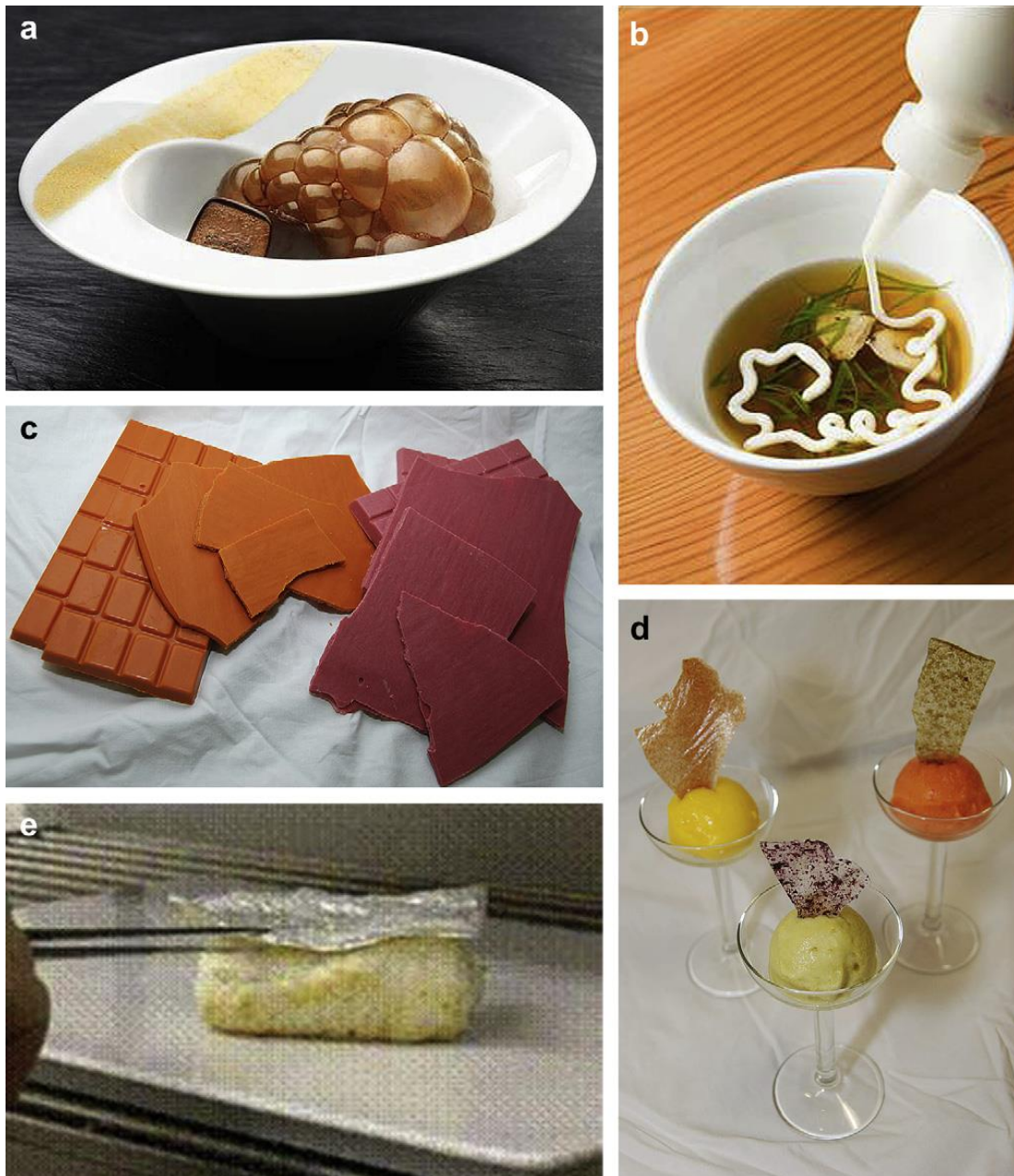
# 1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Μοριακή Γαστρονομία

Η μοριακή γαστρονομία<sup>7</sup> δεν αποτελεί είδος μαγειρικής, Ο όρος αναφέρεται στην επιστήμη που μελετά τις φυσικές και χημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος.

Η προέλευση της μοριακής γαστρονομίας όπως την ξέρουμε σήμερα προέρχεται περίπου από το 1988 από το φυσικό Nicholas Kurti. Η ανάγκη λοιπόν του ανθρώπου να εξελίσσεται και να δημιουργεί με τα υλικά του τόπου του καινούριες γεύσεις ή καινούριες τεχνικές μεταποίησης οικείων και παραδοσιακών προϊόντων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση των γνώσεων της χημείας. Έτσι δημιουργήθηκε η μοριακή γαστρονομία η οποία βασίζεται στις γνώσεις και την εφαρμογή αυτών αντίστοιχα. Ο μάγειρας, ο τεχνολόγος ή ο επιστήμονας τροφίμων θα πρέπει να κατανοήσει τις φυσικές και χημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την παρασκευή τροφίμων ώστε να επιτύχει το ίδιο ή βελτιωμένο τελικό αποτέλεσμα.

Ορισμένα συστατικά τροφίμων αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων έχουν βρει σιγά αλλά σταθερά το δρόμο τους προς την haute cuisine, λόγω των ειδικών λειτουργικών ιδιοτήτων τους, όπως για παράδειγμα, ένα ευρύ φάσμα πηκτικών ή πηκτωματογόνων παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην κουζίνα για την ανάπτυξη ειδικών υφών, ανεξάρτητα από κάποιες παραμέτρους όπως θερμοκρασία, pH και άλας. Επιπλέον, πολλά σάκχαρα ειδικού τύπου χρησιμοποιούνται σε καινοτόμα πιάτα. Για παράδειγμα, ένας υδατάνθρακας χαμηλών θερμίδων, η ισομαλιτόλη, χρησιμοποιείται συχνά, με γλυκόζη, για να σχηματίσουν υαλώδη κελύφη, νιφάδες και άλλες δομές σε πιάτα των οποίων η υγρασία είναι επίσης υψηλή για να επιτρέψει τη χρήση της άμορφης σακχαρόζης.



**Εικόνα 1: Αντιπροσωπευτικά πιάτα που αναπτύχθηκαν με χρήση της επιστήμης και της τεχνολογίας τροφίμων.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>a) Λαχταριστό κέικ σοκολάτας, γαρνιρισμένο με παγωμένη κρέμα γάλακτος, ίχνη χρυσού και καπνιστές φυσαλίδες κακάου (Mugaritz, Ισπανία από τον Jose Luis Lo'pez Zubiria)., b) Στιγμαία noodles από σουσάμι (WD50, ΗΠΑ e εικόνα του Takahiko Marumoto), c) Γλυκό ή μη γλυκό "σοκολάτα" με σκόνη ντομάτας και βατόμουρου που αντικαθιστά το κακάο, οι σκόνες που αντικαθιστούν την σκόνη κακάου αποκτήθηκαν με ξήρανση με ψύξη ξηρού πολλού φρούτων, d) Σορμπέ γλυκών πιπεριών σε τρία χρώματα διακοσμημένα με υαλώδη μαλτοδεξτρίνη. Τα "παράθυρα" στην άμορφη, υαλώδη κατάσταση παρασκευάστηκαν με χύτευση με διαλύτη και ξήρανση υπό μειωμένη πίεση από 65% κατά βάρος μαλτοδεξτρίνης DE21 διαλύματα στα οποία προστέθηκαν λυοφιλοποιημένες νιφάδες διαφόρων μπαχαρικών (εικόνα από τον D. Curti). e) Ψητό φιλέτο ψαριού "Με το δέρμα" (Mugaritz, Ισπανία από τον Jose Luis Lo'pez Zubiria). Τα δέρματα γάδου θερμάνθηκαν στους 80 ° C για 2 ώρες για να εκχυλιστεί η ζελατίνη. Ο ζωμός χρησιμοποιήθηκε για να αντικαταστήσει το βούτυρο και δημιουργήθηκε μεμβράνη. Η μεμβράνη ήταν το δέρμα του ψαριού. Καθώς η μεμβράνη θερμαίνεται, αποκτά το σχήμα του ψαριού που τοποθετείται.<sup>1</sup>

## 1.2 Ενθυλάκωση

Η ενθυλάκωση είναι μια διαδικασία “παγίδευσης” δραστικών παραγόντων μέσα σε ένα υλικό φορέα και είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη βελτίωση της παροχής βιοενεργών μορίων και ζωντανών κυττάρων σε τρόφιμα. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό του προστατευτικού κελύφους των εγκλεισμάτων πρέπει να είναι κατάλληλα για τρόφιμα, βιοδιασπώμενα και ικανά να σχηματίσουν ένα εμπόδιο μεταξύ της εσωτερικής φάσης και του περιβάλλοντος χώρου. Μεταξύ όλων των υλικών, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για την ενθυλάκωση σε εφαρμογές τροφίμων είναι οι πολυσακχαρίτες. Οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια είναι επίσης κατάλληλες για ενθυλάκωση. Μεταξύ αυτών των τεχνικών, η ρευστοποιημένη κλίνη (fluidized bed) ή εναιώρηση με πεπιεσμένο αέρα (air suspension), οι μέθοδοι συσσωμάτωσης (coacervation) και διαχωρισμού φάσης (phase separation), η ξήρανση με ψεκασμό (spray-drying), η πήξη με ψεκασμό (spray-congealing) και η εξάτμιση διαλύτη (solvent evaporation) αποτελούν τις πιο ευρέως χρησιμοποιημένες. Η ξήρανση με ψεκασμό, είναι η πιο εκτεταμένη τεχνική ενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων επειδή είναι ευέλικτη, συνεχής αλλά και οικονομική διαδικασία. Τα περισσότερα από τα ενθυλακωμένα προϊόντα έχουν υποστεί ξήρανση με ψεκασμό, τα υπόλοιπα παρασκευάζονται με ψύξη με ψεκασμό, ξήρανση με κατάψυξη, εξώθηση τήγματος και έγχυση τήγματος. Η μοριακή ένταξη στις κυκλοδεξτρίνες και τα λιποσωμικά κυστίδια είναι πιο δαπανηρές τεχνολογίες και επομένως δε χρησιμοποιούνται συχνά.

Αυτή η νέα τεχνολογία, μπορεί να προσφέρει εμπόδια μεταξύ των ευαίσθητων βιοδραστικών υλικών και του περιβάλλοντος και έτσι να επιτρέψει τη διαφοροποίηση της γεύσης και του αρώματος, να καλύψει την κακή γεύση ή τη μυρωδιά, να σταθεροποιήσει τα συστατικά των τροφίμων ή να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για την ενθυλάκωση των δραστικών συστατικών είναι η παροχή βελτιωμένης σταθερότητας στα τελικά προϊόντα και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Ένα άλλο πλεονέκτημα της ενθυλάκωσης είναι η μικρότερη εξάτμιση και επομένως όπως η μείωση υποβάθμισης των πτητικών δραστικών ουσιών, όπως το άρωμα. Επιπλέον, η ενθυλάκωση χρησιμοποιείται για να καλύψει τα δυσάρεστα συναισθήματα κατά τη διάρκεια του φαγητού, όπως πικρή γεύση και στυπτικότητα των πολυφαινολών.

Επίσης, ένας άλλος στόχος της χρήσης εγκλεισμού σε κάψουλα είναι η παρεμπόδιση της αντίδρασης με άλλα συστατικά σε τρόφιμα όπως το οξυγόνο ή το νερό. Εκτός από τα παραπάνω, η ενθυλάκωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ακινητοποίηση κυττάρων ή ενζύμων σε εφαρμογές επεξεργασίας τροφίμων, όπως διεργασίες ζύμωσης και διεργασίες παραγωγής μεταβολίτη.<sup>63</sup>

Η συσσωμάτωση ήταν η πρώτη τεχνική μικροενθυλάκωσης που αναπτύχθηκε το 1950. Η απλή συμπύκνωση εμπλέκει μόνο έναν τύπο πολυμερούς, ενώ για την σύνθετη συσσωμάτωση είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δύο ή και περισσότεροι τύποι πολυμερών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συσσωματώματα είναι ενώσεις πρωτεΐνης / πολυσακχαρίτη, αλλά και οι ενώσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ήταν επίσης υπό έλεγχο. Η ζελατίνη και το αραβικό κόμμα είναι το πιο συνηθισμένο και εκτενώς χρησιμοποιούμενο ζεύγος σύνθετης συσσωμάτωσης.<sup>12</sup>

Η σταθερότητα των βιοδραστικών ενώσεων (που συνήθως εξάγονται από τις φυσικές πηγές) αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την επιτυχή ενσωμάτωσή τους σε διάφορα συστήματα τροφίμων. Δηλαδή, οι βιοδραστικές ενώσεις που προάγουν την υγεία, όπως οι βιταμίνες, τα προβιοτικά, τα μέταλλα, οι πολυφαινόλες, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και οι φυτοστερόλες είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο, το φως, τη θερμότητα και το νερό. Αυτοί οι παράγοντες περιορίζουν τη διάρκεια ζωής και τη βιοδιαθεσιμότητα στα τρόφιμα.<sup>12</sup> Γι' αυτό δημιουργήθηκε η τεχνική της μικροενθυλάκωσης, η οποία για παράδειγμα επιτρέπει το αντιοξειδωτικό να δράσει σε μαργαρίνες και ανάλογα προϊόντα με το ελεύθερο ασκορβικό οξύ και όχι με τη λιποδιαλυτή μορφή του εστέρα. Αυτή η τεχνική ευνοεί το φαινόμενο της συνεργίας και ελέγχει τη χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών.<sup>17</sup>

### **1.3 Ζελατινοποίηση**

Η ζελατινοποίηση<sup>64</sup> είναι ένα κοινό φαινόμενο στο μαγείρεμα. Ο σχηματισμός γέλης κατά το μαγείρεμα απαιτεί ένα υγρό στοιχείο και ένα πολυμερές όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες σε ένα ασπράδι ή η ζελατίνη που προσθέτουμε στο νερό για να φτιάξουμε marshmallows ή άλλα επιδόρπια. Όταν αυτά τα στοιχεία συναντιούνται με τον σωστό τρόπο, δημιουργείται αντίδραση τέτοια όπου το αρχικό υγρό προϊόν μετατρέπεται σε κάτι το οποίο δεν είναι υγρό

λόγω της αντίδρασης με τα πολυμερή, μπορεί δηλαδή να φαίνεται "στερεό" και να μην είναι όπως ο πάγος.

Υπάρχουν δύο τύποι διεργασιών ζελατινοποίησης: πηκτώματα σχηματισμένα με πρωτεΐνες, όπως στα παραπάνω παραδείγματα, και πηκτές που σχηματίζονται με πολυμερή υδατάνθρακα, όπως χρησιμοποιούνται σε μαρμελάδες και ζελέδες, χορτοφαγικές κουζίνες ή σε μοντέρνες τεχνικές όπως σφαιροποίηση. Τα πολυμερή συστήματα στο νερό ονομάζονται υδροκολλοειδή, και οι μάγειροι σε όλο τον κόσμο τα χρησιμοποιούν εδώ και πολλά χρόνια για να δημιουργήσουν μια ποικιλία από διαφορετικά είδη τροφίμων.

### **1.3.1 Πηκτώματα σχηματισμένα με πρωτεΐνες**

Για την ανάπτυξη πρωτεϊνών, εφαρμόζουμε την ίδια λογική που έχουμε για τις μεταβάσεις φάσεων: όταν η θερμοκρασία ενός συστήματος αυξάνεται, η μέση κίνηση των μορίων αυξάνεται. Καθώς μια τακτοποιημένη, διπλωμένη πρωτεΐνη αρχίζει να διασπάται πιο γρήγορα σε υψηλότερες θερμοκρασίες, θα εξαπλωθεί, όπως και ο συμπαγής πάγος μπορεί να διαλυθεί στο νερό. Όταν πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται στο ίδιο μέρος, νέες, ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μπορεί να σχηματιστούν μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών για να δημιουργηθούν πολύ πιο ισχυρές διασταυρώσεις. Αυτό είναι που οδηγεί στη στερεοποίηση των τροφίμων όπως τα ασπράδια αυγών κατά το μαγείρεμα, τα οποία απλά μειώνοντας τη θερμοκρασία.

### **1.3.2 Σφαιροποίηση**

Η ιδέα της εκμετάλλευσης τεχνικών που προσομοιάζουν της σφαιροποίησης για την παραγωγή τροφίμων κατέκτησε το πρώτο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας στη Βρετανία το 1942 από τον William Peschardt, επιστήμονα τροφίμων που εργάζεται στην εταιρεία Unilever. Τα ιόντα που χρησιμοποιούν την τεχνική για να ενεργοποιήσουν μία τεχνική πηκτωματοποίησης έχουν βρει αρκετές χρήσεις στη βιομηχανία τροφίμων.

Όταν το θετικά φορτισμένο ασβέστιο αλληλοεπιδρά με το αρνητικά φορτισμένο αλγινικό, μπορεί να συμβεί ζελατινοποίηση. Όταν μία μπάλα αλγινικού διαλύματος τοποθετηθεί σε ένα διάλυμα ασβεστίου - ή μια μπάλα του διαλύματος ασβεστίου σε αλγινικό διάλυμα - το αλγινικό και το ασβέστιο θα

αλληλεπιδρούν στο όριο μεταξύ των δύο υγρών και θα αρχίσουν να σχηματίζουν μια στιβάδα στερεού πηκτώματος.

Οι σφαίρες που παράγονται περιέχουν υγρό στοιχείο στο εσωτερικό τους και σκληρό περίβλημα το οποίο επηρεάζεται από το χρόνο. Ο λόγος για τον οποίο μια "σφαίρα" αλγινικού άλατος δεν στερεοποιείται αμέσως σε ένα λουτρό ασβεστίου είναι επειδή χρειάζεται χρόνος για τα μόρια να κινούνται μέσα από ένα περιβάλλον χωρίς να αναμιγνύονται ενεργά. Μπορούμε πραγματικά να ορίσουμε τον χρόνο που χρειάζεται για να μετακινηθούν τα μόρια μέσω ενός συστήματος και να χρησιμοποιήσουμε αυτό για να προβλέψουμε πόσο μακριά θα κυκλοφορούν ορισμένα μόρια.

## 1.4 Πηκτικά μέσα

### 1.4.1 Αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο

Ο όρος «αλγινικό» (ή αλγινικό) αναφέρεται σε μια ομάδα φυσικών πολυσακχαριτών που εξάγονται από τα καφέ χρώματος φύκια (*Phaeophyceae*), μια ποικιλία φυκιών που αναπτύσσονται στα ρηχά νερά των εύκρατων ζωνών του κόσμου. Τα αλγινικά πρέπει να διακριθούν από τα άλλα εκχυλίσματα φυκιών άγαρ και καραγενάνη, τα οποία λαμβάνονται από κόκκινα φύκια. Τόσο η χημική σύνθεση όσο και οι ιδιότητες των αλγινικών διαφέρουν σημαντικά από εκείνες του άγαρ και της καραγενάνης. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη καφέ φυκιών που περιέχουν αλγινικά άλατα είναι οι *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* και *Ascophyllum nodosum*.<sup>65</sup>

Από τεχνική άποψη, είναι ένας τύπος υδατανθράκων γνωστός στους χημικούς ως πολυσακχαρίτης. Αυτό το μόριο ονομάζεται επίσης υδροκολλοειδές ή κόμμι, επειδή έχει την ικανότητα να πυκνώνει ή να πηκτωματίζει το νερό. Αλλά σε αντίθεση με άλλα υδροκολλοειδή, όπως ζελατίνη ή άμυλο, το αλγινικό άλας θα πυκνώσει ή θα πηκτωθεί σε υγρό με βάση το νερό μόνο παρουσία ιόντων όπως το ασβέστιο. Το αλγινικό νάτριο είναι άλας νατρίου του αλγινικού.

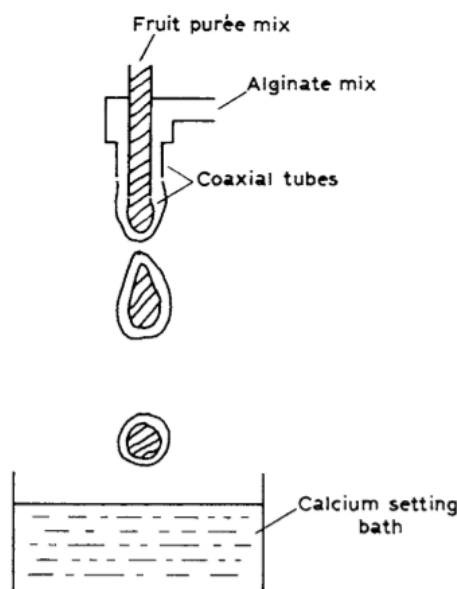
Πριν το αλγινικό προλάβει να πυκνώσει ή να πηκτωρίσει ένα υγρό, πρέπει να διασκορπιστεί ομοιόμορφα στο υγρό (χωρίς σβώλους) και να ενυδατωθεί (έτσι ώστε κάθε μόριο να περιβάλλεται από νερό).

Η διασπορά του αλγινικού άλατος σε καυτό υγρό τείνει να το κάνει να ενυδατωθεί και να πηκτωθεί πριν διασπαρθεί η σκόνη. Προσπαθούμε να



αποφύγουμε τη δημιουργία σβώλων καθώς προκαλούν ασυνεπή αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, είναι πάντα καλύτερο να αναμιγνύεται το αλγινικό σε ένα πολύ κρύο υγρό ή πρώτα να αναμιχθεί με ένα ξηρό συστατικό όπως η ζάχαρη.

Υπάρχουν πολλά άλατα άλλα τα ακατάλληλα άλατα που χρησιμοποιούνται για τη σφαιροποίηση είναι του ασβεστίου. Ένα άλας είναι ένα κρυσταλλικό στερεό που όταν διαλύεται, διαχωρίζεται σε θετικά και αρνητικά ιόντα. Πρέπει να σημειωθεί ότι ανά γραμμάριο διαφορετικά άλατα ασβεστίου περιέχουν διαφορετικές ποσότητες ασβεστίου. Αυτό σημαίνει ότι για να καταλήξουμε με την ίδια συγκέντρωση ασβεστίου στο διάλυμα, πρέπει να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικές ποσότητες αλάτων ασβεστίου.

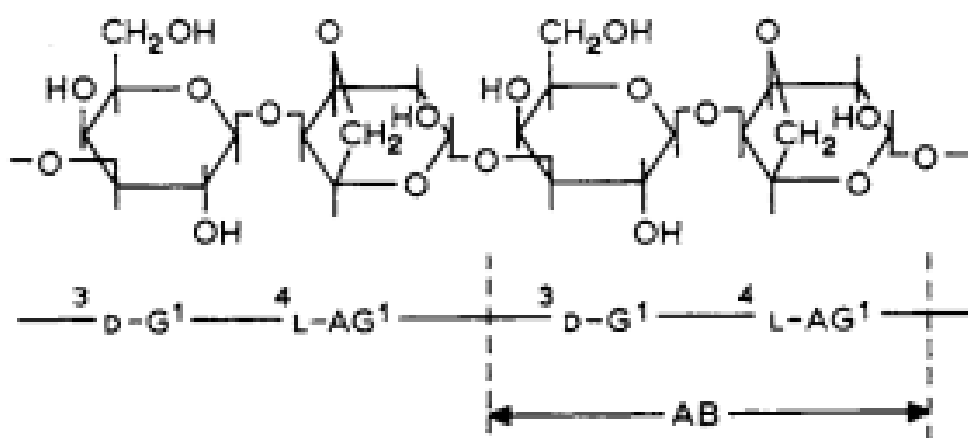


**Εικόνα 2: Διαδικασία σφαιροποίησης με την ανάμιξη διαλύματος αλγινικού νατρίου σε πουρέ φρούτων φραγκοστάφυλου και προθήκης σταγόνων αυτού σε λουτρό ασβεστίου**

Τα αλγινικά άλατα είναι σταθερά σε χαμηλά pH, είναι ισχυρά μέσα αύξησης του ιξώδους, σταθεροποίησης και ζελατινοποίησης. Σε επίπεδο 0,25-0,5% βελτιώνουν και σταθεροποιούν τη συνοχή της γέμισης στα αρτοσκευάσματα φούρνου (κέικ, πίτες), στα dressings και στις σοκολάτες γάλακτος και αποτρέπουν το σχηματισμό μεγαλύτερων κρυστάλλων πάγου στα παγωτά κατά την αποθήκευση.<sup>28</sup>

### 1.4.2 Άγαρ

Το άγαρ είναι ένα υδροκολλοειδές φυκιού που σχηματίζει ισχυρά γέλη και αποτελείται από πολυσακχαρίτες. Η κύρια δομή του άγαρ χαρακτηρίζεται χημικά από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γαλακτόζης και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης, 1-5 με μερικές παραλλαγές, καθώς επίσης και από χαμηλή περιεκτικότητα σε θειικό εστέρα.<sup>13</sup> Απομονώνεται από φύκη (της τάξεως ροδοφυκών, *Rhodophyceae*), π.χ. *Gelidium* spp., *Pterocladia* spp. και *Gracilaria* spp., με διαδικασία εκχύλισης με ζεστό νερό. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με κατάψυξη της πηκτής.<sup>28</sup>



Εικόνα 3: Μόριο άγαρ

Το άγαρ δεν είναι διαλυτό σε κρύο νερό αλλά είναι διαλυτό σε βραστό νερό. Η απλή θέρμανση του νερού, εάν διατηρείται σε θερμοκρασία κάτω από το σημείο βρασμού, δεν πραγματοποιεί σωστή διάλυση της σκόνης στο νερό. Πριν από το στάδιο του βρασμού χρειάζεται η ενυδάτωση της σκόνης άγαρ (μπορεί να βρίσκεται και σε μορφή κόκκων ή ράβδων) για τουλάχιστον 5-10 λεπτά.

Το άγαρ έχει την ικανότητα να σχηματίζει πηκτές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η αγαρόζη είναι το συστατικό που είναι υπεύθυνο για την πήξη. Σε αυξημένες θερμοκρασίες η αγαρόζη υπάρχει ως μία «ανοιχτή έλικα», αλλά κατά την ψύξη σχηματίζει ισχυρές πηκτές σε χαμηλή συγκέντρωση πολυμερούς.<sup>13</sup>

Το άγαρ χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή θρεπτικών υλικών στη μικροβιολογία. Η εφαρμογή του στη Βιομηχανία Τροφίμων βασίζεται στις κύριες ιδιότητές του: είναι ουσιαστικά άπεπτο, σχηματίζει ανθεκτικές στη

θερμοκρασία πηκτές και έχει γαλακτωματοποιητική και σταθεροποιητική ικανότητα. Το άγαρ προστίθεται σε γρανίτες και παγωτά.<sup>28</sup>

### 1.4.3 Κόμμι ξανθάνης

Το κόμμι ξανθάνης, ο εξωκυτταρικός βακτηριακός πολυσακχαρίτης από το *Xanthomonas campestris*, απομονώθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος εντατικής διαλογής στο USDA Northern Regional Research Laboratory της Ρεορία και αρχικά ήταν γνωστός ως πολυσακχαρίτης B1459. Επί του παρόντος, παράγεται με αερόβια ζύμωση μεγάλης κλίμακας και διατίθεται στο εμπόριο τόσο σε τρόφιμα όσο και σε βιομηχανικές μορφές με εμπορικές ονομασίες όπως οι Keltrol και Kelzan (Kelco Inc.) και Rhodopol και Rhodigel (RhOne-Poulenc). Η πρωτοταγής δομή του βασίζεται σε σκελετό fJ-1, 4-D-γλυκάνης (κυτταρίνης), υποκατεστημένη σε 0-3 εναλλακτικά κατάλοιπα σκελετού από φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες τρισακχαρίτη του β-D-μαννόζη-(1,4)-β-D-γλυκουρονικό οξύ-(1,2)-α-D-μαννόζη. Η κύρια πηγή δομικής μεταβολής είναι η παρουσία ή η απουσία 4,6-συνδεδεμένων υποκατάστατων πυροσταφυλικού κετάλης επί τερματικής μαννόζης υπολείμματα ή / και οξεικούς υποκαταστάτες σε 0-6 των υπολειμμάτων εσωτερικής μαννόζης. Σε κανονικές εμπορικές ξανθάνες ο βαθμός υποκατάστασης συνήθως είναι περίπου 30-40% για το πυροσταφυλικό και 60-70% για το οξικό οξύ.

Σε αντίθεση με τα περισσότερα πολυσακχαριτικά πηκτικά, η ξανθάνη υπάρχει κανονικά στο διάλυμα ως μια άκαμπτη, διαρθρωτικά διατεταγμένη δομή και όχι ως κυμαινόμενο «τυχαίο πηγίο». Η ταξινομημένη μορφή σταθεροποιείται από το άλας αλλά με επαρκώς χαμηλή ιοντική ισχύ μπορεί να είναι «λιωμένο» στη θέρμανση.<sup>66</sup>

Λόγω της υψηλής θερμικής σταθερότητας είναι χρήσιμη ως πυκνωτικό μέσο στην κονσερβοποίηση των τροφίμων και η προσθήκη της σε πηκτές αμύλου βελτιώνει ουσιαστικά τη σταθερότητα κατάψυξης/ απόψυξης.<sup>28</sup>

### 1.4.4 Ζελατίνη

Η ζελατίνη<sup>67</sup> αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά υδροκολλοειδή. Η ζελατίνη πωλείται στη βιομηχανία τροφίμων ως παράγοντας πηκτωματοποίησης. Είναι σχετικά φτηνό να παράγεται σε ποσότητα και υπάρχει μια έτοιμη προμήθεια κατάλληλης πρώτης ύλης. Όντας μια πρωτεΐνη, περιέχει απαραίτητα αμινοξέα

τα οποία βρίσκονται σε μικρή ποσότητα σε πολλά τρόφιμα (λυσίνη). Έτσι, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, αποφάσισε ότι η ζελατίνη πρέπει να καταταγεί ως τρόφιμο αυτούσιο και δεν πρέπει να υπόκειται σε καταχώριση αριθμού «Ε».

Η ζελατίνη προέρχεται εμπορικά από το κολλαγόνο με ελεγχόμενη όξινη ή αλκαλική υδρόλυση. Επομένως, η πηγή, η ηλικία και ο τύπος κολλαγόνου επηρεάζουν το καθένα τις ιδιότητες των ζελατινών που προέρχονται από αυτά. Επίσης, έχει καλές ρεολογικές ιδιότητες και δημιουργεί αρκετά ισχυρές πηκτές.

#### **1.4.5 Κόμμι χαρουπιού**

Οι δύο γαλακτομανάνες με τη μεγαλύτερη εμπορική σημασία για τη διατροφή είναι το κόμμι γκουάρ και το κόμμι χαρουπιού. Και οι δύο εμφανίζονται ως πολυσακχαρίτες εφεδρείας ενέργειας στο ενδοσπέρμιο των σπόρων των φυτών της οικογένειας *Leguminosae*, τα μέλη της οποίας κυμαίνονται από δέντρα μεγάλου μεγέθους έως μικρά ποώδη φυτά όπως το τριφύλλι. Οι σπόροι *Leguminosae* χρησιμοποιούνταν ως ζωοτροφές και, ιδιαίτερα σε περιόδους αστίας, ως ανθρώπινη τροφή. Και στις δύο περιπτώσεις, ο εμπορικός πολυσακχαρίτης λαμβάνεται με άλεση του ενδοσπέρματος σπόρων μετά την απομάκρυνση του φλοιού και του φύτρου, δίνοντας προϊόντα με περιεκτικότητα σε γαλακτομαννάνη 80%, ενώ τα άλλα κύρια συστατικά είναι το νερό (περίπου 12%), η πρωτεΐνη (περίπου 5%), τα λιπίδια (περίπου 0,5%) και ανόργανα υλικά (περίπου 1%).<sup>66</sup>

Οι αποξηραμένοι σπόροι ονομάζονταν «καράτια» από τους Άραβες και χρησίμευαν ως μονάδα βάρους. Οι σπόροι χαρουπιού αλέθονται και αφαιρείται το ενδοσπέρμιο. Το αλεύρι των σπόρων χρησιμοποιείται ως μέσο σύνδεσης και ως σταθεροποιητής στην κονσερβοποίηση του κρέατος, σε αλοιφές σαλάτας, λουκάνικα, μαλακά τυριά και παγωτά. Επίσης, βελτιώνει την ικανότητα δέσμευσης νερού της ζύμης, ειδικά όταν χρησιμοποιείται αλεύρι χαμηλής περιεκτικότητας σε γλουτένη.<sup>28</sup>

## 2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 2.1 Γενικά

Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>2,57</sup> παρουσιάζουν ορισμένες ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να προστατεύουν ένα βιολογικό σύστημα ενάντια στις βλαβερές επιπτώσεις τις οξειδωσης που προκαλούνται συνήθως από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) ή και από οργανικές ελεύθερες ρίζες.

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου προέρχονται από τη σταδιακή, μη πλήρη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, έχουν ισχυρότερη οξειδωτική δράση από το ίδιο το οξυγόνο και είναι τοξικές για τα κύτταρα. Τα ιόντα και οι ενώσεις που κατατάσσονται στις ενεργές μορφές οξυγόνου είναι: το οξυγόνο μονής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ), η ρίζα του υπεροξειδίου ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), η ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{HO}\cdot$ ), η υπερυδροξυλική ρίζα ( $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ), το όζον ( $\text{O}_3$ ), οι ελεύθερες ρίζες οργανικών υπεροξειδίων ( $\text{ROO}\cdot$ ) και των αλκοξυλίων ( $\text{RO}\cdot$ ) ως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ως μη-ριζική ένωση.

Κάθε ουσία που δρα ως αντιοξειδωτική προστατεύει τα βιολογικά συστήματα με διαφορετικό τρόπο, υπάρχουν δηλαδή διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης.

Κατά επέκταση οι αντιοξειδωτικές ουσίες λειτουργούν:

- Ως αναστολείς στην παραγωγή ROS.
- Ως χημικές παγίδες / δεξαμενές που «απορροφούν» ενέργεια και ηλεκτρόνια, αδρανοποιώντας τις ROS, π.χ. καροτενοειδή και ανθοκυανίνες.
- Ως καταλυτικά συστήματα που εξουδετερώνουν ή μετατρέπουν τις ROS, π.χ. αντιοξειδωτικά ένζυμα SO-D (υπεροξειδική δισμουτάση), καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.
- Συμπλοκοποιούν τα μεταλλικά ιόντα, όπως το  $\text{Fe}^{+2}$  προστατεύοντας τα από την οξειδωτική επίδραση των ελεύθερων ριζών.

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε φυσικά και συνθετικά. Φυσικά ονομάζονται αυτά που προσλαμβάνονται με την τροφή και περιλαμβάνονται η Βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη A (ρετινόλη) και τα καροτενοειδή (β-καροτίνη, λυκοπένιο, λουτεΐνη κ.α.), το σελήνιο και άλλα μέταλλα απαραίτητα για τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων του

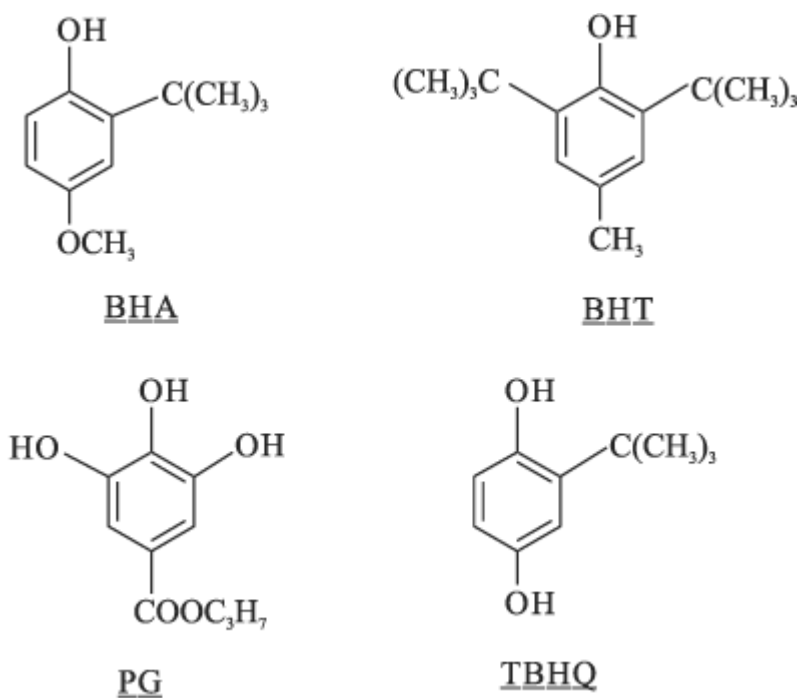
οργανισμού. Επίσης, φυτικές στερόλες είναι τα φλαβονοειδή, θειούχες φυτικές ενώσεις και φαινολικές ενώσεις.<sup>61</sup>

Συνθετικά αντιοξειδωτικά προστίθενται είτε στα λίπη είτε στα τρόφιμα που περιέχουν λιπαρή ύλη για να επιβραδύνουν την οξείδωση για την οποία ευθύνονται οι ελεύθερες ρίζες<sup>61</sup> και να καταστήσουν έτσι τα τρόφιμα εύληπτα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες: <sup>17</sup>

- Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό.
- Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου.

Τα πιο γνωστά συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία Τροφίμων είναι:

- Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), μίγμα δύο ισομερών της 2-τριπ.-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-τριπ.-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης
- Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) δηλ. 2,6-δι-τρι.-βουτυλοπαρακρεσόλη
- Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός (PG), ο οκτυλικός και δωδεκυλικός
- Η δι-τριπ.-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ)



Εικόνα 4: Χημικές Δομές συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών

Έτσι αναπτύχθηκαν απλές, εύκολες και αξιόπιστες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής (Α.Ο) ικανότητας, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μηχανισμό αντίδρασης, το οξειδωτικό μέσο, το είδος του δείκτη, τις συνθήκες αντίδρασης και την έκφραση των αποτελεσμάτων.

## 2.2 Τρόποι δράσεις αντιοξειδωτικών ουσιών

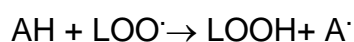
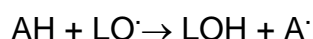
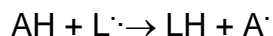
Οι αντιοξειδωτικές ουσίες<sup>2</sup> δρουν με δύο τρόπους :

- (α) Ως δότες ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer - H.A.T)
- (β) Ως δότες μονήρους ηλεκτρονίου (Electron Transfer - E.T).

Το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο, ανεξάρτητα από το μηχανισμό, αλλά η κινητική και το δυναμικό των παράπλευρων αντιδράσεων είναι διαφορετικά. Η ενέργεια διάσπασης του δεσμού και το δυναμικό ιονισμού είναι δύο κύριοι παράγοντες που προσδιορίζουν το μηχανισμό και την αποδοτικότητα των αντιοξειδωτικών. Οι μηχανισμοί E.T και H.A.T λειτουργούν σχεδόν παράλληλα σε ένα σύστημα και ανάλογα την ταχύτητα με την οποία υλοποιούνται επικρατεί τελικά ένας από τους δύο.

### **Αντιδράσεις απόδοσης ατόμου υδρογόνου (H.A.T)**

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων (L·), στις αλκοξυλικές (LO·) και στις υπεροξειδικές ρίζες (LOO·) κατά τις ακόλουθες αντιδράσεις:

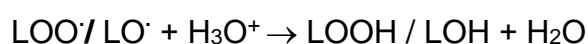
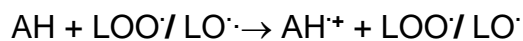


(όπου AH είναι ένα οποιοδήποτε αντιοξειδωτικό)

Οι φαινόξυ-ρίζες (A·) που παράγονται τελικά ανεξάρτητα από το μηχανισμό δράσης των AH, είναι λιγότερο δραστικές από τις LOO· και RO· καθώς σταθεροποιούνται λόγω δομών συντονισμού.

### **Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (ET).**

Σε αυτόν το μηχανισμό δράσης οι αντιοξειδωτικές ενώσεις προσφέρουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών εξαρτάται αφενός από την ευκολία απόδοσης ατόμου υδρογόνου ή μονήρους ηλεκτρονίου προς τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου από τη σταθερότητα της φαινόξυ ρίζας (A·). Σημαντικό ρόλο, λοιπόν, παίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά τους, δηλαδή το είδος και ο αριθμός των υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο.

### **2.3 Φυτοχημικά συστατικά**

Οι πολυφαινόλες ή διαιτητικές φαινόλες αποτελούν άφθονα μικροθρεπτικά συστατικά της διατροφής των οποίων ο ρόλος είναι σημαντικός στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Τα φυτά αποτελούν άριστη πηγή φαινολικών συστατικών και μάλιστα σε αρκετές μεγάλες συγκεντρώσεις.



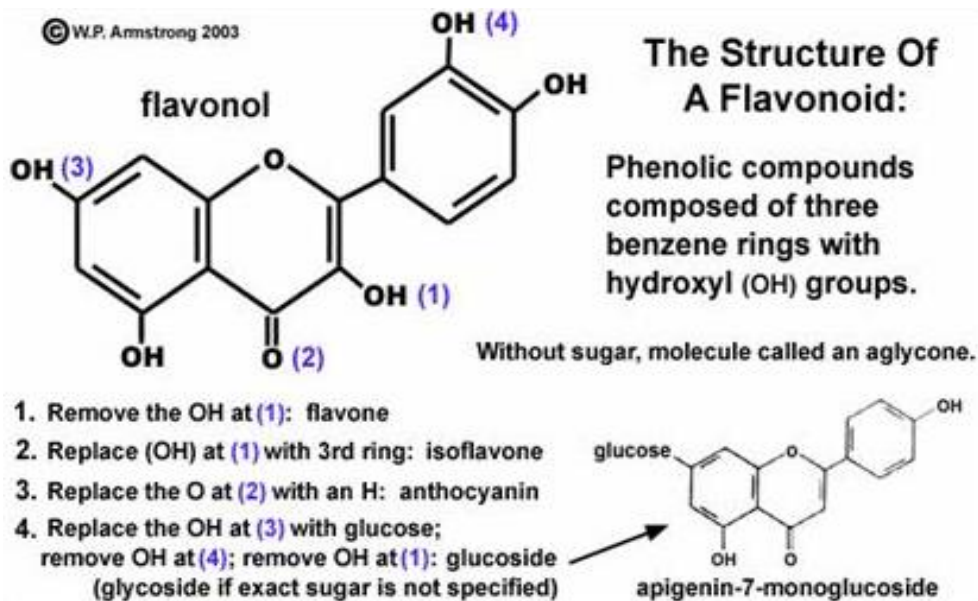
Τα φυτά συνθέτουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων που παραδοσιακά διαχωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με βάση το ρόλο που επιτελούν στο φυτικό μεταβολισμό. Τα μόρια αυτά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και συμμετάσχουν γενικά στην άμυνα έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας ή την επιθετικότητα από παθογόνους μικροοργανισμούς.<sup>62</sup>

Η πλειοψηφία των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι οι φαινολικές ενώσεις των οποίων οι σημαντικότερες ομάδες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία είναι οι τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα.<sup>60</sup> Οι δύο κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων που διακρίνονται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή μόρια.<sup>3</sup>

### **2.3.1 Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι υδατοδιαλυτά πολυφαινολικά μόρια που περιέχουν 15 άτομα άνθρακα και ανήκουν στην οικογένεια των πολυφαινολών. Τα φλαβονοειδή μαζί με τα καροτένια, είναι υπεύθυνα για τον χρωματισμό των λαχανικών και βοτάνων. Τα φλαβονοειδή βρίσκονται ευρέως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά, και αναγνωρίζονται ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Επιπλέον έχουν επιδείξει ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών και προστασία κατά του οξειδωτικού στρες, λόγω του υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής και της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως χηλικοί συμπλοκοποιητές μετάλλων. Τέλος η ομάδα των φλαβονοειδών περιλαμβάνει ενώσεις με τη δομή δακτυλίων C6-C3-C6 οι οποίες είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβαν-3-όλες, ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανιδίνες.<sup>3</sup>

Αποτελούν σε μεγάλη αναλογία συστατικά του τσαγιού και συμβάλλουν στη στυφή γεύση. Οι φλαβανόνες βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και ως συνθετικές γλυκαντικές ύλες. Μία από τις πιο σπουδαίες ιδιότητες των φλαβονοειδών είναι και η προστασία που παρέχουν στις οξειδώσεις *in vivo*. Οι τελευταίες συνδέονται με την αθηροσκλήρωση, καρκινογένεση και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες.<sup>17</sup>



Εικόνα 5: Γενική δομή φλαβονοειδών και υποκατηγορίες

### 2.3.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την πιο απλή συγκριτικά κατηγορία και συνιστούν το 1/3 των φαινολικών συστατικών που προσλαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής. Μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα κινναμωμικού οξέος.

Περιέχονται σε φρούτα και λαχανικά κυρίως με τη μορφή εστέρων ή αμιδίων τους. Η αντιοξειδωτική δράση τους σχετίζεται με τη χημική τους δομή. Σύμφωνα με μελέτες *in vitro*, παρεμποδίζουν την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και μελετώνται συστηματικά για βιολογικές ιδιότητες όπως αντι-γονιδιοτοξικότητα και πρόληψη από καρκίνους.

### 2.3.3 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες (tocopherols) είναι μια ομάδα λιποδιαλυτών χημικών ενώσεων παρόμοιας χημικής δομής (ομόλογες ενώσεις) με έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Παρουσιάζουν πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις και η πρόσληψη από τον ανθρώπινο οργανισμό σε μικρές ποσότητες μέσω της τροφής είναι απαραίτητη. Συλλογικά οι τοκοφερόλες είναι γνωστές ως βιταμίνη Ε και συναντώνται σε φυτικά έλαια και γενικά σε φυτικής προέλευσης τροφές. Η ονομασία τους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις "τόκος" (γέννα, δημιουργία)

και "φέρω", επειδή η απουσία τους από νωρίς είχε συσχετισθεί με προβλήματα στην αναπαραγωγική λειτουργία, όπως αποβολές εμβρύων.

#### **2.4 Τα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα – Μέθοδοι προσδιορισμού**

Τις τελευταίες δεκαετίες, αυξάνεται το ενδιαφέρον σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των τροφίμων που οφείλονται στις γνωστές επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην εξέλιξη και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών νόσων, της γήρανσης και του καρκίνου.<sup>60</sup> Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων ουσιών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στους παραπάνω μηχανισμούς. Κάθε μέθοδος προσφέρει μόνο μια εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός υποστρώματος. Όλες οι μέθοδοι συμπεριλαμβάνουν ένα ενεργοποιητή οξειδωσης, ένα κατάλληλο υπόστρωμα και την κατάλληλη μέτρηση του τελικού σημείου της αντίδρασης. Μία μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός συστατικού των τροφίμων θα πρέπει να ικανοποιεί τις ακόλουθες ιδανικές απαιτήσεις:<sup>2</sup>

- (α) να είναι ευαίσθητη στις χημικές μεταβολές που συμβαίνουν σε εφαρμογές.
- (β) να χρησιμοποιεί μια βιολογική πηγή ρίζας.
- (γ) να είναι απλή.
- (δ) να χρησιμοποιεί μία μέθοδο με καθορισμένο τελικό σημείο και χημικό μηχανισμό.
- (ε) οι χημικές ουσίες και τα όργανα μέτρησης για την εφαρμογή της να είναι εύκολα διαθέσιμα.
- (στ) να έχει καλή επαναληψιμότητα.
- (ζ) να είναι προσαρμόσιμη στον προσδιορισμό υδρόφιλων και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών και στη χρήση διαφορετικών πηγών ρίζας
- (η) να είναι προσαρμόσιμη σε ανάλυση υψηλής σάρωσης για συνήθεις αναλύσεις ποιοτικού ελέγχου.

#### **2.5 Αντιοξειδωτικά στην ανθρώπινη υγεία**

Τα αντιοξειδωτικά υπάρχουν στη φύση σε φυτικούς οργανισμούς, σε ζωικά ιστούς και μικροοργανισμούς. Σημαντικές πηγές φυτικών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα όσπρια, οι ξηροί καρποί

και τα βότανα. Η ποικιλία των αντιοξειδωτικών συστατικών έχει χαρακτηριστεί και ποσοτικοποιηθεί. Αντιοξειδωτικά συστατικά αποτελούν οι βιταμίνες C και E, πολυφαινόλες, καροτενοειδή, αντιοξειδωτικά πεπτίδια, και ένζυμα αλλά και κάποια αντιοξειδωτικά ιχνοστοιχεία όπως το σελήνιο. Η κατανάλωση δημητριακών ολικής αλέσεως και όσπριων έχει συσχετισθεί με τη μείωση του κινδύνου των ασθενειών κάθε ηλικίας. Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των αντιοξειδωτικών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλεί χρόνιες παθήσεις ειδικότερα φλεγμονές, μεταβολικό σύνδρομο, καρδιαγγειακές ασθένειες και καρκίνο.<sup>60</sup>

*Πίνακας 1: Σημαντικά αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές*

<b>Αντιοξειδωτικά</b>	<b>Παραδείγματα</b>	<b>Πηγές</b>
<b>Τοκοφερόλη</b>	α-,β-,γ- και δ-τοκοφερόλες	Δημητριακά, όσπρια, ξηροί καρποί, <b>φυτικά έλαια</b> , πίτουρο ρυζιού, καρπός φοίνικα
<b>Ασκορβικό Οξύ</b>	Ασκορβικό οξύ, ανιόν ασκορβικού οξέος	Φρούτα, λαχανικά, κλπ.
<b>Καροτενοειδή</b>	β-καροτένιο, λυκοπένιο, κανθαξανθίνη	Καρότα, ντομάτα, καλαμπόκι, φασόλια, ψάρια/οστρακοειδή, κλπ.
<b>Φαινολικά</b>	Φερουλικό οξύ, κερκετίνη, κατεχίνη, ρεσβερατρόλη, κυανιδίνη	<b>Φρούτα</b> , λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, <b>βότανα</b> κλπ.
<b>Πεπτίδια</b>	Φερριτίνη, τρανσφερίνη, λακτοφερίνη	Γάλα, αυγά, φασόλια, κλπ.
<b>Ένζυμα</b>	Δισμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	Φυτικοί και Ζωικοί οργανισμοί
<b>Ιχνοστοιχεία</b>	Σελήνιο, ψευδάργυρο, μαγγάνιο	Δημητριακά, όσπρια, ξηροί καρποί, κρέας

### 3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

#### 3.1 Αλλοίωση τροφίμων και ανάπτυξη μικροβίων

Οι μικροοργανισμοί παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλο το κύκλο ζωής των τροφίμων. Πολλά από τα τρόφιμα που καταναλώνουμε παράγονται ή εμπλουτίζονται με τη δράση των μικροβίων όπως για παράδειγμα το γιαούρτι, το τυρί και το ανθότυρο που είναι προϊόντα μικροβιακής ζύμωσης. Από την άλλη πλευρά η ανεξέλεγκτη ή ανεπιθύμητη ανάπτυξη μικροβίων μπορεί να καταστρέψει τεράστιες ποσότητες τροφίμων προκαλώντας οικονομικές ζημιές αλλά και απώλεια θρεπτικών υλικών. Τα περισσότερα τρόφιμα συνιστούν κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, γεγονός που επιφέρει μείωση της ποιότητας και της διαθεσιμότητας των τροφών.<sup>9</sup>

Ως αλλοίωση τροφίμου ορίζεται οποιαδήποτε μεταβολή στην εμφάνιση, την οσμή ή τη γεύση του που το καθιστούν ακατάλληλο για κατανάλωση. Τα αλλοιωμένα τρόφιμα δεν είναι πάντοτε επικίνδυνα προς κατανάλωση, εκτός από τις περιπτώσεις όπου η αλλοίωση οφείλεται σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα τρόφιμα αποτελούνται από οργανική πρώτη ύλη και έτσι μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας χημειοργανοτροφικών βακτηρίων. Τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου καθορίζουν το βαθμό ευπάθειας του στη μικροβιακή δράση.<sup>19</sup>

Η ευπάθεια στη μικροβιακή δράση εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες

- Την περιεχόμενη υγρασία
- Την ενεργότητα ύδατος  $a_w$
- Τις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες
- Τη θερμοκρασία
- Την οξύτητα (pH)

## 3.2 Ανάλυση μικροβιακής δράσης στα τρόφιμα

### 3.2.1 Βακτήρια και τρόφιμα

Τα βακτήρια<sup>9</sup> είναι προκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται κατά κανόνα με κυτταρική διαίρεση. Είναι κατά κανόνα ετερότροφοι οργανισμοί, δηλαδή παράσιτοι ή παθογόνοι των ανώτερων φυτών και ζώων καθώς και του ανθρώπου. Με κριτήριο τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (σχήμα κυττάρων, χρώση κατά Gram που αντικατοπτρίζει τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος) ταξινομούνται σε 17 ομάδες. Η πιο πρόσφατη και αποδεκτή κατάταξη των βακτηρίων καλύπτεται από την κλείδα ταξινομήσεως των προκαρυωτικών κατά Bergey το 1984 σε τέσσερις τόμους τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα Αρχαιοβακτήρια, τα Κυανοβακτήρια και τα υπόλοιπα αρνητικά κατά Gram και τους Ακτινομύκητες.

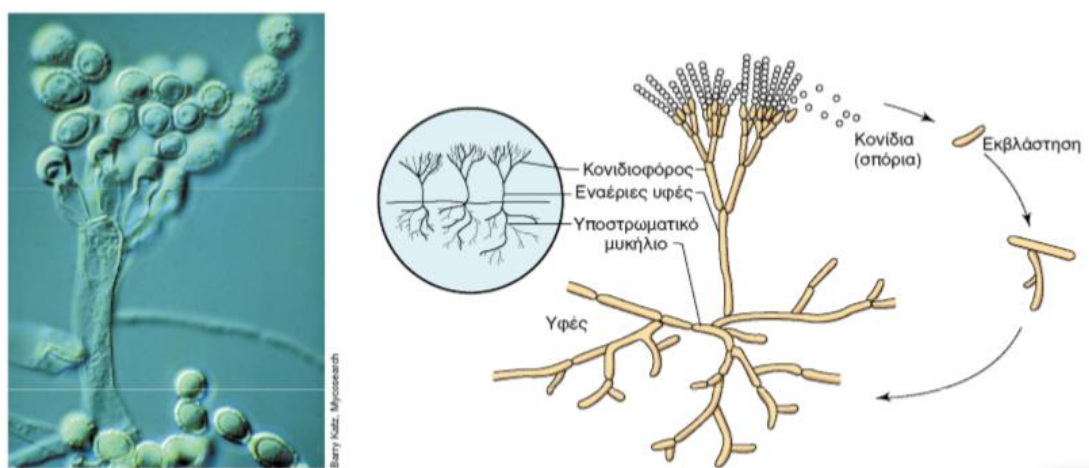
Τα βακτήρια είναι η κυριότερη πηγή μόλυνσεως και αλλοιώσεως των τροφίμων ιδιαίτερας των κονσερβοποιημένων, περισσότερο από ότι είναι οι ζύμες και οι μύκητες. Παρακάτω παρατίθενται τα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν τη δυναμικότερη πηγή αλλοίωσης των τροφίμων.

- Τη μεγάλη ευελιξία των διάφορων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις τους σε θρεπτικά συστατικά, σε pH κ.α. για ανάπτυξη και δραστηριότητα. Για κάθε τρόφιμο υπάρχει αντίστοιχο βακτήριο, ένα ή περισσότερα, τα οποία προκαλούν την αλλοίωση του.
- Την ικανότητα κυρίως της Οικογενείας *Bacillaceae* να σχηματίζει ενδοσπόρια ανθεκτικά στη θέρμανση όπου να μην εξοντώνονται ακόμη και θερμοκρασίες βρασμού, ακόμη και αν βρίσκονται πολλές ώρες σε θερμοκρασία 100°C.
- Την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων σε θερμοκρασίες 45 - 55°C, τα λεγόμενα θερμόφιλα.
- Τη δυνατότητα ορισμένων ειδών να αναπτύσσονται σε συνθήκες αυστηρώς αναερόβιες (*Clostridium*).
- Τη δυνατότητα μερικών ειδών παραγωγής τοξινών ικανές να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις ακόμη και θάνατο όπως η αλλαντίαση,

Πολλά είναι τα βακτήρια όπου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού όπως είναι το γαλακτικό οξύ το οποίο αποτελεί τη βάση πολλών βιομηχανιών ζυμώσεως πρώτων υλών τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης όπως γιαούρτι, τυρί φέτα, ελιές, τουρσί κ.α.).

### 3.2.2 Μύκητες και τρόφιμα

Οι μύκητες<sup>9,21</sup> αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων, το οποίο περιλαμβάνει μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι μύκητες εμφανίζουν τεράστια ποικιλία, είναι χημειοετερότροφοι, κατά κύριο λόγο σαπρόφυτοι, αλλά και παθογόνοι, κυρίως για τα φυτά, αλλά και για τα ζώα και τον άνθρωπο. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται κυρίως από χιτίνη και ημικυτταρίνες και οι αποταμιευτικές ουσίες είναι το γλυκογόνο και διάφορα λιπίδια. Πολλαπλασιάζονται αγενώς με διάφορους τρόπους όπως με κυτταρική διαίρεση (εκτός από τους δευτερομύκητες ή ατελείς μύκητες όπως *Aspergillus*, *Penicillium*) και εγγενώς με ζυγοσπόρια, ωοσπόρια, ασκοσπόρια κ.α. Όταν αναπτύσσονται και αλλοιώνουν τα τρόφιμα, σχηματίζουν μυκήλιο δηλαδή νηματοειδείς υφές που είναι μακροσκοπικά ορατό σε αντίθεση με τις οξειδωτικές ζύμες και τα βακτήρια που μπορούν να διακριθούν μόνο μικροσκοπικά.



Εικόνα 6: Δομή και ανάπτυξη μούχλας, Αριστερά αναπαρίσταται μικρογραφία τυπικής μούχλας. Τα κονίδια διακρίνονται ως σφαιρικές δομές στα άκρα των εναέριων υφών. Δεξιά αναπαρίσταται η ο κύκλος ζωής της μούχλας.

Ανάλογα με το είδος των φυλετικών σπορίων που παράγουν οι μύκητες διακρίνονται σε ασκομύκητες, ζυγομύκητες, βασιδιομύκητες, και ωομύκητες.

Οι μύκητες βρίσκουν εφαρμογή και στην ιατρική, την φαρμακολογία και την βιομηχανία καθώς από διάφορα είδη αυτών παράγονται διάφορα φάρμακα, αντιβιοτικά, οργανικά οξέα, βιταμίνες, ένζυμα, βελτιωτικά και πρόσθετα τροφίμων. Επιπλέον πολλοί εξ' αυτών αποτελούν εδώδιμες επιλογές (μανιτάρια) ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζυμούμενων τροφίμων (τυριά, ψωμί, αλκοολούχα ποτά, παραδοσιακά προϊόντα κ.α.).

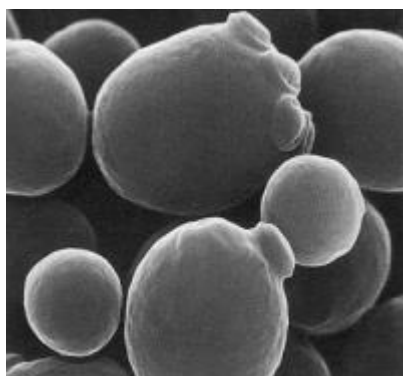
Κάποια από τα γένη μυκήτων που αφορούν τη Βιομηχανία Τροφίμων είναι

- Γένος *Mucor*. Είδη του αναπτύσσονται σε φρούτα και λαχανικά καθώς και χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα για την έκκριση αμυλασών καθώς και για τη σακχαροποίηση του αμύλου σόγιας και ρυζιού.
- Γένος *Rhizopus*. Είδη του προσβάλλουν φρούτα και λαχανικά με βαμβακώδη μυκητίαση. Το είδος *Rhizopus nigricans*, είναι υπεύθυνο για τη μαύρη μούχλα του ψωμιού.
- Γένος *Aspergillus*. Τα είδη του γένους *Aspergillus* είναι από τα πιο σημαντικά στη Βιομηχανία Τροφίμων τόσο για λόγους φθοράς και αλλοίωσης των τροφίμων όσο και ωφελιμιστικής χρήσης. Έχει πραγματοποιηθεί παραγωγή κιτρικού οξέος από την ανάπτυξη του είδους *Aspergillus niger* σε υπόστρωμα φλοιού ακτινιδίου.
- Γένος *Penicillium*. Τα είδη του γένους *Penicillium* είναι υψίστης σημασίας για τη Βιομηχανία Τροφίμων. Το είδος *Penicillium digitatum*, σχηματίζει κονίδια πράσινου χρώματος, πρόκειται για την κυανή καιπράσινη μούχλα των εσπεριδοειδών. Τα είδη *Penicillium camemberti* και *Penicillium roqueforti* χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή του τυριού και του μπλε τυριού, ροκφόρ, αντίστοιχα.
- Γένος *Bothrytis*. Το είδος *Bothrytis cinerea* είναι υπεύθυνο για τη σήψη του σταφυλιού.
- Γένος *Alternaria*. Είναι ο περισσότερο σηψιγόνος μύκητας των οπωρολαχανικών.
- Γένος *Neurospora (Monilia)*. Προσβάλλει ποικιλία τροφίμων.



### 3.2.3 Ζύμες και τρόφιμα

Οι ζύμες<sup>9,21</sup> ή ζυμομύκητες είναι μικρομύκητες. Πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλαστήσεις και ορισμένα είδη με κυτταρική διαίρεση. Ένα κύτταρο ζύμης μπορεί να έχει αρκετά εκβλαστήματα στην επιφάνειά του. Καθώς τα εκβλαστήματα ωριμάζουν αποχωρίζονται από την επιφάνεια του αρχικού κυττάρου. Έχουν καθορισμένο κυτταρικό τοίχωμα, μάλλον δύσκαμπτο, διακριτό και καλώς οργανωμένο πυρήνα και στερούνται μέσων μετακινήσεως (βλεφαρίδων).



Εικόνα 7: Εκβλαστήματα στην επιφάνεια των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

Πολλά γένη και είδη ζυμών προξενούν ανεπιθύμητες αλλοιώσεις σε τρόφιμα με την ανάπτυξή τους σ' αυτά και σε άλλες μπορούν να δημιουργήσουν ιδιαίτερα προβλήματα κατά τη διάρκεια της ομαλής πορείας μιας ζύμωσης. Οι αλλοιώσεις των ζυμών εκδηλώνονται στην επιφάνεια υγρών τροφίμων με υμένιο ή με θόλωμα, ενώ στα στερεά με επικάλυψη από βλενώδεις ουσίες. Γενικά, αναπτύσσονται σε τρόφιμα με χαμηλό pH, κάποια είδη αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 0-4 °C ενώ κάποια άλλα αναπτύσσονται σε τρόφιμα πλούσια σε ζάχαρα (ωσμόφιλες) ή τρόφιμα πλούσια σε αλάτι (αλόφιλες). Πολλά είδη ζυμών αναπτύσσονται σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Τα προϊόντα μεταβολισμού των ζυμών, δεν προξενούν τροφικές δηλητηριάσεις, όπως συμβαίνει με ορισμένα βακτήρια, παρά μόνο αλλαγές στην οσμή και τη γεύση του εκάστοτε τροφίμου στο οποίο αναπτύσσονται.

Οι ζύμες είναι πολύ σημαντικές στη Βιομηχανία τροφίμων διότι είναι υπεύθυνες για τις ζυμώσεις δηλαδή για την παραγωγή και τη διατήρηση πολλών τροφίμων. Η αλκοολική ζύμωση είναι δραστηριότητα των ζυμών η οποία χρησιμοποιήθηκε πριν από χιλιάδες χρόνια, σύμφωνα με καταγραφές, για την παραγωγή κρασιού και μπύρας. Τα κυριότερα προϊόντα που

παράγονται με μεταβολιστικές δραστηριότητες των ζυμών είναι: ο ζύθος (μπίρα), τα κρασιά, ο μηλίτης, η γλυκερίνη, η ζύμη αρτοποιίας, λιπαρές ουσίες, ένζυμα, πολυσακχαρίτες και άλλα. Η μαγιά αρτοποιίας είναι το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση υπό βιομηχανικές συνθήκες.

Τρόφιμα πλούσια σε ζάχαρη όπως οι μαρμελάδες, οι ζελέδες, τα σιρόπια, τα αποξηραμένα φρούτα, οι συμπυκνωμένοι χυμοί φρούτων καθώς και το μέλι και οι μελάσες που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή αποτελούν πρόσφορο υπόστρωμα για την ανάπτυξη ωσμόφιλων ζυμών οι οποίες μπορούν να αναπτυχθούν και σε συγκέντρωση σακχάρων ίση με 40-70% κατά βάρος. Η αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη των ζυμών. Σε συγκέντρωση 65-70% αναπτύσσονται ελάχιστα είδη και αυτά με πολύ αργό ρυθμό. Η αλλοίωση που προκαλούν οι ζύμες στα τρόφιμα εκδηλώνεται με μία ιδιαίτερη και όχι αποκρουστική οσμή και οφείλεται σε εστέρες, αλδεΐδες και άλλα πηπτικά προϊόντα που προκύπτουν από το μεταβολισμό τους.

### **3.3 Μυκοτοξίνες**

Οι μύκητες μπορούν να εισβάλουν, να αποικίσουν, και να παράγουν μυκοτοξίνες είτε κατά τη διάρκεια της προσυγκομιδής (στο χωράφι) ή μετά τη συγκομιδή στα στάδια της αποθήκευσης, μεταφοράς και επεξεργασία των τροφίμων. Οι μυκοτοξίνες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων, οι οποίες αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Οι μυκοτοξίνες έχουν τοξική, καρκινογόνα, μεταλλαξιογόνα, τερατογόνα και ανοσοτοξική δράση στον άνθρωπο και στα ζώα. Η τοξικότητα που αχρηματίζεται κατά την ανάπτυξη μυκοτοξίνης στο τρόφιμο εκφράζεται ως μυκοτοξίνωση τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Για την εκδήλωση ασθένειας, από μυκοτοξίνη απαιτείται κατανάλωση τροφίμου που περιέχει ενεργή τοξίνη και όχι μικροβιακά κύτταρα, τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται πολύ γρήγορα ακόμη και σε 30 λεπτά από την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου.<sup>14,15</sup>

Μέχρι τις αρχές του 1960, δεν είχε δοθεί η απαραίτητη σημασία οπότε δεν είχε πραγματοποιηθεί μελέτη και έρευνα για τις επιδράσεις των μυκοτοξινών στην υγεία μέχρι την ανακάλυψη των αφλατοξινών. Στη σημερινή εποχή έχουν εφαρμοστεί όρια στη Βιομηχανία Τροφίμων για την ύπαρξη κυρίως

αφλατοξινών στα τρόφιμα.<sup>23</sup> Οι μυκοτοξίνες, από το 2004 και μετά, αποτελούν τους πρώτους επιμολυντές στο Σύστημα Ταχείας Προειδοποίησης για Ανασφαλή Τρόφιμα και Ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed – RASFF). Τα περισσότερα περιστατικά αφορούν κυρίως τις αφλατοξίνες και δευτερευόντως την ωχρατοξίνη Α. Βάσει του Κανονισμού του Συμβουλίου (EEC) No. 315/93 και την Οδηγία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου 85/591/EC, τα ανώτατα όρια για τις αφλατοξίνες σε ορισμένα τρόφιμα έχουν τεθεί από τον Κανονισμό της Επιτροπής (EC) No.194/97, τροποποιημένο από τον Κανονισμό της Επιτροπής (EC) No.1525/98, ενώ η μέθοδος δειγματοληψίας έχει ρυθμιστεί από την Οδηγία της Επιτροπής 98/53/EC. Τα ανώτατα όρια ειδικά για την ωχρατοξίνη Α, έχουν τεθεί από τον Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (EC) No. 472/2002 και η δειγματοληπτική μέθοδος έχει ρυθμιστεί από την Επιτροπή με τις Οδηγίες 2002/26/EC και 2002/27/EC.<sup>24</sup>

Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες είναι οι Αφλατοξίνες (AF) και οι Ωχρατοξίνες (ΟΤ- Ωχρατοξίνη Α ΟΤΑ). Άλλες μυκοτοξίνες όπου έχουν απομονωθεί από τα τρόφιμα είναι η ροκφορτίνη (RF), πατουλίνη, ζεαραλενόνη (DON) και κιτρινίνη.<sup>20</sup>

### 3.3.1 Αφλατοξίνες

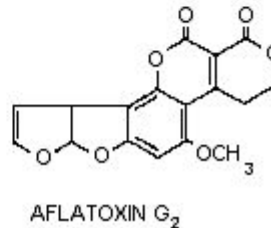
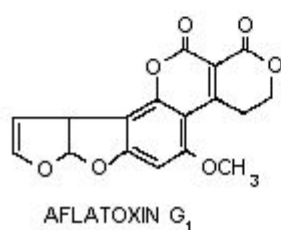
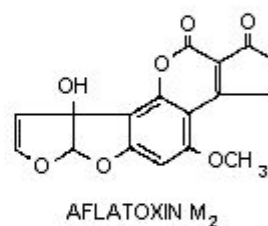
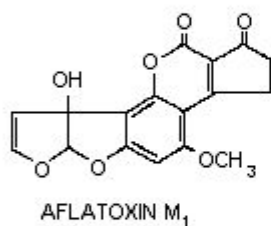
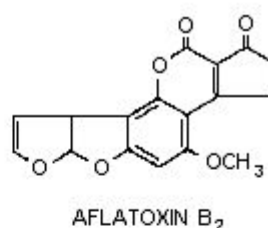
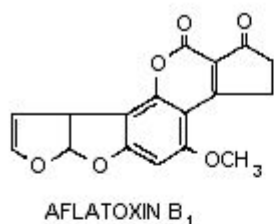
Οι αφλατοξίνες είναι διφουρανοκουμαρινικά παράγωγα.<sup>8</sup> Οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>, παράγονται στη φύση από τους μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Οι ονομασίες B και G αναφέρονται στα φθορίζοντα χρώματα μπλε (Blue) και πράσινο (Green) αντίστοιχα που παρατηρούνται από υπεριώδες φως μεγάλου μήκους και οι δείκτες 1 και 2 στα διακριτά προφίλ που παρουσιάζουν σε δίσκους χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Οι Αφλατοξίνες M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των AFB<sub>1</sub> και AFB<sub>2</sub> και η ονομασία τους M προήλθε από την παρουσία τους στο γάλα (Milk). Η μεγαλύτερη επίδραση των αφλατοξινών στην ανθρώπινη υγεία είναι η δυνατότητα πρόκλησης καρκίνου του ήπατος.<sup>19</sup>

Το καλαμπόκι, τα φιστίκια και ο βαμβακόσπορος είναι από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες που προσβάλλονται από αυτούς τους μύκητες και τις περισσότερες φορές η προσβολή πραγματοποιείται κατά το στάδιο της συγκομιδής και όχι κατά την αποθήκευση. Επίσης, άλλα τρόφιμα τα οποία προσβάλλονται από αφλατοξινογόνους μύκητες είναι ξηροί καρποί,

μπαχαρικά, δημητριακά, αποξηραμένα φρούτα (σταφίδες), βότανα και αρωματικά (ρίγανη, θυμάρι κ.α.), ελιές και κατά επέκταση και στο ελαιόλαδο. Αφλατοξίνες έχουν ανιχνευθεί σε γάλα και σε αυγά λόγω μολυσμένης ζωοτροφής που καταναλώθηκε από τα ζώα που τα παράγουν, ακόμη και σε φυσικά φάρμακα όπου τα αποξηραμένα φυτά ή βότανα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτες ύλες είχαν προσβληθεί από τους μύκητες. Η ποικιλία του φυτού ανάλογα τη γεωγραφική του θέση, επηρεάζει τη τοξινογένεση,<sup>19,20</sup>

Η προσωρινά μέγιστη ανεκτή ημερήσια πρόσληψη σε αφλατοξίνη AFB<sub>1</sub> είναι 1ng ανά kg τροφίμου. Βάσει νομοθεσίας τα όρια ανίχνευσης αφλατοξινών για κάποια τρόφιμα αναφέρονται παρακάτω:<sup>20</sup>

- Γενικά στα τρόφιμα: 2ng/g
- Παιδικές τροφές: 0,10ng/g
- Γάλα(AFM<sub>1</sub>): 0,05μg/L

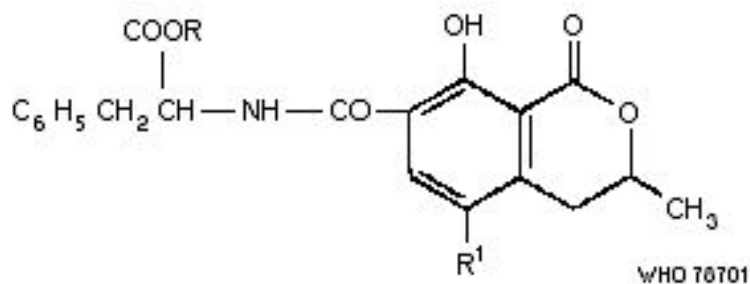


**Εικόνα 8: Οι κυριότερες αφλατοξίνες**

### 3.3.2 Ωχρατοξίνη Α

Η ωχρατοξίνη Α αποτελεί την πιο τοξική μυκοτοξίνη και παράγεται από τους μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium spp* κυρίως από τα είδη *A.Cardonarius*, *A.Ochraceus*, *A.Niger* και *P.verrucosum*. Η τοξίνη προσβάλλει, σε όλα τα είδη θηλαστικών, το νεφρό. Είναι ανθεκτική στις περισσότερες διεργασίες τροφίμων. Ανιχνεύεται σε αρκετά τρόφιμα όπως δημητριακά, καφέ, κακάο, σταφίδες, γάλα, χοιρινό, κρέας, φιστίκια, μπίρα, κρασί (ιδιαίτερα στο κόκκινο), ξηρά φασόλια και ελαιόλαδο.<sup>24</sup> Η κυριότερη πηγή ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα είναι από το ψωμί από κριθάρι ή σιτάρι το οποίο έχει μολυνθεί από το μύκητα *Penicillium verrucosum*.<sup>19</sup>

Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για την ανίχνευση ΟΤΑ στα τρόφιμα έχουν καθοριστεί στα 2-10ppb για το γενικό πληθυσμό και 0,5ppb για τα βρέφη, ενώ για το κρασί έχει προταθεί η τιμή των 2ppb ως μέγιστη επιτρεπόμενη περιεκτικότητα (Ευρωπαϊκός Κανονισμός, ΕΚ 123/2005).<sup>24</sup>



**Εικόνα 9: Δομή Ωχρατοξίνης**



## 4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΛΙ

### 4.1 Τι είναι το μέλι;

Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.<sup>25</sup>

Τα κυριότερα είδη μελιού είναι τα παρακάτω:

- Μέλι ανθέων ή μέλι νέκταρος, είναι το μέλι όπου προέρχεται από νέκταρ φυτών.
- Μέλι μελιτώματος, είναι το μέλι όπου προέρχεται κυρίως από εκκρίματα απομυζούντων εντόμων (Hemiptera) τα οποία βρίσκονται πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών ή εκκρίσεις που προέρχονται από ζώντα μέρη των φυτών.<sup>27</sup>

### 4.2 Σύσταση μελιού

Το μέλι παράγεται στον πρόλοβο του στομάχου των μελισσών με πρώτη ύλη το νέκταρ των ανθών (ανθόμελο) ή τα μελιτώματα ορισμένων φυτών. Το νέκταρ εκκρίνεται από ειδικούς αδένες των ανθών και αποτελείται από 50-90% νερό, 10-50% σάκχαρα (κυρίως σακχαρόζη) και άλλες ουσίες. Τα μελιτώματα είναι σακχαρώδεις χυμοί που εκκρίνονται από ορισμένα φυτά όπως το πεύκο, το έλατο κ.α. Για τη μετατροπή της πρώτης ύλης σε μέλι, οι μέλισσες μειώνουν την περιεχόμενη υγρασία της σε 14-19% και επιδρούν στα σάκχαρα με δύο ένζυμα που παράγονται στον πρόλοβο: το ένα είναι η ιμπερτάση, η οποία μετατρέπει τη σακχαρόζη σε φρουκτόζη και δεξτρόζη (D-γλυκόζη) και το άλλο είναι η οξειδάση της γλυκόζης, η οποία διασπά την D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το δεύτερο ένζυμο ενεργοποιείται μόνο όταν το μέλι αραιωθεί με νερό και ο ρόλος του είναι να προστατεύει το μέλι από βακτηριακές μολύνσεις, εξαιτίας της αντιβακτηριδιακής δράσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το γλυκονικό οξύ με τη σειρά του προσδίδει στο μέλι ένα αρκετά χαμηλό pH (3,5-4,0). Ένα άλλο ένζυμο που έχει βρεθεί στο

μέλι, η προέλευση του οποίου θεωρείται πως είναι το νέκταρ, είναι η καταλάση, οποία διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου και επομένως μειώνει την αντιμικροβιακή του δράση.<sup>26</sup>

Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως καφέ σκούρο. Η υφή του υπόκεινται από ρευστό, παχύρευστο ή μερικά ή ολικά, κρυσταλλωμένο. Η γεύση και το άρωμα ποικίλουν, αλλά εξαρτώνται από τη φυτική προέλευση.<sup>27</sup>

Το μέλι είναι ουσιαστικά ένα συμπυκνωμένο υδατικό διάλυμα ιμβερτοσάκχαρου, αλλά περιέχει και ένα πολύπλοκο μίγμα άλλων υδατανθράκων, αρκετών ενζύμων, αμινοξέων και οργανικών οξέων, ανόργανων, αρωματικών ενώσεων, χρωστικών, κηρών, κόκκων γύρης και άλλα. Στον παρακάτω πίνακα (1) αναγράφεται το εύρος διακύμανσης των συστατικών όλων των ειδών μελιού.<sup>28</sup>

**Πίνακας 2: Σύσταση μελιού %**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΕΥΡΟΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ
Υγρασία	13,4-22,9
Φρουκτόζη	27,3-44,3
Γλυκόζη	22,0-40,8
Ζαχαρόζη	1,7-3,0
Μαλτόζη	2,7-16,0
Ανώτερα σάκχαρα	0,1-8,5
Άλλα	0-13,2
Άζωτο	0,05-0,08
Ανόργανα (τέφρα)	0,20-0,24



### 4.3 Είδη μελιού

Τα είδη μελιού<sup>28</sup> διαφοροποιούνται ανάλογα με τις τεχνικές ανάκτησης αλλά και τις χρήσεις τους:

- Μέλι με Κερήθρα (Honey comb): μέλι που βρίσκεται σε νέες παρθένες κερήθρες των οποίων τα κελιά είναι επικαλυμμένα. Είναι σκουρόχρωμο μέλι που παραλαμβάνεται από καλυμμένες νέο-κατασκευασμένες κηρήθρες ηλικίας μικρότερης του ενός έτους.
- Μέλι Εξαγωγής (Extracted honey): μέλι που λαμβάνεται με φυγοκέντρηση, σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, των κερηθρών που δεν περιέχουν κελιά επώασης.
- Μέλι πίεσεως (Pressed Honey): μέλι που συλλέγεται με πίεση των κηρηθρών χωρίς γόνο με υδραυλική πρέσα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πυκνό μέλι (Beetle honey): μέλι που ανακτάται με την πολτοποίηση κηρηθρών μελιού που συμπεριλαμβάνουν κηρήθρες επώασης. Το συγκεκριμένο είδος χρησιμοποιείται για την τροφή μελισσών.
- Στραγγιστό μέλι (Strained honey): μέλι που συλλέγεται με στράγγιση των αποσφραγισμένων κηρηθρών που δεν περιέχουν κελιά επώασης.
- Μέλι οικιακής χρήσεως: μέλι με την υψηλότερη ποιότητα, καταναλώνεται στη καθαρή μορφή του.
- Μέλι Αρτοποιίας: μέλι με χαμηλή ποιότητα που χρησιμοποιείται αντί για ζάχαρη στην παρασκευή αρτοσκευασμάτων.
- Ανθόμελο (Flower honey): μέλι που προέρχεται από ρείκια, φλαμουριά, ακακία, τριφύλλια, κράμβη, φαγόπυρο και άνθη σπρωφόρων δέντρων. Είναι λεπτόρευστο μέλι και το χρώμα του κυμαίνεται από ανοιχτό προς σκούρο λευκό, πρασινοκίτρινο ή καφετί, εξαρτάται από το άνθος. Έχει χαρακτηριστική γλυκιά γεύση και έντονο άρωμα το οποίο εξαρτάται από τις γευστικές και αρωματικές ενώσεις όπου συλλέγονται από τις μέλισσες μαζί με το νέκταρ.
- Μέλι από μελιτώματα (Honeydew honey): μέλι που προέρχεται από μελιτώματα πεύκου, ελάτου ή φύλου). Είναι παχύρευστο,

σκουρόχρωμο, λιγότερο γλυκό και έχει μία ρητινούχα, τερπενική γεύση και οσμή.

#### **4.4 Διατροφική αξία μελιού**

Η σημασία του μελιού ως τροφή και ως θρεπτικό συστατικό βασίζεται κυρίως στα αρωματικά του συστατικά, την υψηλή περιεκτικότητα και τη γρήγορη απορρόφηση των υδατανθράκων του.<sup>28</sup>

Το μέλι έχει κατά μέσο όρο 304 Kcal/100g. Η βοτανική του προέλευση είναι εκείνη που σχετίζεται με την θερμιδική του αξία άμεσα, καθώς και διάφοροι παράγοντες, όπως η περιεκτικότητα σε σάκχαρα, η περιεκτικότητα σε υγρασία, κλπ.

Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Το μέλι έχει αντιβακτηριδιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε υγρασία, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το χαμηλό pH δημιουργούν ένα περιβάλλον αφιλόξενο για την ανάπτυξη βακτηρίων.

Παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται σε αντιοξειδωτικές ουσίες (ιδιότητες που εξαρτώνται κυρίως και από την πηγή προέλευσης και τη σύσταση του κάθε μελιού). Στις αντιοξειδωτικές ουσίες του μελιού συγκαταλέγονται τα φλαβονοειδή όπου δεσμεύουν τον σίδηρο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Το μέλι έχει ανόργανα στοιχεία, ιχνοστοιχεία, τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό και στη θρέψη, είναι συστατικά του σκελετού και των κυττάρων, συμμετέχουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα και τέλος ρυθμίζουν την οξύτητα του στομάχου. Το σύνολο των βιταμινών που εμπεριέχεται στο μέλι δεν είναι αρκετή για τις ημερήσιες ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού, βοηθούν στην απορρόφηση των σακχάρων. Κλινικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η κατανάλωση μελιού, μπορεί να βελτιστοποιήσει σημαντικά τον έλεγχο του σακχάρου και την ευαισθησία στην ινσουλίνη, σε σχέση με άλλες γλυκαντικές ουσίες.<sup>29</sup>

#### 4.5 Αντιβακτηριακή δράση

Οι μύκητες και οι ζύμες είναι οι μοναδικοί μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί στο μέλι. Ορισμένα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν στο μέλι αλλά η ανάπτυξη τους δεν είναι δυνατή. Τα φυτικά βακτήρια που εμβολιάζονται σε ώριμο μέλι, για πειραματικούς σκοπούς πεθαίνουν μέσα σε λίγες εβδομάδες, εκτός εάν το μέλι φυλάσσεται σε ψυχρές θερμοκρασίες. Οι μη ευνοϊκές συνθήκες που επικρατούν στο μέλι θανατώνουν τα περισσότερα βακτήρια. Τα σπόρια του *Bacillus*, οι μύκητες και οι ζύμες τείνουν να είναι παρόντα στο μέλι σε τακτική βάση. Επίσης, υπάρχουν σπόρια *Clostridium* (όλων των άλλων ειδών εκτός από *C.botulinum*). Καταγραφές από τη βιομηχανία (μη δημοσιευμένα δεδομένα) δείχνουν ότι τα στελέχη *Pseudomonas* και *Micrococcus*. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με ιούς ή παράσιτα.

Τα αποτελέσματα μίας μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε μέλι που προερχόταν από οκτώ διαφορετικές φυτικές πηγές, Smith et al. (1969), έδειξαν βακτηριοστατική δράση (σε 100% συγκέντρωση) απέναντι στα βακτήρια *B. cereus*, *Micrococcus fluuus* και *Surcina lutea*. Διαπιστώθηκε ότι όλο το μέλι δεν είναι εξίσου αποτελεσματικό εναντίον όλων των μικροβίων όλη την ώρα. Ένας από τους οκτώ τύπους μελιού υπό έλεγχο, για παράδειγμα, δεν ανέστειλε τον *B. subtilis*. Δεκάδες είδη βακτηρίων έχει διαπιστωθεί ότι είναι ευαίσθητα στο μέλι σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων. Οι αντιβακτηριακοί παράγοντες του μελιού αναφέρονται επίσης ότι είναι αποτελεσματικοί έναντι πολλών ειδών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* και *Saccharomyces*. Η ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων από το έδαφος, τον αέρα και το νερό της βρύσης έχει αποφευχθεί με διαλύματα που περιέχουν μόλις 25% μέλι, ενώ τα διαλύματα που περιέχουν μόλις 20% μέλι παρεμπόδιζαν την αύξηση των ατμοσφαιρικών ρύπων.<sup>30</sup>

Πίνακας 3: Παράγοντες που συνεισφέρουν στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού<sup>30</sup>

<b>Υψηλή ωσμωτική πίεση</b>
<b>Χαμηλή ενεργότητα ύδατος aw</b>
<b>Χαμηλή οξύτητα (χαμηλό pH) –όξινο περιβάλλον</b>
<b>Χαμηλή πρωτεϊνική περιεκτικότητα</b>
<b>Σύστημα οξειδάσης της γλυκόζης – σχηματισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου</b>
<b>Υψηλή αναλογία άνθρακα προς άζωτο</b>
<b>Χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh) - λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε αναγωγικά σάκχαρα</b>
<b>Ιξώδες αντίκειται στα ρεύματα μεταφοράς και τα όρια διαλυμένου οξυγόνου</b>
<b>Χημικοί Παράγοντες: Πινοσεμπρίνη, Λυσοζύμη, Φαινολικά οξέα, Τερπένια, Βενζυλική αλκοόλη, Πτητικές ουσίες (ίσως φυτοχημικά που επηρεάζονται από τα ένζυμα των μελισσών)</b>

#### 4.6 Αντιοξειδωτική δράση

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξαν πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την αντιοξειδωτική ικανότητας <sup>31</sup> του μελιού. Το μέλι μπορεί να αποτρέψει τις αντιδράσεις οξείδωσης σε τρόφιμα, όπως την οξείδωση λιπιδίων στο κρέας και την ενζυμική αμαύρωση φρούτων και λαχανικών. Το μέλι έχει ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως φυσικό αντιοξειδωτικό τροφίμων. Επίσης, αποδείχθηκε ότι το μέλι έχει παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με πολλά φρούτα και λαχανικά νωπού βάρους, λόγω της υψηλής Ικανότητας Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου (ORAC). Η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού, ωστόσο, ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το φυτική πηγή του μελιού.

Μια μεγάλη ποικιλία μικροθρεπτικών συστατικών υπάρχει στο μέλι, πολλά από τα οποία εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα συστατικά αυτά είναι φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, ορισμένα ένζυμα (οξειδάση γλυκόζης, καταλάση), το ασκορβικό οξύ, καροτενοειδή, οργανικά οξέα, προϊόντα

αντίδρασης Maillard, αμινοξέα και πρωτεΐνες. Η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα οφείλεται στη συνεργιστική δράση όλων των παραπάνω συστατικών του μελιού. Τέλος, στα μέλια ανθέων η αντιοξειδωτική δράση του μελιού δεν είναι ίδια με εκείνη του φυτού, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν για παράδειγμα πως η υψηλή ποσότητα φλαβονοειδών όπου περιέχει το φυτό του φαγόπυρου δεν εμφανίζεται και στο μέλι από φαγόπυρο. Το φαινολικό προφίλ διαφέρει στο φυτό, στο νέκταρ και τελικά στο μέλι.



## 5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΛΑΣΕΣ

### 5.1 Τι είναι οι μελάσες;

Τα μη επεξεργασμένα γλυκαντικά περιλαμβάνουν όλα τα φυσικά, μη επεξεργασμένα ή χαμηλής επεξεργασίας γλυκαντικά. Τα γλυκαντικά συνήθως παρασκευάζονται με φρούτα ή το χυμό των φυτών. Μπορούν όμως να παραχθούν από ολόκληρο το φυτό ή από οποιοδήποτε μέρος του, ενώ μερικά παράγονται επίσης από το άμυλο με τη χρήση ενζύμων. Τα γλυκαντικά που παρασκευάζονται από ζώα, ειδικά έντομα, ανήκουν σε ειδική κατηγορία καθώς μπορούν να προέρχονται από περισσότερα από ένα μέρη των φυτών.<sup>33</sup> Οι μελάσες ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών γλυκαντικών που προέρχονται από χυμό φυτών, από τα ζαχαρότευτλα ή από χυμό φρούτων όπως του χαρουπιού και των σταφυλιών.

Η ετυμολογία της λέξης μελάσα προέρχεται ξεκάθαρα από Ρωμαϊκές γλώσσες. Στα ιταλικά είναι *melassa*, στα γαλλικά *la mélasse* δηλαδή σιρόπι ή μέλι ζάχαρης. Επίσης, κάποιοι υποστηρίζουν πως προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη μέλι.

Ο όρος «μελάσα» αναφέρεται στο τελικό προϊόν που λαμβάνεται από την επαναλαμβανόμενη κρυστάλλωση της ζάχαρης. Η ποσότητα μελάσας που λαμβάνεται από τη διαδικασία κρυστάλλωσης αλλά και η ποιότητά της (σύνθεση) παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση των τεύτλων (τοπικές συνθήκες ανάπτυξης και επιπτώσεις των καιρικών συνθηκών) καθώς και την επεξεργασία της στο εργοστάσιο παραγωγής ζάχαρης όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της διαύγασης του χυμού, η μέθοδος της κρυστάλλωσης κατά τη διάρκεια του βρασμού και τον διαχωρισμό των κρυστάλλων ζάχαρης από το χαμηλής ποιότητας σιρόπι που παράγεται.<sup>32</sup>

### 5.2 Σύσταση μελασών

Κύρια συστατικά των μελασών είναι νερό, ζάχαρη, μη αμυλούχες ενώσεις και δευτερεύοντα συστατικά ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και αυξητικές ουσίες.<sup>32</sup>

Η μελάσα που παραλαμβάνεται μετά την επεξεργασία των ζαχαρότευτλων περιέχει περίπου 60% ζαχαρόζη και 40% άλλα συστατικά (και τα δύο επί ξηρού). Οι μη ζαχαρούχες ενώσεις, εκφρασμένες ως ποσοστιαίο βάρος της

μελάσας, συμπεριλαμβάνουν: 10% ανόργανα άλατα, ιδίως άλατα καλίου, περίπου 1-2% ραφινόζη, τον τριζαχαρίτη κεστόζη που παράγεται κατά την επεξεργασία, οργανικά οξέα (μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και βαλερικό) και αζωτούχες ενώσεις (π.χ. αμινοξέα, βεταΐνη). Τα κύρια αμινοξέα της μελάσας είναι το γλουταμινικό οξύ και το παράγωγο του, καρβοξυλικό οξύ της πυρρολιδόνης.

Η μελάσα χρησιμοποιείται στην παρασκευή ζύμης αρτοποιίας, στις τεχνολογίες ζύμωσης για την Παρασκευή αιθανόλης, κιτρικού, γαλακτικού και γλυκονικού οξέος, όπως και γλυκερόλης, βουτανόλης και ακετόνης. Επίσης, χρησιμοποιείται ως συστατικό σε ζωοτροφές ή στην παραγωγή αμινοξέων.<sup>28</sup>

### **5.3 Μελάσες από σταφύλι**

Ο χυμός σταφυλιών συμπυκνώνεται (μέχρι 70-80% της διαλυτής ξηράς ύλης) για να ληφθούν μελάσες (Bozkurt et al., 1999). Το πετιμέζι αποτελεί σημαντικό τρόφιμο στην ανθρώπινη διατροφή, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας, των μελασών, σε μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, μέταλλα και οργανικά οξέα (Dogan 2007).<sup>34</sup>

#### **5.3.1 Γλεύκος (Μούστος)**

Το γλεύκος ή μούστος προκύπτει από τη σύνθλιψη των στέμφυλων, ένα υγρό πλούσιο σε σάκχαρα, φτωχό σε αρώματα και μονότονο σε γεύση, που μετατρέπεται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης σε κρασί, ένα προϊόν πλούσιο σε αρώματα και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά με σπουδαίο οργανοληπτικό ενδιαφέρον. Παίρνει το χρώμα του από τις χρωστικές ουσίες του φλοιού των σταφυλιών, οπότε μπορεί να είναι λευκός έως ερυθρός, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, όπως του κρασιού ή οίνου μετά από αλκοολική ζύμωση, καθώς και παραδοσιακών προϊόντων όπως το πετιμέζι.<sup>36</sup>

#### **5.3.2 Πετιμέζι**

Το πετιμέζι είναι γλεύκος (*Vitis vinifera*), το οποίο συμπυκνώνεται με βρασμό, αφού πρώτα εξουδετερωθούν τα οξέα με στάχτη, σόδα ή σκόνη μαρμάρου. Η λέξη προέρχεται από το τούρκικο «πεκιμέζ» αλλά το προϊόν ήταν γνωστό στους αρχαίους Έλληνες, οι οποίοι το ονόμαζαν «έψημα» ή «σίραιον». Η γεύση του δεν είναι μόνο γλυκιά, αλλά πολύ πιο σύνθετη, με ελαφρά πικρό



υπόβαθρο ενώ το χρώμα του ποικίλλει από το ανοιχτό μέχρι το βαθύ καστανό. Χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της ζάχαρης ή του μελιού στην κατασκευή γλυκισμάτων ή για συντήρηση φρούτων μέσα σε αυτό αφού πρώτα έχουν υποστεί βρασμό.<sup>35</sup> Ανάλογα με τον χρόνο βρασίματος παράγεται πετιμέζι σε διάφορες πυκνότητες.

Το πετιμέζι είναι γνωστό και ως σταφυλομέλι. Η παραγωγή του επιτυγχάνεται με την αφαίρεση νερού από το γλεύκος. Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση του γλεύκους και συμπύκνωσης αυτού, όπου το ποσοστό νερού μειώνεται και αυξάνεται το ποσοστό σακχάρων, οξέων, τανινών και των υπολοίπων συστατικών του γλεύκους. Η διαδικασία επιτυγχάνεται είτε με βρασμό είτε με συμπύκνωση με ψύξη του μούστου. Η διατροφική του αξία είναι υψηλή αφού είναι πλούσιο σε βιταμίνες Β, σίδηρο, ασβέστιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, φώσφορο, κάλιο και χαλκό. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας υδατανθράκων σε μορφή κυρίως γλυκόζης και φρουκτόζης, αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η παρουσία της ρεσβερατρόλης στο πετιμέζι προσδίδει, επίσης, αντιοξειδωτική αλλά και αντικαρκινική δράση. Περιέχει ανά 100g προϊόντος: Ενέργεια 33kcal, Υδατάνθρακες 80,9g, Λιπαρά 0,4g, Πρωτεΐνες 0,9g, Ασβέστιο 74mg. Τέλος, το πετιμέζι συγκεντρώνει τα περισσότερα θεραπευτικά συστατικά του σταφυλιού.<sup>36</sup>

#### **5.4 Αντιμικροβιακή δράση**

Το μέλι και τα ζαχαρώδη προϊόντα έχουν χαμηλή ενεργότητα νερού και έτσι δεν προσβάλλονται από βακτήρια. Οι άσχημες όμως συνθήκες αποθήκευσης αυξάνουν την ενεργότητα ύδατος και την υγρασία των ζαχαρωδών προϊόντων με αποτέλεσμα να δημιουργούν ευνοϊκό περιβάλλον για να προσβληθούν από βακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ζυμώσεις.

Ωστόσο, οι μύκητες και οι ζυμομύκητες είναι οι υπεύθυνοι της αλλοίωσης αυτών των τροφίμων, κυρίως οι ωσμόφιλοι ζυμομύκητες που προτιμούν τρόφιμα πλούσια σε σάκχαρα όπως διάφορα γλυκίσματα. Οι μύκητες που θα αναπτυχθούν πιθανόν εκτός από εμφανή μούχλα μπορεί να βιοσυνθέσουν και μυκοτοξίνες. Οι ωσμόφιλοι ζυμομύκητες θα προκαλέσουν αλλοιώσεις σε σακχαρώδη προϊόντα σχηματίζοντας αιθυλική αλκόολη και διοξείδιο του άνθρακα (αλκοολική ζύμωση).<sup>20</sup>

Έχουν πραγματοποιηθεί από παλαιότερα (Kundu et al.1984) έρευνες σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος με τη χρήση ελεύθερων κυττάρων *Aspergillus niger* σε υπόστρωμα μελάσας ζαχαρότευτλων και ζαχαροκάλαμου. Σε σχετική έρευνα από το Roukas (1991) ο οποίος παρήγαγε κιτρικό οξύ από υπόστρωμα μελάσας ζαχαρότευτλων με τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων του είδους *Aspergillus niger*, πέτυχε απόδοση 35g κιτρικού οξέος ανά λίτρο υποστρώματος μετά από διάρκεια ζύμωσης 28 ημερών.<sup>9</sup>

### 5.5 Αντιοξειδωτική δράση

Τα στέμφυλα είναι πλούσια σε πολυφαινολικά συστατικά και οι συνολικές περιεκτικότητες σε φαινόλη των σπόρων εξαρτώνται από την ποικιλία των σταφυλιών. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του φαινολικού προφίλ στα στέμφυλα οίνου και πετιμεζιού έδειξε πως τα στέμφυλα από την παραγωγή σταφυλόμελου έδειξαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για οινοποίηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην πολυπλοκότητα της διαδικασίας οινοποίησης σε σχέση με την απλή διαδικασία παρασκευής πετιμεζιού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το σύνολο φαινολών και φλαβονοειδών που περιέχονται στα στέμφυλα αρχικά είναι καλοί δείκτες για τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των προϊόντων τους.<sup>37</sup>

Επίσης, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη η μελάσα αποτελεί μια ενδιαφέρουσα και πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών που είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες, ως υποπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο. Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, των μελασών, περιλαμβάνουν την προστατευτική επίδραση ενάντια στην οξειδωτική βλάβη του DNA - εκτός από τη ριζική ικανότητα απομάκρυνσης, η οποία μπορεί να αποδοθεί τουλάχιστον εν μέρει από τα συριγγικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκού οξύ, βανιλλικό οξύ, p-υδροξυβενζαλδεύδη και φερουλικό οξύ.<sup>38</sup>

## 6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

### 6.1 Γενικά

Αιθέριο έλαιο ορίζεται ως το πτητικό αρωματικό συμπύκνωμα ελαίου από κάποιο φυτό και αποτελείται από διαφορετικών ειδών χημικές ενώσεις. Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται ως οι καθαρότερες και πιο υποκειμενικές μορφές εκχυλίσματος, κυρίως των φυτών.

*“ Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές χημικές ενώσεις σε υγρή μορφή, με ελαιώδη εμφάνιση, και χημική σύσταση διάφορη κάθε φορά. Δεδομένου ότι είναι πτητικές, τα μόρια τους εξατμίζονται εύκολα και διασκορπιζόμενα στην ατμόσφαιρα, έρχονται σε επαφή με τα όργανα όσφρησης, τα οποία και διεγείρουν. Προκαλούν έτσι, μία συνήθως ευχάριστη αίσθηση, χαρακτηριστική για κάθε είδος φυτού, που αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό για το κάθε είδος άρωμα”.*<sup>39</sup>

Τα αιθέρια έλαια προέρχονται από διάφορα μέρη των φυτών, όπως τα φύλλα, οι ρίζες, οι μίσχοι και το λουλούδι ή ο καρπός. Από τα φυτά παράγονται συνήθως για άμυνα ή ως τμήμα των δευτερογενών μεταβολικών τους διαδικασιών.<sup>40</sup> Παραλαμβάνονται με φυσικές μεθόδους με πιο συνηθισμένη μέθοδο την απόσταξη με υδρατμούς. Ορισμένα είδη όπως τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών μπορούν να παραληφθούν και με έκθλιψη.<sup>17</sup>

Έχουν πολύ μεγάλη εμπορική αξία λόγω των ιδιοτήτων τους. Χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, την αρωματοποιία αλλά και στη φαρμακευτική βιομηχανία.

### 6.2 Σύσταση αιθέριων ελαίων

Είναι σύνθετα μίγματα πτητικών ενώσεων όπως τερπένια, φαινολικά και αλκοόλες.<sup>47</sup> Τα τερπένια είναι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες που οξειδώνονται σχετικώς εύκολα και υποβιβάζουν την ποιότητα της αρωματικής ουσίας. Ωστόσο, τα αιθέρια έλαια είναι εξαιρετικά πολύπλοκα και μπορεί να περιλαμβάνουν οξυγονούχες ενώσεις. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τεχνικές απομάκρυνσης τους που λέγονται αποτερπενώσεις. Τα τερπένια χημικώς είναι ισοπρενοειδή.<sup>17</sup>

Είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και δεν έχουν καμία σχέση με τα λίπη και τα έλαια. Διαφέρουν ως προς αυτές τις ομάδες τόσο στις φυσικές όσο

και στις χημικές τους ιδιότητες. Μικρές μεταβολές στη χημική σύσταση τέτοιων ενώσεων προκαλούν σημαντικές διαφορές στο άρωμα. Για παράδειγμα, η αφαίρεση δύο υδρογόνων από τη γερανιόλη σχηματίζει τη κιτράλη και κατά συνέπεια μετατρέπει το άρωμα από τριαντάφυλλου σε λεμονιού.<sup>17</sup>

Το αιθέριο έλαιο αποκαλείται έτσι επειδή πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει την πεμπτούσια της οσμής και της γεύσης από το βασίλειο λουλουδιών - διαφέρουν στις ιδιότητες σύνθεσης από λιπαρά ή σταθερά έλαια, τα οποία αποτελούνται κατά το πλείστον από γλυκερίδια και από ορυκτά ή υδρογονανθρακικά έλαια. Ένας επιστημονικός ορισμός του όρου βασικά ή πτητικά έλαια δεν είναι δυνατός, αν και υπάρχουν αρκετοί πρακτικοί ορισμοί. Ο πιο συνηθισμένος ορίζει ένα αιθέριο έλαιο ως ένα περισσότερο ή λιγότερο πτητικό υλικό που απομονώνεται από ένα οσμηρό φυτό ενός βοτανικού είδους με μια φυσική διαδικασία. Είναι οξυγονούχα παράγωγα τερπενίων υδρογονανθράκων όπως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, φαινόλες, οξέα, αιθέρες και εστέρες.<sup>42</sup>

### **6.3 Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων**

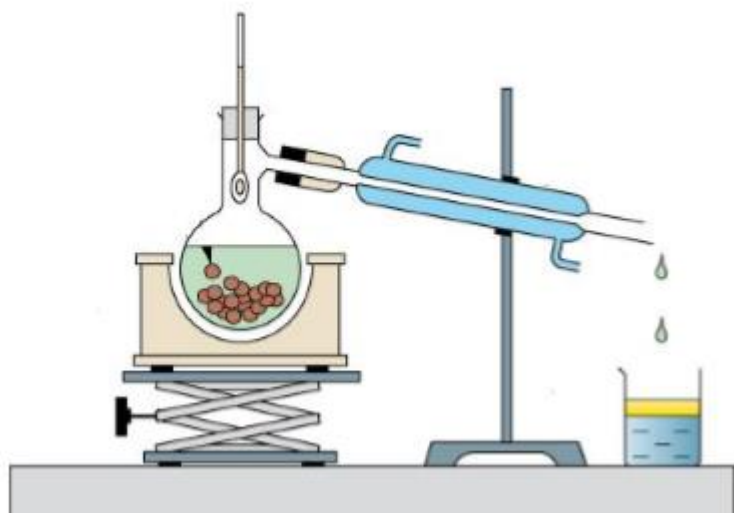
Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται σε μεγάλη ποικιλία καταναλωτικών αγαθών, όπως στα απορρυπαντικά, τα σαπούνια, προϊόντα καλλωπισμού, τα καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, αρώματα, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, αναψυκτικά, αποσταγμένα αλκοολούχα ποτά και εντομοκτόνα. Έτσι, η παγκόσμια παραγωγή και κατανάλωση αιθέριων ελαίων και αρωμάτων αυξάνεται με γοργούς ρυθμούς με αποτέλεσμα η τεχνολογία παραγωγής να αποτελεί βασικό στοιχείο για τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης και της ποιότητας του αιθέριου ελαίου.

Τα αιθέρια έλαια λαμβάνονται από φυτικές πρώτες ύλες με διάφορες παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης.<sup>43</sup>

#### **Υδροαπόσταξη:**

Η υδροαπόσταξη είναι μια παραδοσιακή μέθοδος για την απομάκρυνση των αιθέριων ελαίων. Μαζί με την απόσταξη μεθ'υδρατμών είναι οι πιο διαδεδομένες και ευκολότερες μέθοδοι.<sup>48</sup> Η υδροαπόσταξη (HD) είναι η συμβατικότερη μέθοδος απομόνωσης αιθερίων ελαίων κατά την οποία τα αιθέρια έλαια εξατμίζονται με θέρμανση ενός μίγματος νερού ή άλλου διαλύτη και φυτικών υλικών ακολουθούμενα από την υγροποίηση των ατμών σε

συμπυκνωτή. Στην υδροαπόσταξη, το προς απόσταξη φυτικό υλικό, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό σε άμεση επαφή, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Στη διάταξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαχωριστής με σκοπό να συλληχθεί το συμπύκνωμα και έτσι να διαχωριστούν τελικά τα αιθέρια έλαια από το νερό.



*Εικόνα 10: Διάταξη συσκευής υδροαπόσταξης*

Η υδροαπόσταξη είναι μια διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλες ή μικρές βιομηχανίες. Ο χρόνος απόσταξης εξαρτάται από το σημείο ζέσεως του προς επεξεργασία φυτικού υλικού. Η παρατεταμένη απόσταξη παράγει μικρή ποσότητα αιθέριου ελαίου, παράγει όμως και ανεπιθύμητες ενώσεις υψηλού σημείου ζέσεως καθώς και προϊόντα οξείδωσης. Υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, οδηγεί σε θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθέριου ελαίου. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι: ο μεγάλος χρόνος παραλαβής, η μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο και η παραλαβή κατώτερης ποιότητας αιθέριου ελαίου.

### **Απόσταξη μεθ' υδρατμών<sup>49</sup>**

Η απόσταξη με ατμό είναι ένας τύπος απόσταξης για ευαίσθητα στην αύξηση της θερμοκρασίας φυτά. Η απόσταξη με υδρατμούς είναι μία από τις αρχαιότερες αλλά και επίσημες εγκεκριμένες μεθόδους απομόνωσης αιθέριων ελαίων από φυτικά υλικά.

Η απόσταξη με υδρατμούς είναι μια εναλλακτική μέθοδος διαχωρισμού μιγμάτων οργανικών ενώσεων αδιάλυτων ή ελάχιστα διαλυτών στο νερό. Κατά τη μέθοδο αυτή, όταν συντρέχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις, είτε

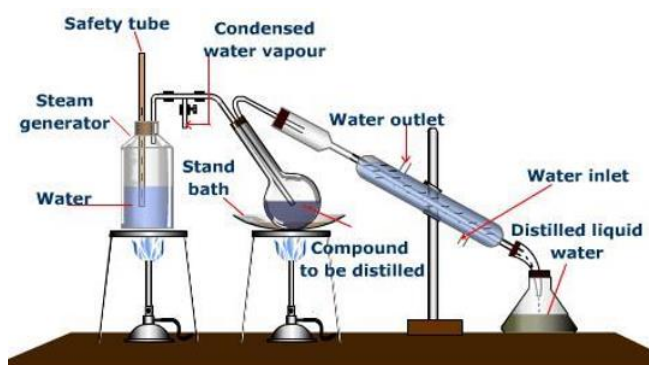
διαβιβάζεται υδρατμός στο μίγμα των οργανικών ενώσεων με νερό, είτε το μίγμα με το υπάρχον νερό θερμαίνεται, οπότε τα πτητικά με υδρατμούς συστατικά του συναποστάζουν με τους υδρατμούς και μεταφέρονται στο απόσταγμα. Με τον τρόπο αυτό απαλλάσσονται από τις μη πτητικές με υδρατμούς προσμείξεις τους. Για να έχει πρακτική σημασία η απόσταξη με υδρατμούς πρέπει οι ουσίες που συναποστάζουν με το νερό να είναι αδιάλυτες σ' αυτό, να μην αλλοιώνονται κατά τη στενή επαφή τους με το θερμό νερό και να έχουν μια ικανοποιητική **τάση ατμών** (τουλάχιστον 4 mm Hg) στη θερμοκρασία γύρω από τους 100°C. Η πίεση που ασκείται στην επιφάνεια του υγρού από τα μόρια που βρίσκονται στην αέριο κατάσταση, λέγεται τάση ατμών και είναι μια χαρακτηριστική φυσική σταθερά του υγρού, στη δεδομένη θερμοκρασία. Η τάση ατμών των υγρών αυξάνεται πάντα αυξανόμενης της θερμοκρασίας και όταν γίνει ίση με την εξωτερική πίεση το υγρό βράζει.

Στη απόσταξη με υδρατμούς, ο ατμός λειτουργεί ως παράγοντας που διασπάζει τους πόρους της πρώτης ύλης και έτσι απελευθερώνεται το αιθέριο έλαιο από αυτό. Το σύστημα αποδίδει ένα μίγμα από ατμό και επιθυμητό αιθέριο έλαιο. Αυτός ο ατμός στη συνέχεια συμπυκνώνεται περαιτέρω και συλλέγεται το αιθέριο έλαιο.

Η αρχή αυτής της τεχνικής είναι ότι η συνδυασμένη πίεση ατμού ισούται με την πίεση του περιβάλλοντος σε περίπου 100°C έτσι ώστε τα πτητικά συστατικά με σημεία ζέσεως που κυμαίνονται από 150 έως 300°C να μπορούν να εξατμιστούν σε θερμοκρασία κοντά σε εκείνη του ύδατος. Το γεγονός ότι η απόσταξη γίνεται σε θερμοκρασία μικρότερη από 100 °C, επιτρέπει σε πολλές περιπτώσεις να αποσταχθούν ουσίες οι οποίες αποσυντίθενται αν θερμανθούν στο σημείο ζέσης τους. Επιπλέον, αυτή η τεχνική μπορεί επίσης να διεξαχθεί υπό πίεση, ανάλογα με τη δυσκολία της απομόνωσης των αιθέριων ελαίων.

Στη παρακάτω εικόνα φαίνεται η διάταξη της συσκευής. Στην απόσταξη με υδρατμούς εισάγεται ατμός, ο οποίος παράγεται στον ειδικό ατμολέβητα, ο οποίος επικοινωνεί με φιάλη που περιέχει το φυτικό υλικό και ο ατμός παρασύρει το αιθέριο έλαιο. Η συσκευή αποτελείται από τον ατμολέβητα, έναν ψυκτήρα και δύο φιάλες, μια σφαιρική και μια απιοειδή. Το δείγμα τοποθετείται μαζί με νερό (σε αναλογία 1/10) στη σφαιρική φιάλη και θερμαίνεται και το νερό στην απιοειδή. Οι σχηματιζόμενοι ατμοί από την σφαιρική φιάλη, που περιέχουν τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου, φθάνουν στο ψυκτήρα,

υγροποιούνται, ο ατμός συμπυκνώνεται και στο το τέλος της διαδικασίας (μετά από 1 ώρα τουλάχιστον) όλα τα συστατικά του αιθέριου ελαίου έχουν συγκεντρωθεί στην απιοειδή φιάλη μαζί με νερό.



Εικόνα 11: Διάταξη συσκευής απόσταξης μεθ'υδρατμών

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

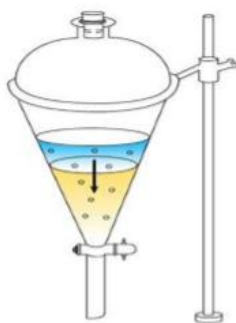
- Δίνει αιθέριο έλαιο καλύτερης ποιότητας
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επεξεργασία μεγάλου όγκου φυτικού υλικού
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα είδη φυτικού υλικού, εκτός από τα άνθη και τα κονιορτοποιημένα υλικά.

### **Εκχύλιση με διαλύτη**

Η εκχύλιση με διαλύτη, επίσης γνωστή ως εκχύλιση ή διαχωρισμός υγρού-υγρού, είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μιας ένωσης με βάση τη διαλυτότητα των τμημάτων της. Στη μέθοδο της εκχύλισης μία μονάδα φυτού, νερού φορτώνεται στη συσκευή με επανειλημμένα "πλυσίματα" με διαλύτη. Η εκχύλιση με διαλύτες χρησιμοποιείται στην επεξεργασία αρωμάτων, φυτικών ελαίων ή βιοντίζελ. Η εκχύλιση με διαλύτη χρησιμοποιείται σε ευαίσθητα φυτά για την παραγωγή υψηλότερων ποσοτήτων αιθέριων ελαίων με χαμηλότερο κόστος.<sup>50</sup>

Είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων στην ανάλυση φυτικών υλικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ απλά σε ένα μαγειρικό εργαστήριο χρησιμοποιώντας τον κατάλληλης ποιότητας διαλύτη (food grade). Η ποιότητα και η ποσότητα του εκχυλισμένου μίγματος προσδιορίζονται από την επιπλέον θερμότητα που εφαρμόζεται λόγω της περιορισμένης διαλυτότητας των ενώσεων σε διαλύτη. Παρόλο που η μέθοδος είναι σχετικά απλή και αρκετά αποδοτική, έχει αρκετά μειονεκτήματα όπως ο

μακρύς χρόνος εκχύλισης, η σχετικά υψηλή κατανάλωση διαλύτη και η συχνά μη ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα.<sup>51</sup>



Εικόνα 12: Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη

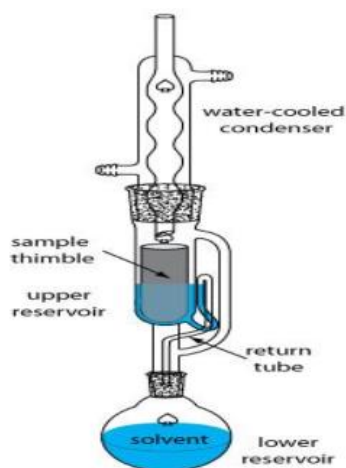
### **Εκχύλιση Soxhlet**<sup>52</sup>

Ο Soxhlet extractor αποτελεί διάταξη εργαστηριακής συσκευής που εφευρέθηκε το 1879 από τον Franz von Soxhlet. (Soxhlet et al., 1879) Αρχικά σχεδιάστηκε για την εκχύλιση ενός λιπιδίου από ένα στερεό υλικό. Τυπικά η εκχύλιση Soxhlet χρησιμοποιείται όταν η επιθυμητή ένωση ή μίγμα ουσιών έχει περιορισμένη διαλυτότητα σε ένα διαλύτη και οι ανεπιθύμητες ενώσεις (ακαθαρσία) είναι αδιάλυτη σε αυτόν τον διαλύτη.

Η εκχύλιση Soxhlet περιλαμβάνει επαφή στερεού-υγρού για την απομάκρυνση μιας ή περισσότερων ενώσεων από ένα στερεό με επαναδιάλυση στην υγρή φάση με αναρροή.

Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε υποδοχέα στην κοιλότητα της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό γυάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν επί του στερεού μίγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη μέχρι του ύψους του κεκκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός και ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη με τα διαλυτά συστατικά του στερεού μίγματος.





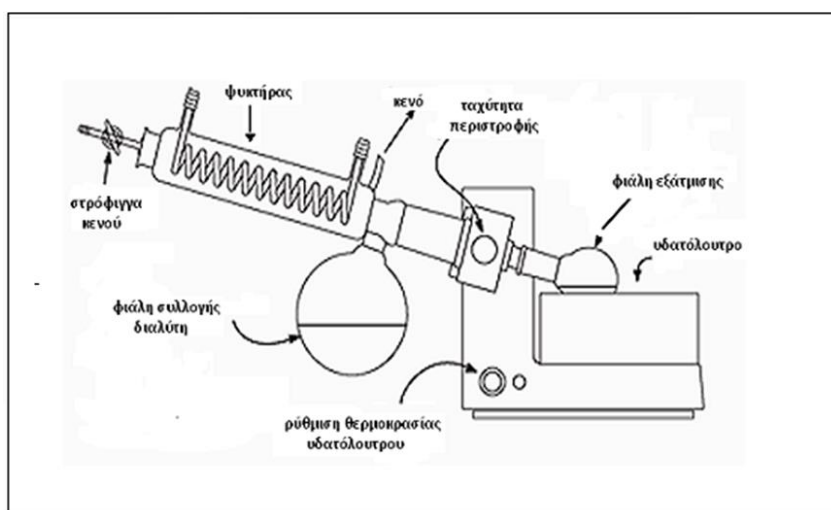
Εικόνα 13: Συσκευή Soxhlet

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου επιτευχθεί σχεδόν πλήρης εκχύλιση. Η εκχύλιση Soxhlet έχει όμως και αρκετά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένου του ότι απαιτεί αρκετές ώρες ή ημέρες για να εκτελέσει. Το δείγμα αραιώνεται σε μεγάλους όγκους διαλύτη και λόγω της θέρμανσης της φιάλης απόσταξης, παρατηρούνται απώλειες λόγω θερμικής αποικοδόμησης και πτητικότητας.<sup>53</sup>

Για την παραλαβή του καθαρού αιθέριου ελαίου από τις παραπάνω μεθόδους απαιτείται απομάκρυνση του διαλύτη που συνήθως πραγματοποιείται με χρήση **περιστρεφόμενου εξατμιστή (rotary evaporator)**.

Η συσκευή αποτελείται από ένα ηλεκτρικό κινητήρα με ρυθμιζόμενη ταχύτητα περιστροφής, στηριγμένο σε μεταλλικό στήριγμα, που φέρει γυάλινο σωλήνα σε γωνία 45° ως προς το επίπεδο εργασίας με εσμύρισμα για την εφαρμογή της φιάλης απόσταξης (σφαιρική ή απιοειδής). Το άλλο άκρο του σωλήνα συνδέεται μέσω εξωτερικού τοιχώματος ενός ψυκτήρα με σύστημα δημιουργίας ελαττωμένης πίεσης (υδραντλία, αντλία κενού κ.λπ.) και περιβάλλεται από τον εσωτερικό ελικοειδή σωλήνα του ψυκτήρα στο οποίο κυκλοφορεί νερό. Οι ατμοί που συμπυκνώνονται συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη συνδεδεμένη με το εξωτερικό τοίχωμα του ψυκτήρα διαμέσου ημισφαιρικής γυάλινης εσμυρισμένης σύνδεσης με τη βοήθεια σφιγκτήρα. Ο ψυκτήρας συνδέεται ερμητικά με το γυάλινο στέλεχος του κινητήρα έτσι ώστε να διατηρείται το κενό και να επιτρέπεται η περιστροφή του γυάλινου σωλήνα που φέρει τη φιάλη απόσταξης. Στο άλλο άκρο του ψυκτήρα απέναντι από το σημείο της σύνδεσης, υπάρχει εσμυρισμένη στρόφιγγα με οπή για την

αποκατάσταση της πίεσης στο σύστημα μέσω δύο οπών στο εσφυρισμένο τοίχωμα του ψυκτήρα. Η φιάλη της απόσταξης γεμίζεται μέχρι τη μέση το πολύ με διαλύτη, βυθίζεται σε θερμαινόμενο υδρόλουτρο, ενώ συγχρόνως περιστρέφεται με ταυτόχρονη εφαρμογή κενού από αντλία. Ο διαλύτης εξατμίζεται συλλεγόμενος στη φιάλη συλλογής με ψύξη των ατμών του από τον ελικοειδή ψυκτήρα. Για τη λειτουργία του εξατμιστή αρχικά ανοίγεται η αντλία, τοποθετείται η φιάλη απόσταξης με το διαλύτη στον εσφυρισμένο σωλήνα, σφίγγεται με το σφιγκτήρα, κλείνεται η στρόφιγγα για την εφαρμογή της ελαττωμένης πίεσης στο σύστημα, αρχίζει η περιστροφή της φιάλης η οποία βυθίζεται στο υδρόλουτρο. Μετά το τέλος της απόσταξης το υδρόλουτρο απομακρύνεται, σταματά η περιστροφή και αποκαθίσταται η ατμοσφαιρική πίεση.



Εικόνα 14: Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας

### **Σύγχρονες (μη παραδοσιακές) μέθοδοι εκχύλισης αιθέριων ελαίων**

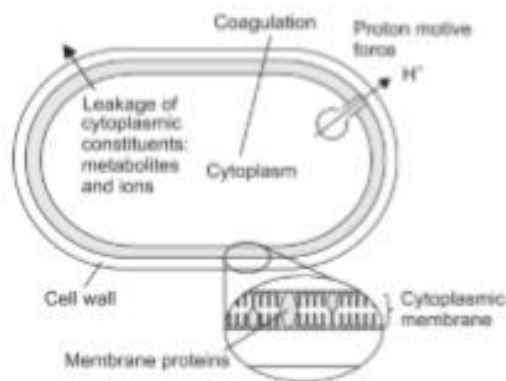
Οι παραδοσιακές μέθοδοι απομόνωσης των αιθερίων ελαίων έχουν συζητηθεί παραπάνω και αυτές είναι οι μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρύτερα σε εμπορική κλίμακα. Ωστόσο, με την τεχνολογική πρόοδο, έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές οι οποίες δεν είναι απαραίτητως ευρέως χρησιμοποιούμενες για εμπορική χρήση αλλά θεωρούνται πολύτιμες σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως π.χ. για την παραγωγή δαπανηρών αιθερίων ελαίων χωρίς καμία μεταβολή των θερμοευαίσθητων συστατικών ή για την εκχύλιση αιθερίων ελαίων για μικροανάλυση. Αυτές οι τεχνικές είναι οι εξής:

- Εκχύλιση υπό κενό
- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME)
- Εκχύλιση φυτοσόλης (φυτόλης)
- Τεχνική πρωτοπλαστών
- Εκχύλιση ταυτόχρονης απόσταξης (SDE)
- Απόσταξη με μικροκύματα
- Ελεγχόμενη στιγμιαία αποδόμηση (CID)
- Θερμομικροαπόσταξη
- Μικροαπόσταξη
- Εκχύλιση με μεμβράνες

#### **6.4 Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση αιθέριων ελαίων**

Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα καταναλωτικών αγαθών όπως τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής, τα αναψυκτικά και τα απεσταγμένα αλκοολούχα ποτά. Εκτός από τη διαδεδομένη χρήση τους ως αρωματικού υλικού, χρησιμοποιούνται στους τομείς της διατροφής και της γεωργίας για τις αναφερόμενες αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιπυκτικές, εντομοκτόνες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Λόγω των παραπάνω δράσεων, χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ως αντιοξειδωτικά και συντηρητικά στα τρόφιμα, είτε ενσωματώνονται στο υλικό συσκευασίας τροφίμων, είτε ως φυτό και προστατευτικό σοδειάς. Πολλά αιθέρια έλαια έχουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, αλλά η εφαρμογή τους ως συντηρητικά τροφίμων απαιτεί καλή γνώση των ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένης της ευαισθησίας των μικροοργανισμών στόχων, η δράση τους, η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα και η επίδραση των συστατικών των τροφίμων στις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες.<sup>44</sup>

Οι κυριότεροι μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί με τη δράση των αιθέριων ελαίων είναι η αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, η φθορά και η καθίζηση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, η απώλεια του κυτταρικού περιεχομένου και η πήξη του κυτταροπλάσματος.<sup>45</sup>



**Εικόνα 15: Μηχανισμοί δράσης των αιθέριων ελαίων και πιθανές περιοχές του βακτηριακού κυττάρου που μπορούν να φθείρουν.**

Η έρευνα όπου πραγματοποιήθηκε από τον Farag και τους συνεργάτες του το 1989 σχετικά με την επίδραση των αιθέριων ελαίων μπαχαρικών στην ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και την έκκριση αφλατοξίνης βρέθηκε πως τα αιθέρια έλαια παρεμπόδισαν πλήρως την ανάπτυξη μυκήτων και τη σύνθεση από μέρους των αφλατοξινών. Χρησιμοποίησαν για την παρεμπόδιση των αφλατοξινογόνων μυκήτων, αιθέρια έλαια από θυμάρι, κύμινο, γαρίφαλο, αγριοκύμινο, δεντρολίβανο και φασκόμηλο. Η παρεμποδιστική ικανότητα των προαναφερθέντων αιθέριων ελαίων αξιολογήθηκε ως εξής:

Θυμάρι>κύμινο>γαρίφαλο>αγριοκύμινο>δεντρολίβανο>φασκόμηλο

Δραστικές ουσίες ήταν η θυμόλη, η κυμινική αλδεΐδη, η ευγενόλη και άλλες αρωματικές ενώσεις.<sup>9</sup>

Η παρουσία ορισμένων κυρίαρχων χημικών ομάδων καθορίζει τη βακτηριοστατική δραστηριότητα ενός αιθέριου ελαίου, αν και η συνεργιστική δράση μεταξύ των διαφόρων βιοχημικών μορίων είναι επίσης εξαιρετικά σημαντική. Ο προσδιορισμός της βακτηριοστατικής δραστηριότητας 13 αιθέριων ελαίων έναντι 65 βακτηριακών στελεχών ταξινομήθηκε αποτελεσματικά με βάση τη χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων: φαινόλες, αλδεΐδες και μονοτερπενόλες ακολουθούμενες από οξείδια και υδρογονάνθρακες. Η αποτελεσματική βακτηριοστατική τους δράση εντοπίστηκε έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, όπως έχουν δείξει πολλές έρευνες. Επιπλέον, αποδειχθεί πως η δραστηριότητα των αιθέριων

ελαίων ήταν ανεξάρτητη από το επίπεδο αντοχής στα αντιβιοτικά, όσον αφορά έναν αριθμό στελεχών εξαιρετικά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Αυτά τα αποτελέσματα περιγράφηκαν για διάφορα βακτήρια, όπως *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.* και *S. Pneumoniae*. Οι φαινόλες των αιθέριων ελαίων ρίγανης, ajowan, θυμαριού, γαρίφαλου και φύλλων κανέλας καθώς και οι αλδεΐδες αιθέριων ελαίων από φλοιό κανέλας και λεμονιού παρουσίασαν αξιοσημείωτη δραστικότητα έναντι 65 στελεχών βακτηρίων όπως *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* εκτός του *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>46</sup>

Άλλη έρευνα έδειξε πως η κραβακρόλη που υπάρχει στα αιθέρια έλαια ρίγανης και θυμαριού είναι μονο-τερπενοειδής φαινόλη η οποία διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες, να δράσει σε συγκεκριμένα μονοπάτια παρά τη μη συγκεκριμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, τροποποιεί γονίδια που εμπλέκονται στην εκροή φαρμάκων, στο μεταβολισμό, στην ανταπόκριση στο στρες και την αυτοφαγία σε ζύμες όπως *Saccharomyces. Cerevisiae*. Επίσης, η ευγενόλη είναι αλκόολη που εμπεριέχεται στο αιθέριο έλαιο γαρίφαλου προκαλεί καταστροφές και λύση των κυτάρων καθώς και ελάττωση της διαπερατότητας για τα ιόντα  $Ca^{2+}$  σε ζύμες όπως *Aspergillus niger*, *Candida Albicans* και *Saccharomyces. Cerevisiae*.<sup>54</sup>

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες παίζουν επίσης πρωταρχικό ρόλο σε ορισμένες βιολογικές δραστηριότητες των αιθέριων ελαίων, που αιτιολογείται με τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην παθολογία. Αυτά τα χαρακτηριστικά οφείλονται στη συνεργιστική ικανότητα ορισμένων από τα συστατικά τους, ιδιαίτερα φαινόλων, οι οποίες είναι ικανές να σταματήσουν ή να καθυστερήσουν την αερόβια οξείδωση των οργανικών ουσιών, παρότι η διαδικασία με την οποία λαμβάνεται το έλαιο από την πρώτη ύλη (απόσταξη) περιορίζει την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, υπάρχουν στο τελικό εσμύρισμα αλλά μη πτητικές. Ωστόσο, υπάρχουν αιθέρια χωρίς φαινόλες που εκφράζουν αντιοξειδωτική συμπεριφορά. Αυτό οφείλεται στη ριζική χημεία ορισμένων τερπενοειδών και από άλλα πτητικά συστατικά (π.χ. το θείο συστατικό του σκόρδου).

Σύμφωνα με μελέτες τα φαινολικά συστατικά ιδιαίτερα του αιθέριου ελαίου ρίγανης και θυμαριού, θυμόλη, καρβακρόλη και ευγενόλη παρουσιάζουν

πλούσια αντιοξειδωτική δράση. Πιο συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο ρίγανης αποδείχθηκε επίσης ότι προστατεύει το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο από την οξείδωση κατά την αποθήκευση. Στην περίπτωση του χοιρινού και του βόειου κρέατος, φαίνεται ότι τα αιθέρια έλαια προστατεύουν τα τρόφιμα από την οξείδωση σχεδόν ανεξάρτητα από την άμεση (αλυσιδωτή) αντιοξειδωτική δράση. Για παράδειγμα, ο Fasseas και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι τα δείγματα κιμά προστατεύτηκαν από την αυτοοξείδωση, που εκτιμήθηκε με μέτρηση του σχηματισμού TBARS, παρουσία αιθέριου ελαίου ρίγανης και φασκόμηλου.<sup>55</sup>

## 6.5 Αρνητικές δράσεις αιθέριων ελαίων

Τα περισσότερα αιθέρια έλαια εφόσον χρησιμοποιούνται στις σωστές αναλογίες, είναι ακίνδυνα. Ωστόσο ορισμένα υποδεικνύουν μια αυξημένη τοξικότητα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση ορισμένων αιθέριων ελαίων κατά την παρουσία συγκεκριμένων παθήσεων.

Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα εμφάνισης τοξικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό:

- Τοξικά αιθέρια έλαια έχει βρεθεί πως είναι από φασκόμηλο, γλυκάνισο, κουρκουμά, μοσχοκάρυδο.
- Τα αιθέρια έλαια βασιλικού, λεμόνιου, λεμονόχορτου, μέντας, μελισσόχορτου, θυμαριού, δάφνης, κέδρου, κανέλας, κουρκουμά, μάραθου, σκόρδου, ρίγανης και το μαύρο πιπεριού σε μεγάλες ποσότητες προκαλούν δερματικούς ερεθισμούς.
- Έλαια που προκαλούν φωτοευαισθησία προέρχονται από αγγελική, περγαμόντο, κύμινο, λεμόνι, πορτοκάλι, νερολί, βερβένα, κιτρονέλα, λάιμ, λεμονόχορτο, μανταρίνι, μάραθος, πιπερόριζα, γκρέιπφρουτ, απήγανος, όλα τα κιτροειδή.
- Έλαια που πιθανόν να προκαλέσουν επιληψία: γάλβανος, μάραθος, ύσσωπος, φασκόμηλο, αρτεμισία, καμφορά, δεντρολίβανο
- Χρήση αιθέριων ελαίων μόνο κατόπιν εγκρίσεως του θεράποντα ιατρού στις περιπτώσεις εγκυμοσύνης και των καρδιαγγειακών παθήσεων.<sup>56</sup>

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## 7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 7.1 Παρασκευή προϊόντων

Για την παρασκευή πέντε διαφορετικών προϊόντων μελιού και σταφυλόμελου αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά πηκτικά μέσα, αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο, άγαρ, κόμμι ξανθάνης, ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού. Το μέλι που χρησιμοποιήθηκε είναι μέλι ανθέων. Για τη σωστή διεκπεραίωση των συνταγών τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (εύρος:0,01-500g) και τα τελικά προϊόντα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία για τη διεξαγωγή όλου του πειραματικού μέρους της έρευνας.

Για τη δημιουργία περλών μελιού και σταφυλόμελου με την προσθήκη αλγινικού νατρίου χρησιμοποιήθηκε πολυπιπέτα (Vaccu-Pette 96 Well Format Pipetting Device | SP Scienceware), για τη σφαιροποίηση με άγαρ χρησιμοποιήθηκε σήριγγα τροφίμου με παχύ στόμιο 50ml, ενώ η μορφοποίηση με την προσθήκη των υπολοίπων πηκτικών πραγματοποιήθηκε σε φόρμα σιλικόνης σχήματος ημισφαίριο. Οι τελικές ποσότητες πηκτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν στις συνταγές ήταν απόρροια πολλών και ποικίλων πειραμάτων. Στις παρακάτω υποενότητες παρατίθενται οι συνταγές για 500g προϊόντος και η διαδικασία παρασκευής τους.



Εικόνα 16: Ζυγός ακριβείας εύρους ζύγισης 0,01-500g και πολυπιπέτα

#### 7.1.1 Προσθήκη αλγινικού νατρίου και χλωριούχου ασβεστίου

##### Υλικά

Η συνταγή είναι η εξής: 275g μέλι ή σταφυλόμελο, 225ml απιονισμένου νερού (φιλτραρισμένο νερό που έχει απαλλαγεί από τα διαλυμένα θετικά και αρνητικά

ιόντα διαφόρων αλάτων) και 6,25g αλγινικού νατρίου. Για το λουτρό ασβεστίου χρησιμοποιήθηκε 500ml απιονισμένου νερού και 2,5g χλωριούχου ασβεστίου.

### **Εκτέλεση**

Σε ένα mini blender αναμιγνύεται αρχικά το νερό με το αλγινικό νάτριο μέχρι να διαλυθεί εντελώς το τελευταίο. Στη συνέχεια προστίθεται το μέλι ή το σταφυλόμελο και συνεχίζεται η ανάδευση για λίγα λεπτά μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Επειδή λόγω της ανάδευσης στην επιφάνεια έχουν δημιουργηθεί φυσαλίδες αέρα αφήνουμε το μίγμα να ξεκουραστεί στο ψυγείο για 12 ώρες. Μόλις οι φυσαλίδες εξαλειφθούν το βγάζουμε από το ψυγείο και το τοποθετούμε σε θερμοκρασία δωματίου. Μέχρι η θερμοκρασία του δείγματος να αυξηθεί προετοιμάζουμε σε ένα μπολ το λουτρό ασβεστίου διαλύοντας το χλωριούχο ασβέστιο στο νερό.

Η διαδικασία της σφαιροποίησης ξεκινάει αδειάζοντας στο πλατώ της πολυπιπέτας 75g μίγματος. Έχουμε ήδη τοποθετήσει το έμβολο της σύριγγας στα 5ml και την προσαρτούμε στη σωλήνα όπου είναι ενωμένη με την πολυπιπέτα. Τοποθετούμε την πολυπιπέτα/96 πάνω από τη βάση που περιέχει το μίγμα με το μέλι το νερό και το αλγινικό νάτριο. Ανεβάζουμε το έμβολο της σύριγγας στα 20ml ώστε να γίνει η προσρόφηση 150μL στην εκάστοτε πιπέτα (96 πιπέτες στην πολυπιπέτας). Έπειτα με αργή και σταθερή κίνηση αδειάζουμε σταδιακά τη σύριγγα με αποτέλεσμα να πέφτουν σταγονίδια μελιού ή σταφυλόμελου μέσα στο λουτρό χλωριούχου ασβεστίου ολοκληρώνοντας έτσι τη διαδικασία της σφαιροποίησης.

Με τη βοήθεια τρυπητής κουτάλας απομονώνουμε από το λουτρό τις πέρλες και τις βυθίζουμε εκ νέου σε ένα δοχείο με νερό για να απομακρύνουμε το χλωριούχο ασβέστιο. Τοποθετούμε τις πέρλες σε σκεύος με απορροφητικό χαρτί ώστε να απορροφήσει το νερό που έχει απομείνει στην επιφάνεια τους. Τέλος, το παραχθέν προϊόν “συσκευάζεται” σε αποστειρωμένο βάζο και διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης (0-6 °C).



Εικόνα 17: Πέρλες σταφυλόμελου και πέρλες μελιού

### 7.1.2 Προσθήκη άγαρ

#### Υλικά

Η συνταγή είναι η εξής: 312g μέλι ή σταφυλόμελο, 200mL απιονισμένο νερό, 5g άγαρ-άγαρ και 300ml ηλιέλαιο.

#### Εκτέλεση

Πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία έχουμε τοποθετήσει το ηλιέλαιο σε ένα γυάλινο δοχείο στο ψυγείο τουλάχιστον για 1 με 2 ώρες. Αρχικά, αναμιγνύουμε σε σκεύος το νερό, το μέλι ή σταφυλόμελο και το άγαρ μέχρι να διαλυθεί εντελώς με ένα αναδευτήρα χειρός. Συνεχίζουμε να ανακατεύουμε καθώς ζεσταίνουμε το μίγμα σε μέτρια φωτιά μέχρι να βράσει. Στις πρώτες φυσαλίδες που θα δημιουργηθούν λόγω του βρασμού απομακρύνουμε το σκεύος από τη φωτιά. Αφήνουμε το μίγμα να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει στους 100 °C ανακατεύοντας διαδοχικά.

Όταν το μίγμα έχει τη σωστή θερμοκρασία προσροφάμε σε αποστειρωμένη σύριγγα τρόφιμων με παχύ στόμιο μία μικρή ποσότητα μίγματος ίση με 10ml. Κατόπιν πιέζουμε ελαφρά το έμβολο και ρίχνουμε ανά περίπτωση 3 δευτερόλεπτα μικρές σταγόνες μέσα στο κρύο ηλιέλαιο. Αφότου ολοκληρωθεί η διαδικασία της σφαιροποίησης στραγγίζουμε το ηλιέλαιο απομονώνοντας τις πέρλες που έχουν δημιουργηθεί και τις τοποθετούμε σε ένα μπολ με νερό ώστε να φύγει εντελώς το λάδι που υπάρχει στην επιφάνεια.

Τέλος, μπορούμε να δοκιμάσουμε μία πέρλα για να βεβαιωθούμε ότι έχει απομακρυνθεί πλήρως το λάδι και τοποθετούμε τις πέρλες μέσω σουρωτής κουτάλας σε σκεύος με απορροφητικό χαρτί ώστε να απορροφήσει το νερό που έχει απομείνει. Τέλος, το παραχθέν προϊόν “συσκευάζεται” σε αποστειρωμένο βάζο και διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης (0-6 °C).

### **7.1.3 Προσθήκη κόμμεος ξανθάνης**

#### **Υλικά**

Η συνταγή είναι η εξής: 312g μέλι ή σταφυλόμελο, 200mL απιονισμένο νερό, 0,625g κόμμι ξανθάνης.

#### **Εκτέλεση**

Προσθέτουμε το νερό, το μέλι ή το σταφυλόμελο και το κόμμι ξανθάνης σε ένα σκεύος και ανακατεύουμε με αναδευτήρα χειρός μέχρι να διαλυθεί η σκόνη. Ζεσταίνουμε το μίγμα σε μέτρια φωτιά ανακατεύουμε μέχρι να διαλυθεί πλήρως το πηκτικό και να αρχίσει το προϊόν να γίνεται ημίρευστο. Αφήνουμε 5 – 10 λεπτά να κρυώσει.

Μοιράζουμε το μίγμα σε θήκη σιλικόνης 15 ημικυκλίων. Η χωρητικότητα κάθε θήκης είναι 30-35g. Αφήνουμε για 24 ώρες τη θήκη σε θερμοκρασία ψύξης 0-6°C ώστε να πήξει το προϊόν. Ελέγχουμε εάν έχει πήξει, ξεφορμάρουμε προσεχτικά και τοποθετούμε σε αποστειρωμένο βάζο. Αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία ψύξης.

### **7.1.4 Προσθήκη ζελατίνης**

#### **Υλικά**

Η συνταγή είναι η εξής: 312g μέλι ή σταφυλόμελο, 200mL απιονισμένο νερό, 15g ζελατίνη.

#### **Εκτέλεση**

Προσθέτουμε το νερό, το μέλι ή το σταφυλόμελο και τη ζελατίνη σε ένα σκεύος και ανακατεύουμε με αναδευτήρα χειρός μέχρι να διαλυθεί η σκόνη. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς ίδια με εκείνη του κόμμεος ξανθάνης.

### 7.1.5 Προσθήκη κόμμεος χαρουπιού

#### Υλικά

Η συνταγή είναι η εξής: 312g μέλι ή σταφυλόμελο, 200mL απιονισμένο νερό, 10g κόμμι χαρουπιού.

#### Εκτέλεση

Προσθέτουμε το νερό, το μέλι ή το σταφυλόμελο και το κόμμι χαρουπιού σε ένα σκεύος και ανακατεύουμε με αναδευτήρα χειρός μέχρι να διαλυθεί η σκόνη. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς ίδια με εκείνη του κόμμεος ξανθάνης.



*Εικόνα 18: Παρασκευή προϊόντων στο εργαστήριο*

### 7.1.6 Προσθήκη και παραγωγή αιθέριων ελαίων

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μέλι ανθέων έχει ήπια αντιοξειδωτική δράση. Προκειμένου, λοιπόν, να αυξηθεί η διατροφική αξία των νέων προϊόντων μελιού έγινε επιπλέον και εμπλουτισμός αυτών με αιθέρια έλαια. Η ποσότητα των νέων προϊόντων ήταν 100g και προστέθηκαν πριν τη διαδικασία της σφαιροποίησης 0,10g αιθέριου ελαίου. Ο εμπλουτισμός με τα αιθέρια έλαια επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί μόνο στα προϊόντα μελιού.

Τα αιθέρια έλαια παράχθηκαν στο εργαστήριο και αυτά που επιλέχθηκαν είναι γαρίφαλο και μίγμα βοτάνων. Τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του μίγματος βοτάνων είναι τα εξής:

- Θυμαρί 10%
- Δεντρολίβανο 22,5%
- Ρίγανη 52,5%
- Δάφνη 10%
- Λεβάντα 5%

Η διαδικασία παραγωγής των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε μέσω απόσταξης με υδρατμούς (Steam Distillation).

### **Όργανα**

- Συσκευή απόσταξης
- Ψυκτήρας
- Θερμαντική συσκευή
- Τρίλαιμη Σφαιρική Φιάλη 1L
- Διαχωριστική χοάνη 150mL
- Ζυγός ακριβείας
- Σωλήνας διοχέτευσης νερού
- Κωνική φιάλη 100mL

### **Εκτέλεση**

Αρχικά κόπηκαν σε μικρά κομματάκια τα αρωματικά φυτά και ζυγίστηκε ποσότητα 200g βοτάνων (Θυμαρί 20g, Δεντρολίβανο 45g, Ρίγανη 105g, Δάφνη 20g, Λεβάντα 10g). Τα κομματάκια φέρονται σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 1L μαζί με νερό 600mL, ποσότητα τέτοια που να καλύψει πλήρως την ποσότητα βοτάνων. Η φιάλη τοποθετείται στη θερμαντική συσκευή και στο στόμιο της προσαρμόζεται ο ψυκτήρας. Κατά τη διάρκεια της απόσταξης το νερό που αποστάζει μαζί με τα αιθέρια έλαια αναπληρώνεται σιγά σιγά από τη διαχωριστική χοάνη. Μετά από απόσταξη διάρκειας 1 – 2h συλλέγονται στο υδατικό απόσταγμα όλες οι σταγόνες του ελαιώδους αιθέριου ελαίου σε κωνική

φιάλη με εσφυρισμένο πώμα. Η ίδια μέθοδος απόσταξης χρησιμοποιήθηκε και για το γαρίφαλο που χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή των νέων προϊόντων.

### 7.1.7 Τελικά προϊόντα

Τα καινοτόμα προϊόντα που παράχθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία αναφέρονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 4: Τελικά προϊόντα, υφή και οι προτεινόμενες χρήσεις τους*

<b>ΚΑΙΝΟΤΟΜΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ</b>	<b>ΥΦΗ</b>	<b>ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ</b>
Μέλι με αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο	Σχηματίζονται πέρλες: Σκληρό περίβλημα και παχύρευστο εσωτερικό	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών, Ποτών, Ροφημάτων, Topping
Μέλι με άγαρ	Σχηματίζονται πέρλες: Σκληρό περίβλημα και πηκτό εσωτερικό	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών, Ποτών, Ροφημάτων Topping
Μέλι με κόμμα ξανθάνης	Πυκνή, Ρευστό ζελέ	Για επάλειψη, Συνοδεία ροφημάτων (τσάι, σοκολάτα, ποτών)
Μέλι με ζελατίνη	Στέρεο ζελέ, Μεγάλη πυκνότητα	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών, Για επάλειψη
Μέλι με κόμμα χαρουπιού	Πυκνή, Ρευστό ζελέ	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών Για επάλειψη
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο	Σχηματίζονται πέρλες: Σκληρό περίβλημα και ρευστό εσωτερικό	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών, Ποτών, Ροφήματα, Topping
Σταφυλόμελο με άγαρ	Σχηματίζονται πέρλες:	Συνοδεία γλυκών και

	Σκληρό περίβλημα και πηκτό εσωτερικό	αλμυρών πιάτων, Σαλατών, Ποτών, Ροφήματα, Topping
Σταφυλόμελο με κόμμα ξανθάνης	Πυκνή, Ρευστό ζελέ	Για επάλειψη, Συνοδεία ροφημάτων (τσάι, σοκολάτα, ποτών)
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	Στέρεο ζελέ, Μεγάλη πυκνότητα	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών Για επάλειψη
Σταφυλόμελο με κόμμα χαρουπιού	Πυκνή, Ρευστό ζελέ	Συνοδεία γλυκών και αλμυρών πιάτων, Σαλατών Για επάλειψη
<b>Προϊόντα με προσθήκη αιθέριων ελαίων</b>		
Μέλι με αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου		
Μέλι με άγαρ με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου		
Μέλι με κόμμα ξανθάνης με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου		
Μέλι με ζελατίνη με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου		
Μέλι με κόμμα χαρουπιού με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου		
Μέλι με αλγινικό νάτριο και χλωριούχο ασβέστιο με αιθέριο έλαιο μίξη βοτάνων		
Μέλι με άγαρ με αιθέριο έλαιο μίξη βοτάνων		
Μέλι με κόμμα ξανθάνης με αιθέριο έλαιο μίξη βοτάνων		
Μέλι με ζελατίνη με αιθέριο έλαιο μίξη βοτάνων		
Μέλι με κόμμα χαρουπιού με αιθέριο έλαιο μίξη βοτάνων		

Η γεύση του σταφυλόμελου και του μελιού αντίστοιχα δεν αλλοιώθηκε με την επεξεργασία. Τα προϊόντα μελιού έχουν τη γεύση του λεπτόρευστου μελιού



ανθέων που χρησιμοποιήθηκε δηλαδή γλυκιά, απαλή και αρωματική. Ενώ τα προϊόντα του σταφυλόμελου διατηρούν την πλούσια γεύση όμοια με το πετιμέζι. Το πηκτικό μέσο που ίσως προσδίδει κάποια ιδιαίτερη νότα γεύσης και αρώματος είναι το κόμμι χαρουπιού. Τα προϊόντα όπου εμπλουτίστηκαν με αιθέρια έλαια, τόσο στη γεύση όσο και στο άρωμα φέρουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γαρίφαλου και των βοτάνων που περιέχονται στο μίγμα βοτάνων αντίστοιχα, με εντονότερα εκείνα της ρίγανης.



*Μέλι με κόμμι χαρουπιού*



*Μέλι με άγαρ*



*Μέλι με κόμμι Ξανθάνης*

**Εικόνα 19: Μορφή παραχθέντων προϊόντων μελιού**



**Εικόνα 20: Δείγματα μελιού με τα πηκτικά μέσα στη σειρά: αλγινικό νάτριο, άγαρ, κόμμι Ξανθάνης, ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού**

## 7.2 Αναλυτικό μέρος

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, των 20 παραχθέντων προϊόντων και πιο συγκεκριμένα:

- 5 προϊόντων μελιού με προσθήκη πηκτικών μέσων
- 10 προϊόντα μελιού με προσθήκη πηκτικών και αιθέριων ελαίων
- 5 προϊόντα σταφυλόμελου με προσθήκη πηκτικών μέσων

πραγματοποιήθηκαν δύο φασματοφωτομετρικές αναλύσεις. Προσδιορίστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu και έγινε εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ ανάσχεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH•. Πριν τις αναλύσεις, 2g από το εκάστοτε δείγμα, διαλυτοποιήθηκαν σε 20ml απεσταγμένου νερού υπό ισχυρή ανάδευση.

### 7.2.1 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu<sup>1,2</sup> είναι μία φωτομετρική τεχνική που βασίζεται σε μια χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των φυσικών προϊόντων.

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της μεθόδου που προκύπτουν, καθορίζονται από τα ισοδύναμα πρότυπα που χρησιμοποιούνται, τη σειρά με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια και πως το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu (FCR) αποτελεί ένα μίγμα οξειδίων βολφραμίου (W) και μολυβδαινίου (Mo). Τα προϊόντα της αναγωγής των οξειδίων των μετάλλων έχουν χαρακτηριστικό μπλε χρώμα εκείνο του πεντασθενούς μολυβδαινίου, το οποίο παρουσιάζει μία ευρεία απορρόφηση φωτός με μέγιστο στα 765 nm. Η ένταση της απορρόφησης του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Το μίγμα των FCR και των φαινολικών ενώσεων είναι σταθερό σε οξύ αλλά ασταθές σε αλκαλικό διάλυμα. Ως εκ τούτου, το ανθρακικό νάτριο, το οποίο χρησιμοποιείται για την παροχή αλκαλικού περιβάλλοντος, είναι κρίσιμης σημασίας για την αντίδραση.

### 7.2.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- Γαλλικό οξύ (GA): 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>. MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu: Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 3H<sub>2</sub>O.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.14WO<sub>3</sub>·4MoO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O & 3H<sub>2</sub>O.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·13WO<sub>3</sub>·5MoO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O, Merck KGaA, Germany
- Ανθρακικό νάτριο (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): Sodium Carbonate anhydrous, Assay 99,5-100,5%, MW=105,99 g/mol, CAS: 497-19-8, Carlo Erba Reagents, Italy
- Απεσταγμένο νερό (H<sub>2</sub>O)
- Υπό μελέτη δείγματα

### 7.2.1.2 Όργανα και Εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακρίβειας ±0,0001, Mettler Delta Trak
- Πλαστικές κυψελίδες για μέτρηση στο ορατό φάσμα, χωρητικότητας 2,5 ml, l=0,1 dm, Karfell, Italy
- Αυτόματη πιπέτα των 0,5-5 μL, 5-50 μL και 1-5 mL Transferpette (Brand)
- Πλαστικά tips
- Υδροβολέας
- Σπάτουλα ζύγισης
- Γυάλινο χωνί
- Διηθητικό χαρτί και Parafilm
- Στατώ
- Μαγνητικός αναδευτήρας HI 200m Hanna
- Κωνικές φιάλες pyrex των 250 και 500 ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 500 και 1000 ml
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Υδρόλουτρο με θερμοστάτη, Memmert, Germany

- Φασματοφωτόμετρο UV—Vis: Novaspek III visible spectrophotometer, Product code: 80-2118-00, Amersham Biosciences, USA

### 7.2.1.3 Παρασκευή Διαλυμάτων

- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Ποσότητα 200g άνυδρου Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> διαλύονται σε 800mL απεσταγμένου H<sub>2</sub>O με τη βοήθεια βρασμού. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά και προστίθενται 80g κρυστάλλων Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Το διάλυμα αφήνεται για 24h στο σκοτάδι. Ακολουθεί διήθηση σε ογκομετρική φιάλη του 1L όπου και συμπληρώνεται ως τη χαραγή με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος (Gallic acid, GA): Ποσότητα 0,5 g γαλλικού οξέος διαλύεται σε 10 mL αιθανόλης και αραιώνεται με τελικό όγκο 100mL με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα γαλλικού οξέος που παρασκευάστηκε είναι τελικής συγκέντρωσης 5g/L. Χρησιμοποιώντας το αρχικό διάλυμα του πρότυπου γαλλικού οξέος (GA) συγκέντρωσης 5g/L παρασκευάζονται σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 100mL πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250 και 500mg GA/L.

### 7.2.1.4 . Πειραματική Πορεία

1. Τοποθετούνται 20μl προτύπου ή δείγματος, 1500μl απεσταγμένου νερού και 100μl αντιδραστήριου FC (βιομηχανικής παραγωγής), σε πλαστικές κυψελίδες 2,5ml. Χρησιμοποιείται και κυψελίδα με 20μl απεσταγμένου νερού αντί δείγματος για τυφλό διάλυμα.

2. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση με χρήση vortex και επώαση των διαλυμάτων για 8min σε σκοτάδι.

3. Έπειτα προστίθενται 300μl κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, σφραγίζονται οι κυψελίδες με parafilm και αναδεύονται καλά.

4. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 40 °C για επώαση 30 λεπτών στο σκοτάδι.

5. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 765 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης.

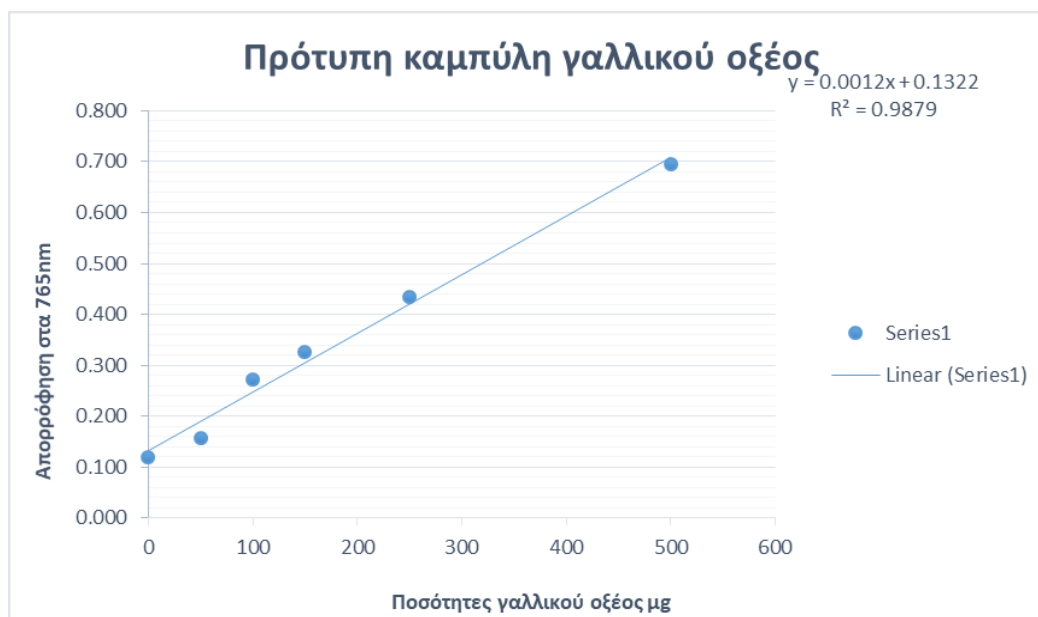
Για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές και για κάθε δείγμα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις (N=3).



Εικόνα 21: Δείγματα έτοιμα σε κυψελίδες για μέτρησης τους σε φασματοφωτόμετρο

#### 7.2.1.5 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 5g/L διαλύματα με συγκεντρώσεις 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L.

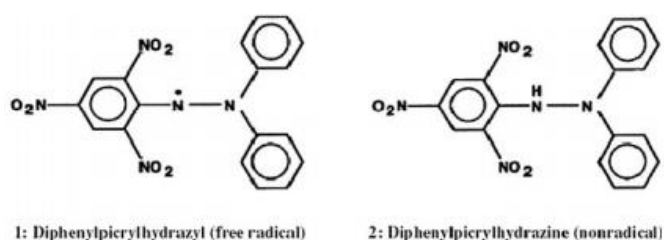


Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας Folin-Ciocalteu

## 7.2.2 Ανάλυση με τη μέθοδο της σταθερής ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδράζυλο (DPPH).

Η μέθοδος<sup>2,3,5</sup> βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) από τις πολυφαινόλες. Αυτή είναι η απλούστερη μέθοδος, όπου η πρότυπη ένωση ή εκχύλισμα αναμιγνύεται με DPPH διάλυμα και η απορρόφηση καταγράφεται μετά από μια καθορισμένη περίοδο. Η δοκιμασία βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας εκκαθάρισης των αντιοξειδωτικών προς αυτήν. Το ηλεκτρόνιο του ατόμου του αζώτου στο DPPH δεσμεύεται με τη λήψη ενός ατόμου υδρογόνου από αντιοξειδωτικά στην αντίστοιχη υποκίτρινη ρίζα υδραζίνη (Contreras-Guzman and Strong 1982). Το DPPH χαρακτηρίζεται ως μια σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της μετεγκατάστασης του εφεδρικού ηλεκτρονίου πάνω από το μόριο στο σύνολό του, με αποτέλεσμα τα μόρια να μην διαμεριστούν, όπως γίνεται στις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Η μετεγκατάσταση προκαλεί επίσης το βαθύ μωβ χρώμα, με απορρόφηση σε διάλυμα αιθανόλης περίπου στα 520nm.

Η κατανάλωσή της ρίζας DPPH• από τα αντιοξειδωτικά, έχει σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση του μωβ χρώματος του διαλύματός της και κατ' επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης. Το χρώμα από μωβ στο αρχικό διάλυμα, μετατρέπεται σε κίτρινο όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά του εκάστοτε δείγματος. Η εξασθένηση αυτή του χρώματος παρακολουθείται στα 516 nm.



Εικόνα 22: Η ρίζα DPPH και η σταθερή της μορφή

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων μετράτε η μεταβολή της απορρόφησης και συγκρίνεται με μια πρότυπη ουσία όπως το γαλλικό οξύ ή το ασκορβικό οξύ. Η ανάλυση DPPH είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, απλή και ταχεία και χρειάζεται για τη διεκπεραίωση της μόνο ένα UV-Vis

φασματοφωτόμετρο, ενώ η ρίζα DPPH είναι εμπορικώς διαθέσιμη και δε χρειάζεται να παράγεται πριν την ανάλυση.

#### 7.2.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH) pro analysis, Merk KGaA, Germany
- Αιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), Ethanol absolute for analysis, Merk KGaA, Germany
- DPPH ρίζα: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical) 95% powder, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, MW=394,32 g/mol, CAS: 1898-66-4, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany
- Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C): L-Ascorbic acid, Analytical reagent grade, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, MW=176,12 g/mol, CAS: 50-81-7, Fischer Chemical, UK
- Απεσταγμένο νερό (H<sub>2</sub>O)
- Υπό μελέτη δείγματα

#### 7.2.2.2 Όργανα και εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακρίβειας ±0,0001, Mettler Delta Trak
- Πλαστικές κυψελίδες για μέτρηση στο ορατό φάσμα, χωρητικότητας 2,5 ml, l=0,1 dm, Karfell, Italy
- Αυτόματη πιπέτα των 0,5-5 μL, 5-50 μL και 1-5 mL Transferpette (Brand)
- Πλαστικά tips
- Υδροβολέας
- Σπάτουλα ζύγισης
- Φασματοφωτόμετρο UV—Vis: Novaspek III visible spectrophotometer, Product code: 80-2118-00, Amersham Biosciences, USA

#### 7.2.2.3 Παρασκευή Διαλυμάτων

Διάλυμα ρίζας DPPH•: Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα ρίζας DPPH• συγκέντρωσης 0,001M. Η ουσία DPPH βρίσκεται σε μορφή σκόνης και διαλύεται σε μεθανόλη. Το πυκνό διάλυμα που παρασκευάζεται καλείται

διάλυμα φύλαξης το οποίο αραιώνεται και δημιουργείται ένα διάλυμα συγκέντρωσης 100  $\mu$ M, το οποίο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ριζών των υπό μελέτη δειγμάτων.

Πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος (L-ascorbic acid, AA): Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml διαλύεται ποσότητα 0,2g ασκορβικού οξέος για την παρασκευή του διαλύματος φύλαξης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος που παρασκευάστηκε είναι τελικής συγκέντρωσης 2mg/ml. Το L-ασκορβικό οξύ αντιδρά ταχύτατα με το DPPH• και χρειάζεται μόνο μια καταγραφή της τιμής της απορρόφησης. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το αρχικό διάλυμα του πρότυπου ασκορβικού οξέος (AA) συγκέντρωσης 2mg/ml παρασκευάζονται σε υάλινες ογκομετρικές φιάλες των 100mL πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 και 1500mg AA/ml. Τα διαλύματα του ασκορβικού οξέος παρασκευάζονται την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος.



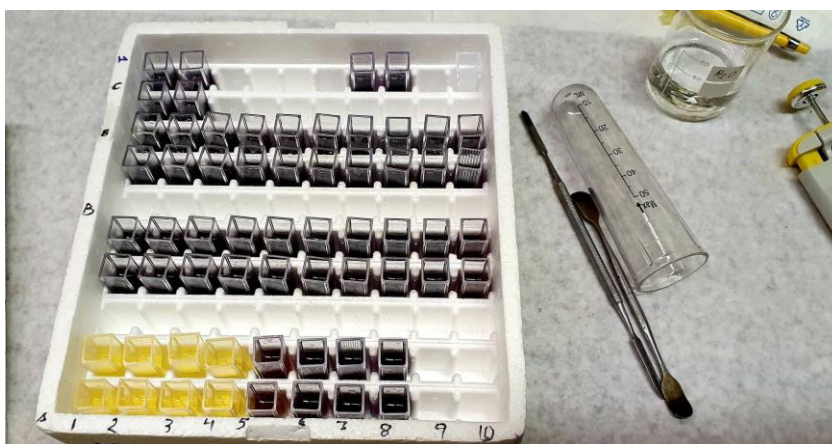
*Εικόνα 23: Υπό μελέτη δείγματα και παρασκευή προτύπων*

#### **7.2.2.4 Πειραματική Πορεία**

1. Τοποθετούνται 100 $\mu$ l προτύπου ή δείγματος και 1500 $\mu$ l από το παραχθέν διάλυμα DPPH, σε πλαστικές κυψελίδες 2,5ml. Χρησιμοποιείται και κυψελίδα με 100 $\mu$ l απεσταγμένου νερού αντί δείγματος για τυφλό διάλυμα.
2. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση με χρήση vortex για 1min σε σκοτάδι.
3. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 517nm μετά από 30min και καταγραφή αποτελεσμάτων.



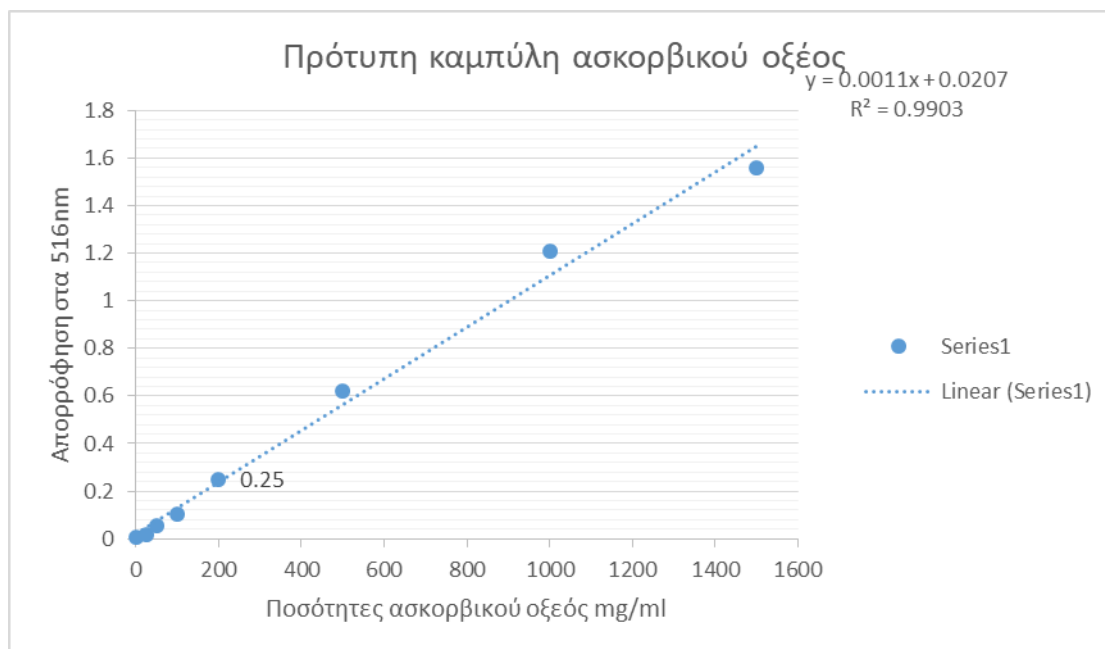
Για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές και για κάθε δείγμα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις (N=3).



Εικόνα 24: Δείγματα έτοιμα για φασματοφωτομέτρηση

### 7.2.2.5 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς L-ασκορβικού οξέος παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το πρότυπο διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 2mg/ml διαλύματα με συγκεντρώσεις 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L και 1500 mg/L.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Ασκορβικού οξέος

### **7.3 Μικροβιολογικό μέρος**

Για να μελετηθεί η διατηρησιμότητα των παραγόμενων προϊόντων μελιού και σταφυλόμελου πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις σχετικά με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ), την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων καθώς και πιο συγκεκριμένα αφλατοξινογόνων μυκήτων. Οι αναλύσεις ξεκίνησαν από την πρώτη ημέρα παραγωγής των προϊόντων και ολοκληρώθηκαν με το πέρας της διάρκειας 30ημερών.

Τα δείγματα βρίσκονταν σε θερμοκρασία ψύξης 0-6 °C και ελέγχθηκε η διάρκεια ζωής τους μετά το άνοιγμα της συσκευασίας τους επομένως οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από την ίδια συσκευασία κάθε φορά. Σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν ήταν να ελεγχθεί η διάρκεια ζωής του προϊόντος στο ράφι αλλά το πόσο μπορεί να διατηρηθεί το προϊόν αναλλοίωτο μετά το άνοιγμα της συσκευασίας του.

#### **7.3.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών**

Για την καλλιέργεια της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Nutrient agar (BD Difco), για τον έλεγχο των μυκήτων και ζυμών χρησιμοποιήθηκε Sabouraud Dextrose Agar και για την ανίχνευση των μυκήτων *A.parasiticus* και *A.flavus* χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υλικό AFPA (*Aspergillus Flavus Parasiticus Agar*).

##### **7.3.1.1 Σύσταση θρεπτικών υλικών**

Όλα τα θρεπτικά υλικά βρίσκονται σε στέρεη μορφή και αραιώνονται σε απεσταγμένο νερό. Οι ποσότητες των συστατικών των τριών θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω για 1L απεσταγμένο νερό:

Πίνακας 5: Συστατικά θρεπτικού υλικού *Nutrient Agar*

Συστατικά Θρεπτικού υλικού	Ποσότητα συστατικού σε g/L H <sub>2</sub> O
Beef Extract	1
Yeast Extract	2
Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Πίνακας 6: Συστατικά θρεπτικού υλικού *Sabouraud Dextrose Agar*

Συστατικά Θρεπτικού υλικού	Ποσότητα συστατικού σε g/L H <sub>2</sub> O
Mycological peptone	10
Glucose (dextrose)	40
Agar	15

Πίνακας 7: Σύσταση θρεπτικού υλικού *AFPA (Aspergillus Flavus Parasiticus Agar)*

Συστατικά Θρεπτικού υλικού	Ποσότητα συστατικού σε g/L H <sub>2</sub> O
Yeast Extract	20
Peptone bacteriological	10
Ferric ammonium citrate	0,5
Dichloran	1
Chloramphenicol	0,1
Agar	14

### 7.3.1.2. Υλικά – Εξοπλισμός

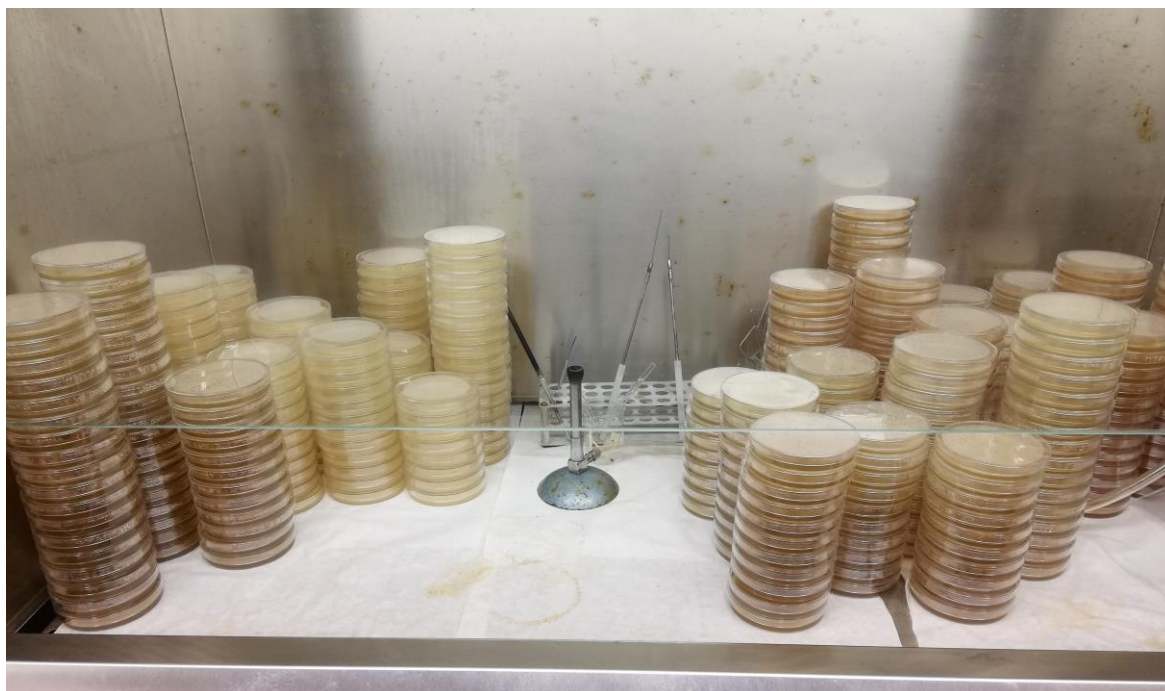
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας +0,0001, Mettler Delta Trak
- Laminar flow Telstar Bio-II-A

- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Μαγνητικός αναδευτήρας HI 200m Hanna
- Κωνικές φιάλες pyrex των 250, 500 και 1000 ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50, 100, 250 και 500 ml
- Πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 9 cm (αποστειρωμένα)
- Αυτόματη πιπέτα των 25-250 μl, 100-1000μl και των 10-100μl Transferpette (Brand)
- Πλαστικά tips
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur 1ml
- Κλίβανος επώασης WTB binder
- Λύχνος Bunsen
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Υάλινες πιπέτες Pasteur
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (κεφαλή HS-4 7000 rev/min max, θήκες sorvall 00480)
- Μεταλλικές σπάτουλες
- Σωληνάρια πλαστικά βιδωτά κωνικά τύπου Falcon
- Ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Αιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), extra pure
- Απεσταγμένο νερό
- Μικροσκόπιο

### **7.3.1.3. Πορεία παρασκευής θρεπτικών υλικών**

Σε καθαρή κωνική φιάλη προστίθενται τα  $\frac{3}{4}$  του απεσταγμένου νερού που απαιτείται για τη συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Στη συνέχεια, προστίθενται, οι κατάλληλες ποσότητες των

των θρεπτικών υλικών nutrient και sabouraud όπου είναι έτοιμα βιομηχανικά σε σκόνη ενώ στο AFPA τα συστατικά προστίθενται με τη σειρά που φαίνεται στη σύστασή του. Οι προσθήκες των συστατικών πραγματοποιούνται υπο συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Προστίθεται το  $\frac{1}{4}$  του απεσταγμένου νερού. Η κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό πωματίζεται με γάζα από ανυδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και έπειτα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 15min. Μετά την αποστείρωση το μείγμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει τους  $60-70^{\circ}\text{C}$  και μεταφέρεται, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri. Κάθε τρυβλίο περιέχει περίπου 20ml θρεπτικό υλικό, τουλάχιστον πάχους 4mm, ώστε να επαρκεί για την ανάπτυξη των μυκήτων. Τα τρυβλία τοποθετούνται το ένα επάνω στο άλλο και αφήνονται να κρυώσουν. Την επόμενη μέρα έχουν ήδη στερεοποιηθεί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 25: Τα παραχθέντα τρυβλία με τα θρεπτικά υλικά

### 7.3.2. Μικροβιολογικός έλεγχος των προϊόντων

Ο μικροβιολογικός έλεγχος των προϊόντων έγινε ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε διάρκεια ενός μήνα από την παραγωγή των προϊόντων μελιού και σταφυλόμελου. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ολική μεσόφιλη χλωρίδα τους, η ύπαρξη μυκήτων και ζυμών καθώς και η παρουσία αφλατοξινογόνων

μυκήτων την 1<sup>η</sup> ημέρα, την 5<sup>η</sup> ημέρα, τη 12<sup>η</sup> ημέρα, την 20<sup>η</sup> ημέρα και την 31<sup>η</sup> ημέρα από την ημέρα παραγωγής τους. Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε σε θερμοκρασία ψύξης 0-6 °C και ο εμβολιασμός των τρυβλίων την ημέρα ανάλυσης πραγματοποιούνταν από την ίδια ανοιχτή συσκευασία από την πρώτη ημέρα μελέτης.

### **7.3.2.1. Έλεγχος Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ)<sup>16,4</sup>**

Αρχικά παρασκευάζουμε την πεπτόνη, σε καθαρή κωνική φιάλη του 1L τοποθετούμε  $\frac{3}{4}$  απεσταγμένου νερού και προσθέτουμε 10g πεπτόνη σκόνη υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθεται το  $\frac{1}{4}$  του απεσταγμένου νερού και συνεχίζεται η ανάδευση. Εφόσον διαλυθεί η σκόνη πλήρως η κωνική φιάλη πωματίζεται με γάζα από ανυδρόφιλο βαμβάκι και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15min. Με την παραπάνω διαδικασία παρασκευάζεται το Peptone water 0,1% το οποίο φυλάσσεται στον απαγωγό μέχρι να κρυώσει για να χρησιμοποιηθεί.

Στη συνέχεια ζυγίζεται με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας, σε σωληνάρια πλαστικά βιδωτά κωνικά τύπου Falcon, τα οποία έχουν αποστειρωθεί στους 121°C για 15min (με την προσθήκη 1 με 2ml), 1g από κάθε δείγμα – προϊόν. Κατόπιν προσθέτουμε 20ml peptone water 0,1% και αναδεύουμε ένα ένα σωληνάριο σε κυκλοαναδευτήρα vortex για λίγα δευτερόλεπτα.

Επειδή τα περισσότερα δείγματα είχαν πυκνή υφή, για την καλύτερη και πιο έγκυρη διεξαγωγή των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο για 10min με 1000 στροφές rpm/min στους 25°C. Αφού τα δείγματα φυγοκεντρηθούν είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό των έτοιμων τρυβλίων με το θρεπτικό υλικό nutrient.

Για κάθε αραίωση χρησιμοποιούνται 3 τρυβλία. Σε κάθε εξωτερικό κάθε τρυβλίου αναγράφεται με μαρκαδόρο το δείγμα που εμβολιάζουμε κάθε φορά. Προστίθεται με αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur σε κάθε τρυβλίο 0,5ml από το υπερκείμενο του φυγοκεντρημένου δείγματος, το οποίο διασπείρεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια με τη βοήθεια αποστειρωμένου διασπορέα. Ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού επιτυγχάνεται μπροστά σε φλόγα και όλος ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται

έχει αποστειρωθεί για να αποφευχθεί η οποιαδήποτε επιμόλυνση. Τα τρυβλία αφήνονται για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να απορροφηθεί το υγρό, αναστρέφονται και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο όπου επωάζονται στους 37°C για 48h. Μετά το πέρας της διάρκειας επώασης, πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών (cfu), λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα τρυβλία που περιέχουν 30-300 αποικίες. Οι αποικίες που καταμετρούνται ανάγονται στην ποσότητα του αρχικού δείγματος (πυκνό) που χρησιμοποιήθηκε και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως log(cfu/g τροφίμου).

### **7.3.2.2 Έλεγχος παρουσίας ζυμών και μυκήτων (Sabouraud)**

Για τον έλεγχο ύπαρξης και ανάπτυξης ζυμών και μυκήτων στα παραχθέντα τρόφιμα δεν πραγματοποιήθηκε κάποια προετοιμασία των δειγμάτων. Τοποθετήθηκε ποσότητα του εκάστοτε δείγματος με τη βοήθεια αποστειρωμένων μεταλλικών σπατουλών η οποία κατανεμήθηκε ομοιόμορφα κατά μήκος της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 1g περίπου δείγματος κάθε φορά σε ασηπτικές συνθήκες στο εξωτερικό των οποίων σημειώθηκε η ονομασία του δείγματος και το θρεπτικό υλικό ώστε να υπάρχει διαχωρισμός. Πραγματοποιείται εμβολιασμός 3 τρυβλίων για κάθε δείγμα για κάθε ανάλυση που πραγματοποιήθηκε.

Εφόσον τα τρυβλία εμβολιαστούν με δείγμα τοποθετούνται το ένα επάνω στο άλλο μέσα στον επωαστικό κλίβανο στους 30°C για διάστημα 5 ημερών. Κατόπιν της επώασης τους παρατηρείται η παρουσία ή η απουσία μυκήτων στα δείγματα που μελετήθηκαν.

### **7.3.2.3. Έλεγχος παρουσίας αφλατοξινογόνων μυκήτων <sup>16</sup>**

Υπό ασηπτικές συνθήκες πραγματοποιείται ο εμβολιασμός των δειγμάτων σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό AFPA ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία που περιγράφηκε λεπτομερώς και αφορά το θρεπτικό υλικό Sabouraud agar. Μετά το πέρας της επώασης δηλαδή την 5η ημέρα γίνεται η παρατήρηση των τρυβλίων για παρουσία ή όχι αφλατοξινογόνου μύκητα, όπου γίνεται αντιληπτή οπτικά με την ανάπτυξη έντονου κίτρινοπορτοκαλί χρωματισμού στην αντιστροφή των αποικιών.

#### **7.3.2.4.Χρώση** <sup>16,4</sup>

Οι αποικίες που μυκήτων και ζυμών που βρέθηκαν παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο για να γίνει η ταυτοποίηση τους πραγματοποιώντας μία απλή χρώση μυκήτων.

Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου ή βελόνας (ανάλογα με τη φύση της αποικίας) μεταφέρεται, υπό ασηπτικές συνθήκες, μικρό κομμάτι από την αποικία που θέλουμε να εξετάσουμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στο σημείο που τοποθετείται το κομμάτι της αποικίας, ρίχνουμε 1 σταγόνα μπλε της ανιλίνης και τοποθετούμε από πάνω καλυπτρίδα. Αναγράφουμε με ανεξίτηλο στυλό το θρεπτικό υλικό, την ημερομηνία καθώς και το δείγμα που εξετάζουμε. Πιέζουμε με προσοχή, για κάποια δευτερόλεπτα, την αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του μπλε της ανιλίνης και να γίνει το δείγμα πιο διακριτό στο φακό του μικροσκοπίου. Το δείγμα είναι έτοιμο για εξέταση στο μικροσκόπιο. Ρίχνουμε 1 σταγόνα κεδρέλαιο πάνω στην καλυπτρίδα και παρατηρούμε το παρασκεύασμα με τον καταδυτικό φακό, ο οποίος παρέχει την μεγαλύτερη μεγέθυνση.



## 8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 8.1 Αντιοξειδωτικά

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων καθώς και η ύπαρξη αντιοξειδωτικών στα προϊόντα μελιού και σταφυλόμελου που παράχθηκαν. Οι αναλύσεις επιτεύχθηκαν σε 20 διαφορετικά προϊόντα με διαφορετική σύσταση και με διαφορετική πρώτη ύλη.

Το μέλι καθώς και το σταφύλι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι πλούσια σε φαινολικά στοιχεία καθώς είναι τρόφιμα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Σκοπός λοιπόν της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του μελιού και του σταφυλόμελου κατόπιν προσθήκης των 5 διαφορετικών πηκτικών μέσων. Επίσης, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μελιού ανθέων με τη μελάσα – σταφυλόμελο. Στα προϊόντα μελιού δηλαδή πιο αναλυτικά μέλι με άγαρ, μέλι με αλγινικό νάτριο, μέλι με ζελατίνη, μέλι με κόμμι χαρουπιού και μέλι με κόμμι ξανθάνης προστέθηκε ποσότητα αιθέριου ελαίου γαρίφαλου και αντίστοιχα μίξης βοτάνων για να μελετηθεί η επίδραση αυτών στη συνολική αντιοξειδωτική δράση με ή χωρίς την προσθήκη τους.

Τα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις χωρίς καμμία επιπλέον επεξεργασία. Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων προσδιορίστηκε μέσω της χρωματομετρικής τεχνικής φασματοφωτομετρίας Folin- Ciocalteu και της μέτρησης της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) από τις πολυφαινόλες.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω αναλυτικά για κάθε μέθοδο που μελετήθηκε.

### 8.1.1 Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC) - Μέθοδος Folin—Ciocalteu των δειγμάτων μελιού και σταφυλόμελου

Υπολογίστηκε το φαινολικό περιεχόμενο σε όλα τα παραχθέντα προϊόντα. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν (60 συνολικά δείγματα) για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

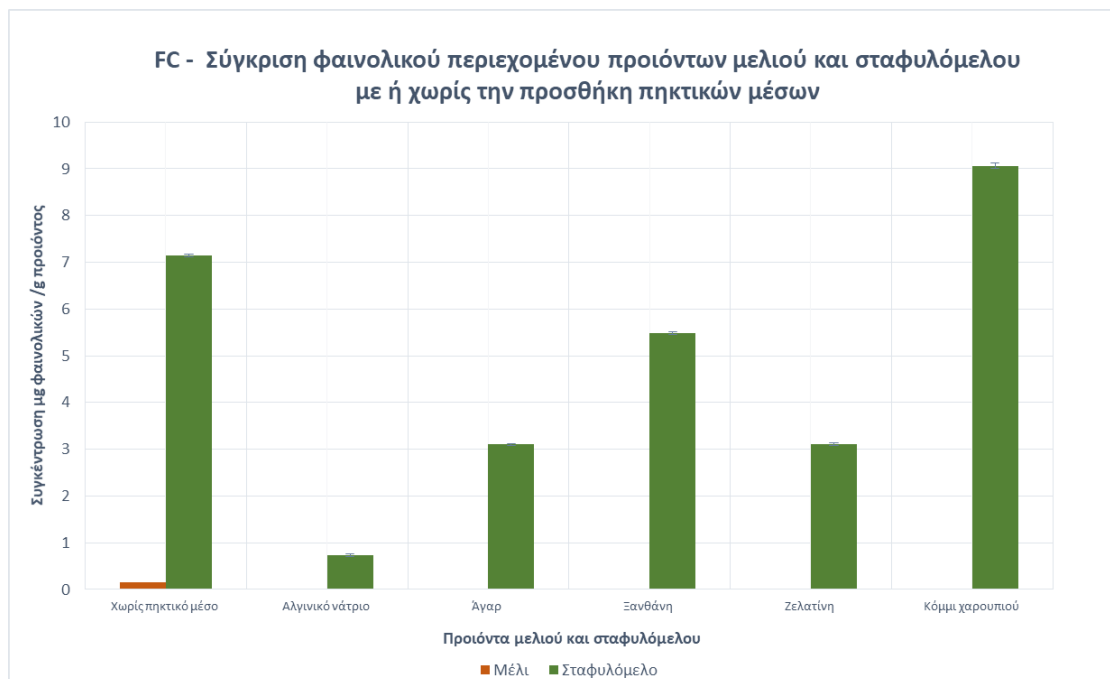
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα μg φαινολικών ανά γραμμάριο τροφίμου.

Πίνακας 8: Συγκέντρωση του φαινολικού περιεχομένου των προϊόντων εκφρασμένη σε μg GAE/g τροφίμου.

Δείγματα	μg GAE/g τροφίμου
Μέλι	0,15±0,00
Μέλι με αλγινικό νάτριο	0,00±0,02
Μέλι με άγαρ	0,00±0,09
Μέλι με ξανθάνη	0,00±0,01
Μέλι με ζελατίνη	0,00±0,04
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	0,00±0,01
Σταφυλόμελο	7,15±0,03
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο	0,73±0,02
Σταφυλόμελο με άγαρ	3,11±0,02
Σταφυλόμελο με ξανθάνη	5,48±0,03
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	3,11±0,02
Σταφυλόμελο με κόμμι χαρουπιού	9,07±0,06

Όπως παρατηρείται και στα παρακάτω γραφήματα, το φαινολικό περιεχόμενο του μελιού της αρχικής δηλαδή πρώτης ύλης είναι πολύ χαμηλότερο από εκείνο του σταφυλόμελου. Η προσθήκη των πηκτικών μέσων επιδρά διαφορετικά στο μέλι και στο σταφυλόμελο. Πιο συγκεκριμένα, στο μέλι και με τα πέντε πηκτικά μέσα δεν υπάρχει τιμή απορρόφησης είναι μηδενική ενώ στο

σταφυλόμελο η προσθήκη κόμμεος χαρουπιού δείχνει υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο συγκριτικά με το σταφυλόμελο χωρίς προσθήκη πηκτικού. Τα δείγματα του σταφυλόμελου με την προσθήκη των άλλων τεσσάρων πηκτικών παρουσιάζουν μειωμένες τιμές του φαινολικού περιεχομένου συγκριτικά με την αρχική πρώτη ύλη, με το αλγινικό νάτριο να παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή TPC.

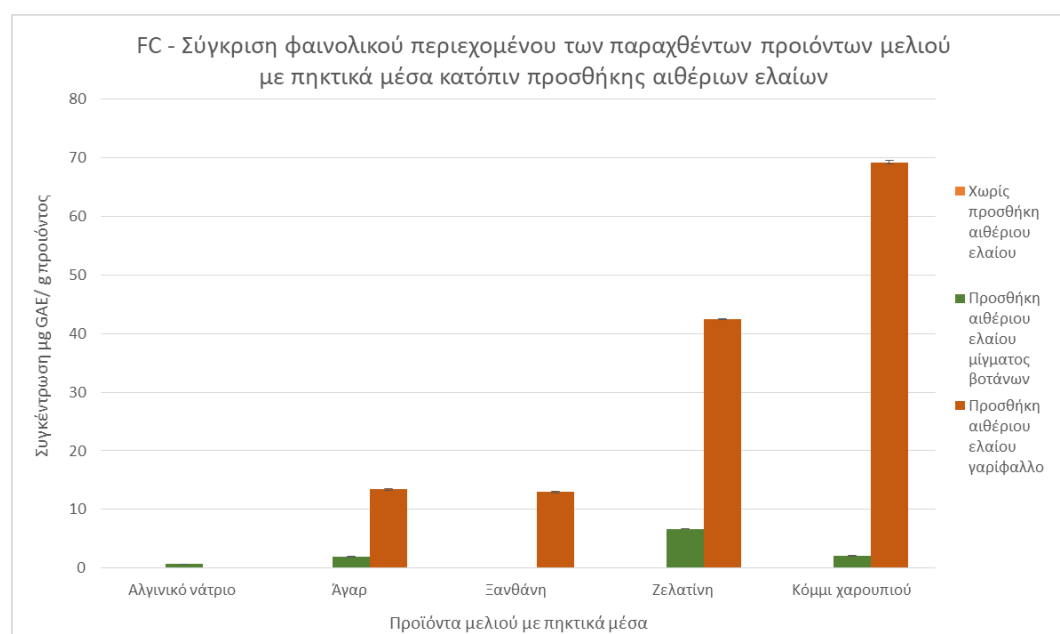


**Διάγραμμα 3: Γράφημα σύγκρισης της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε μέλι και σταφυλόμελο**

Λόγω των χαμηλών αποτελεσμάτων φαινολικού περιεχομένου στα προϊόντα μελιού με την προσθήκη πηκτικών μέσων πραγματοποιήθηκε προσθήκη αιθέριων ελαίων για να εντοπίσουμε εάν υπάρχει κάποια αλλαγή στην τελική απορρόφηση των δειγμάτων. Τα αιθέρια έλαια όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 παρακάτω αλλά και στο διάγραμμα 4 αύξησαν την ποσότητα των φαινολών στα δείγματα και πιο συγκεκριμένα η προσθήκη του αιθέριου ελαίου γαρίφαλου όπου στα δείγματα μελιού με ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού παρουσίασε πολύ υψηλό TPC συγκριτικά με την απουσία που παρουσίαζαν τα δείγματα με την παρουσία μόνο πηκτικών.

**Πίνακας 9: Συγκέντρωση του φαινολικού περιεχομένου των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα και προσθήκη αιθέριων ελαίων εκφρασμένη σε  $\mu\text{g GAE/g}$  τροφίμου.**

Δείγματα	$\mu\text{g GAE/g}$ τροφίμου
Μέλι με αλγινικό νάτριο και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	0,00±0,01
Μέλι με άγαρ και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	13,40±0,10
Μέλι με ξανθάνη και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	13,00±0,13
Μέλι με ζελατίνη και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	42,40±0,07
Μέλι με κόμμι χαρουπιού και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	69,20±0,32
Μέλι με αλγινικό νάτριο και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	0,65±0,05
Μέλι με άγαρ και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	1,90±0,07
Μέλι με ξανθάνη και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	0,00±0,03
Μέλι με ζελατίνη και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	6,69±0,02
Μέλι με κόμμι χαρουπιού και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	2,07±0,06



**Διάγραμμα 4: Γράφημα σύγκρισης της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε μέλι με πηκτικά μέσα και σε μέλι με πηκτικά μέσα και αιθέρια έλαια γαρίφαλλο και μίγματος βοτάνων**

Η προσθήκη αιθέριων ελαίων στις περισσότερες περιπτώσεις, οδήγησε στην αύξηση της διατροφικής αξίας των προϊόντων καθώς το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε, ήταν αυξημένο συγκριτικά με τα προϊόντα χωρίς την προσθήκη των ελαίων.

Αναλυτικότερα, στο μέλι με ξανθάνη, η προσθήκη αιθέριου ελαίου μίγματος βοτάνων δε φέρει καμία αλλαγή συγκριτικά με το αρχικό δείγμα, ενώ στο μέλι με τα υπόλοιπα πηκτικά, το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο αυξάνει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Μεταξύ των δύο ειδών αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν, το έλαιο γαρύφαλλου οδήγησε σε υψηλότερες τιμές TPC σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από τα δείγματα που περιείχαν το αλγινικό νάτριο ως πηκτικό.

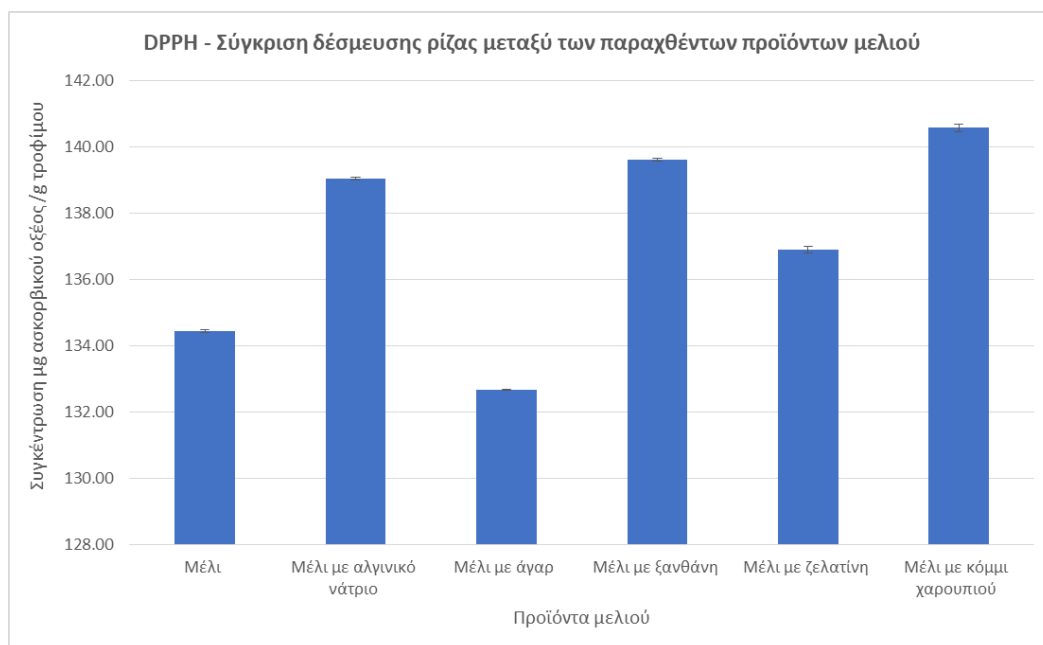
### 8.1.2 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH• από τα παραχθέντα προϊόντα μελιού και σταφυλόμελου

Υπολογίστηκε η δυνατότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH από τα προϊόντα μελιού και σταφυλόμελου με την προσθήκη πηκτικών μέσων, οπότε εκτιμήθηκε και συνολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

*Πίνακας 10: Συγκέντρωση περιεχομένου αντιοξειδωτικών των παραχθέντων προϊόντων εκφρασμένη σε  $\mu\text{g AAE/g}$  τροφίμου.*

Δείγματα	$\mu\text{g AAE/g}$ τροφίμου
Μέλι	134,43±0,05
Μέλι με αλγινικό νάτριο	139,02±0,04
Μέλι με άγαρ	132,66±0,01
Μέλι με ξανθάνη	139,61±0,04
Μέλι με ζελατίνη	136,80±0,09
Μέλι με κόμμα χαρουπιού	140,57±0,11
Σταφυλόμελο	130,34±0,03
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο	136,75±0,01

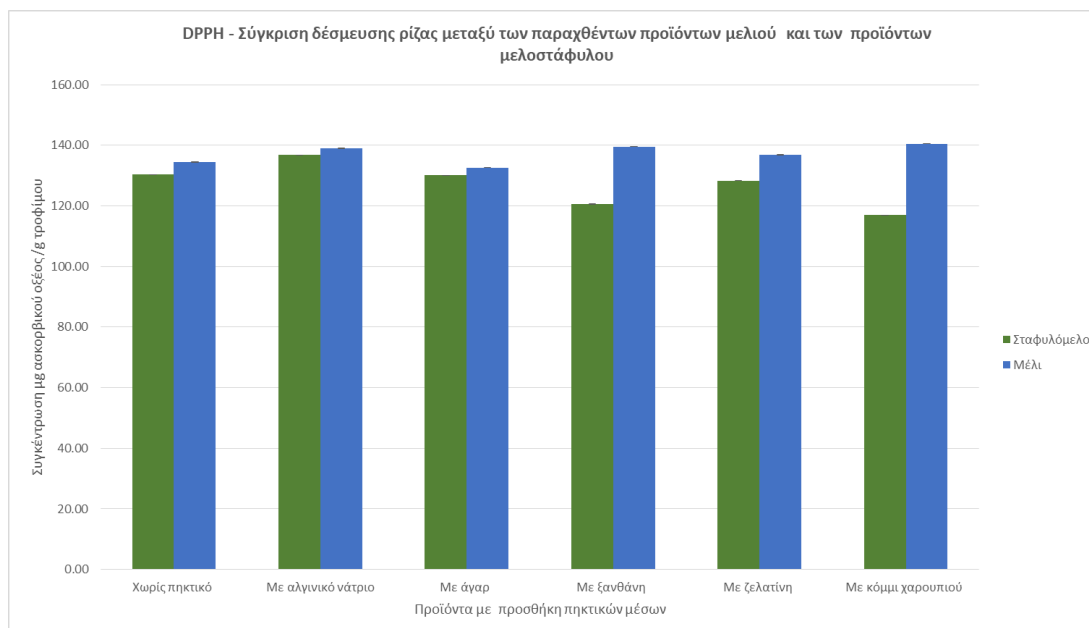
Σταφυλόμελο με άγαρ	130,00±0,02
Σταφυλόμελο με ξανθάνη	120,61±0,05
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	128,30±0,01
Σταφυλόμελο με κόμμα χαρουπιού	116,98±0,02



**Διάγραμμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας των αντιοξειδωτικών μεταξύ των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα**



**Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας των αντιοξειδωτικών μεταξύ των προϊόντων μελοστάφυλου με πηκτικά μέσα**

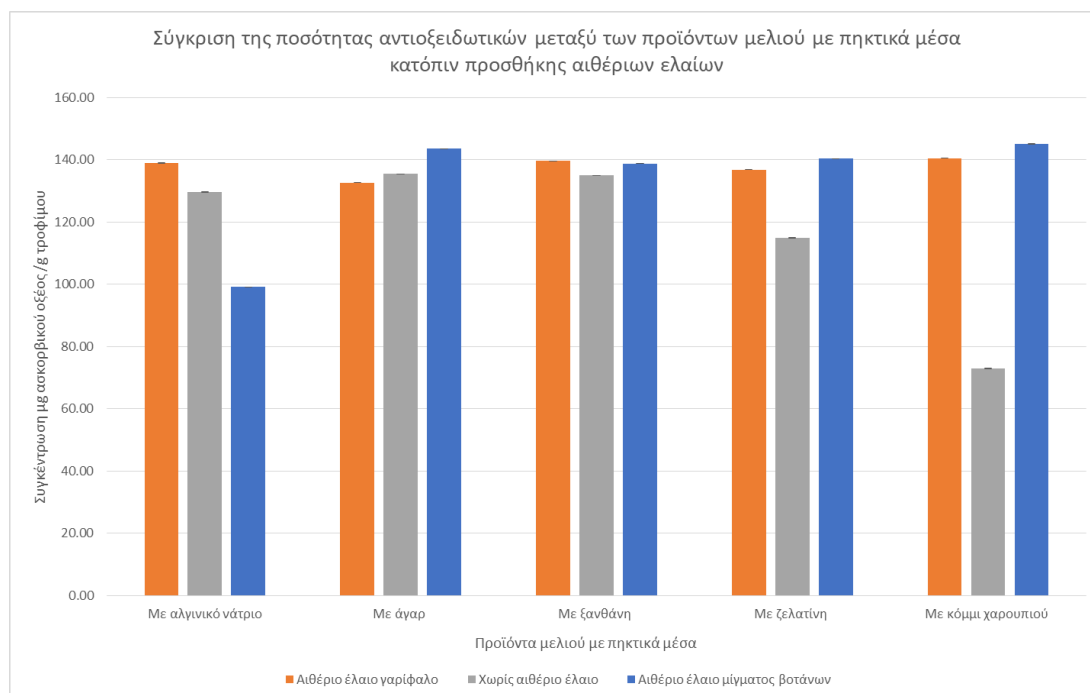


**Διάγραμμα 7: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας αντιοξειδωτικών των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα έναντι προϊόντων σταφυλόμελου με πηκτικά μέσα**

Σύμφωνα με τα διαγράμματα 5 και 6 φαίνεται πως η αντιοξειδωτική δράση του μελιού αυξάνεται με την προσθήκη κόμμεος χαρουπιού, αλγινικού νατρίου, κόμμεος ξανθάνης και ζελατίνης. Ωστόσο εμφανίζεται μειωμένη στα δείγματα με την προσθήκη άγαρ. Όσον αφορά το σταφυλόμελο η αντιοξειδωτική δράση είναι υψηλή και αυξάνεται μόνο με την προσθήκη αλγινικού νατρίου ενώ παραμένει σταθερή με το άγαρ. Τα άλλα τρία πηκτικά μειώνουν τη δέσμευση της ρίζας της πρώτης ύλης με το κόμμα χαρουπιού να τη μειώνει αισθητά, ακολουθεί η ξανθάνη και τέλος η ζελατίνη όπου προκαλεί μικρή μείωση της δέσμευσης. Όπως βλέπουμε και στο διάγραμμα 7 το μέλι και το σταφυλόμελο κατόπιν της προσθήκης πηκτικών μέσων δεν παρουσιάζουν μεγάλες αλλαγές στο ποσοστό της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

**Πίνακας 11: Συγκέντρωση περιεχομένου αντιοξειδωτικών προϊόντων μελιού με την προσθήκη αιθέριων ελαίων εκφρασμένη σε  $\mu\text{g}$  ΑΑΕ/g τροφίμου.**

Δείγματα	$\mu\text{g}$ ΑΑΕ/g τροφίμου
Μέλι με αλγινικό νάτριο και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	129,66±0,18
Μέλι με άγαρ και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	135,53±0,01
Μέλι με ξανθάνη και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	134,98±0,01
Μέλι με ζελατίνη και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	114,94±0,03
Μέλι με κόμμι χαρουπιού και με αιθέριο έλαιο γαρίφαλου	73,03±0,11
Μέλι με αλγινικό νάτριο και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	99,12±0,05
Μέλι με άγαρ και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	143,53±0,02
Μέλι με ξανθάνη και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	138,75±0,0
Μέλι με ζελατίνη και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	140,39±0,02
Μέλι με κόμμι χαρουπιού και με αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων	145,12±0,10



**Διάγραμμα 8: Διάγραμμα σύγκρισης της ποσότητας αντιοξειδωτικών των προϊόντων μελιού με πηκτικά μέσα και προσθήκης αιθέριων ελαίων**



Στην περίπτωση του μελιού με την προσθήκη αιθέριων ελαίων φαίνεται στο διάγραμμα 8 πως εκτός από την περίπτωση του αλγινικού νατρίου η αντιοξειδωτική δράση των υπολοίπων προϊόντων αυξάνεται λίγο ή παραμένει στα ίδια επίπεδα με εκείνη των αρχικών δειγμάτων που περιέχουν μόνο τα πηκτικά μέσα.

### **8.1.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης των παραχθέντων προϊόντων**

Το φαινολικό περιεχόμενο του μελιού ανθέων ήταν πολύ μικρότερο από εκείνο του μελοστάφυλου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα όμως και των δύο πρώτων υλών ήταν υψηλή και παρέμεινε κατόπιν της προσθήκης πηκτικών μέσων αλγινικού νατρίου – χλωρούχου ασβεστίου, άγαρ, κόμμεος ξανθάνης, ζελατίνης και κόμμεος χαρουπιού.

Τα αιθέρια έλαια που παρασκευάστηκαν και προστέθηκαν, επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφίας λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και της αντιμικροβιακής τους δράσης. Τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν φάνηκαν και στα αποτελέσματα των αναλύσεων όπου πραγματοποιήθηκαν. Τα αιθέρια έλαια και στις δύο αναλύσεις αύξησαν ή διατήρησαν σταθερά τα αποτελέσματα του φαινολικού περιεχομένου και των αντιοξειδωτικών που περιείχαν τα νέα προϊόντα μελιού με προσθήκη πηκτικών μέσων.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα πιθανόν τα πηκτικά μέσα όπου προστέθηκαν στα προϊόντα να δημιουργούν προβλήματα στη μέτρηση είτε παρεμποδίζοντας τη μέτρηση της απορρόφησης είτε ακόμη τη δέσμευση της ρίζας αντίστοιχα. Συνεπώς θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες με χρήση άλλων ενόργανων τεχνικών όπως HPLC, LC-MS και άλλων προκειμένου να προσδιοριστούν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά τα βιοδραστικά συστατικά των προϊόντων και να γίνουν οι αντίστοιχες συγκρίσεις. Επιπλέον θα ήταν ιδανικό να πραγματοποιηθούν και *in vivo* έρευνες ούτως ώστε να διαπιστωθεί και η πιθανότητα παρεμπόδισης ή μη της απορρόφησης των βιοδραστικών συστατικών από τον ανθρώπινο οργανισμό.

## 8.2 Μικροβιολογικά

### 8.2.1 Αποτελέσματα της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των δειγμάτων

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ώστε να υπάρχει εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $\log(\text{cfu/g}$  προϊόντος).

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάπτυξης ΟΜΧ στα προϊόντα μελιού και μελοστάφυλου εκφρασμένα σε  $\text{cfu/g}$  προϊόντος

Ημέρα ανάλυσης από την ημέρα παραγωγής των προϊόντων	1 <sup>η</sup> ημέρα	6 <sup>η</sup> ημέρα	12 <sup>η</sup> ημέρα	18 <sup>η</sup> ημέρα	31 <sup>η</sup> ημέρα
	Μέσος όρος αποικιών ( $\text{cfu/g}$ προϊόντος)				
Μέλι					0
Μέλι με αλγινικό νάτριο	0	0	0	0	Δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος*
Μέλι με άγαρ	0	0	0	0	0
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	0	1	2	0	0
Μέλι με ζελατίνη	1	1	1	10	50
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	1	1	2	2	3
Με αιθέριο έλαιο βοτάνων					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	0	0	0	0	2
Μέλι με άγαρ	0	0	0	0	0
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	0	0	0	0	0
Μέλι με ζελατίνη	1	2	2	0	0
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	2	3	3	3	4
Με αιθέριο έλαιο γαρίφαλο					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	0	2	2	2	4
Μέλι με άγαρ	0	0	0	0	0
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	0	0	1	1	1
Μέλι με ζελατίνη	2	2	3	3	10
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	1	1	1	1	6
Σταφυλόμελο					0
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο	0	0	0	0	0
Σταφυλόμελο με άγαρ	0	0	0	0	1
Σταφυλόμελο με κόμμι ξανθάνης	0	0	0	0	0
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	0	0	0	0	0
Σταφυλόμελο με κόμμι χαρουπιού	0	0	0	0	2

\*Παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια του προϊόντος μελέτης, συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος, καθώς το προϊόν πλέον κρίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε πως δεν πραγματοποιείται υψηλή ανάπτυξη αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων για όλα τα προϊόντα κατά τη διάρκεια ενός μήνα περίπου. Ο υψηλότερος αριθμός που καταμετρήθηκε ήταν για το μέλι με ζελατίνη όπου την 31<sup>η</sup> ημέρα υπήρξε ανάπτυξη 50 βακτηριακών αποικιών ενώ αντίστοιχα το ίδιο δείγμα με την προσθήκη αιθέριων ελαίων παρουσιάζει μικρή ή καθόλου ανάπτυξη.



**Εικόνα 26: Δείγματα 1<sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ, 2<sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, 3<sup>η</sup> στήλη μέλι με άγαρ και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και 4<sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με άγαρ. Αποτελέσματα 1<sup>η</sup> ημέρας μελέτης μετά την παραγωγή του προϊόντος (απουσία μικροβιακής ανάπτυξης)**

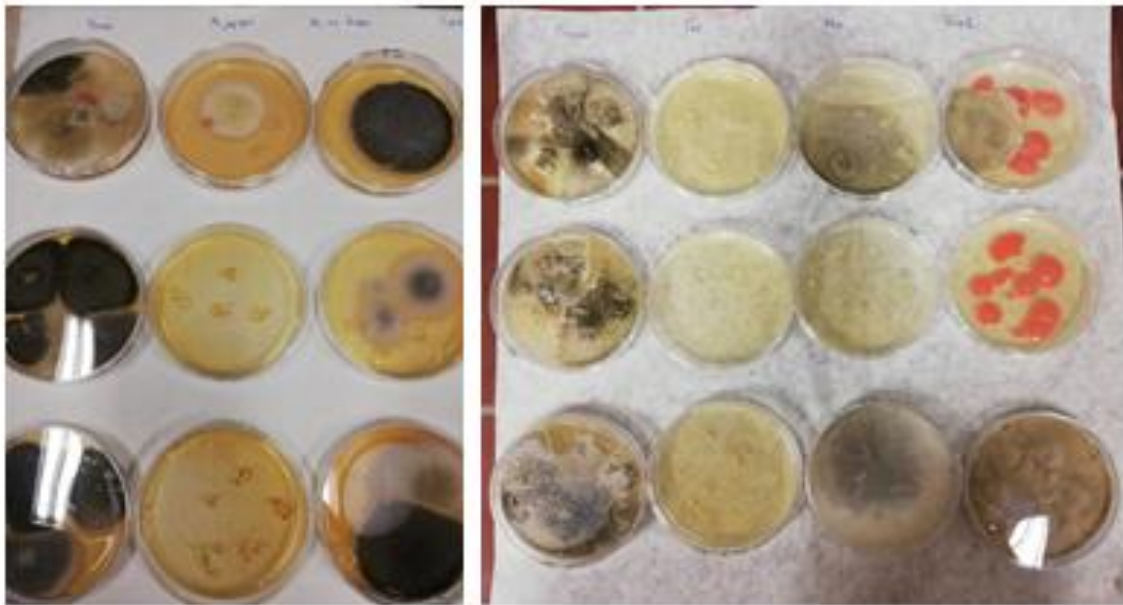
## 8.2.2 Αποτελέσματα ανάπτυξης ζυμών και μυκήτων

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ώστε να υπάρχει εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Παρατηρούμε παρουσία ή απουσία ανάπτυξης μυκήτων και ζυμών στα τρυβλία εμβολιασμού.

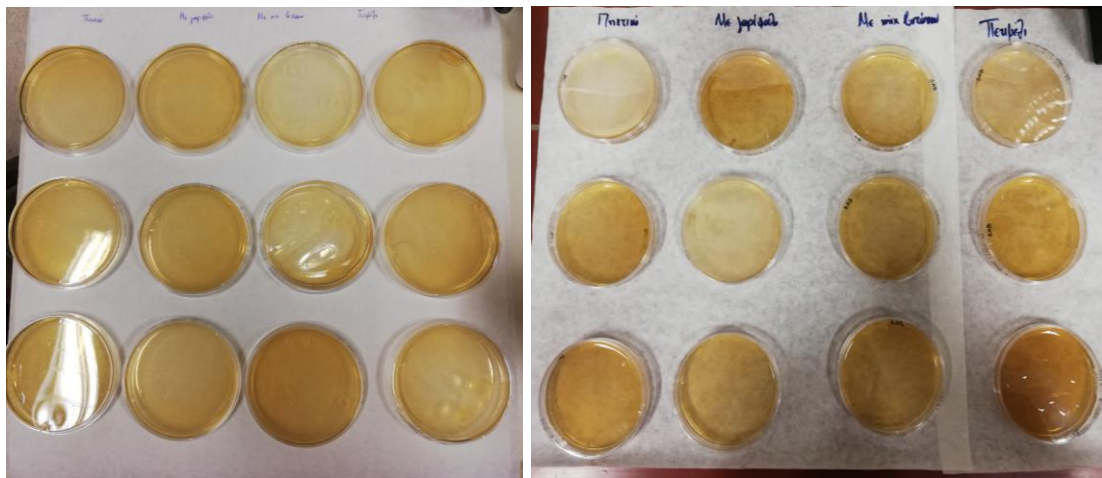
Πίνακας 13: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων ή ζυμών των δειγμάτων

Ημέρα ανάλυσης από την ημέρα παραγωγής των προϊόντων	1 <sup>η</sup> ημέρα	6 <sup>η</sup> ημέρα	12 <sup>η</sup> ημέρα	18 <sup>η</sup> ημέρα	31 <sup>η</sup> ημέρα
	<b>Ανάπτυξη μυκήτων/ζυμών</b>				
<b>Μέλι</b>					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	+	+	+	+	Δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος*
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα χαρουπιού	-	-	-	-	-
Με αιθέριο έλαιο βοτάνων					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	+	+	+	+	+
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα χαρουπιού	-	-	-	-	-
Με αιθέριο έλαιο γαρίφαλο					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	-	-	-	-	-
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμα χαρουπιού	-	-	-	-	-
<b>Σταφυλόμελο</b>					
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο	-	+	+	+	+
Σταφυλόμελο με άγαρ	-	-	-	-	+
Σταφυλόμελο με κόμμα ξανθάνης	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	-	-	-	-	+
Σταφυλόμελο με κόμμα χαρουπιού	-	-	-	+	+

\*Παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια του προϊόντος μελέτης, συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος, καθώς το προϊόν πλέον κρίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση



**Εικόνα 27:** Αριστερά απεικονίζονται 1<sup>η</sup> στήλη μέλι με αλγινικό νάτριο, 2<sup>η</sup> στήλη μέλι με αλγινικό νάτριο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, 3<sup>η</sup> στήλη μέλι με αλγινικό νάτριο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων την 6<sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους. Δεξιά απεικονίζονται ίδιες στήλες με προσθήκη της 4<sup>ης</sup> που αφορά σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο, τα αποτελέσματα αφορούν μελέτη 12<sup>η</sup> ημέρας από την παραγωγή τους.



**Εικόνα 28:** Και στις δύο εικόνες η 1<sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο, η 2<sup>η</sup> στήλη μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, η 3<sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και η 4<sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με πηκτικό μέσο. Αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα για το κόμμα ξανθάνης 6<sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους ενώ δεξιά απεικονίζονται δείγματα με κόμμα χαρουπιού 1<sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή τους.

Από την πρώτη ημέρα μελέτης ανάπτυξης μυκήτων και ζυμών σε θρεπτικό υλικό SAB το μέλι με αλγινικό νάτριο – χλωριούχου ασβέστιο παρουσίασε παρουσία μυκήτων μέχρι και την τελευταία ημέρα μελέτης. Το σταφυλόμελο αντίστοιχα με το ίδιο πηκτικό παρουσιάζει ανάπτυξη από την 6<sup>η</sup> ημέρα παραγωγής των προϊόντων. Η παρουσία του αιθέριου ελαίου γαρίφαλο στα

δείγματα μελιού με αλγινικό φαίνεται πως αναστέλλει την ανάπτυξη μυκήτων και ζυμών αφού δεν παρατηρείται παρουσία αυτών καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Σύμφωνα με τον πίνακα 10 όλα τα υπόλοιπα δείγματα διατηρήθηκαν και δεν παρουσίασαν ανάπτυξη κατά τη διάρκεια ενός μήνα εκτός από το μέλι με κόμμι ξανθάνης και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων, το οποίο παρουσιάζει μυκητιακή ανάπτυξη την τελευταία μέρα μελέτης δηλαδή 31<sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή του προϊόντος.

### 8.2.3 Αποτελέσματα ελέγχου παρουσίας αφλατοξινογόνων μυκήτων.

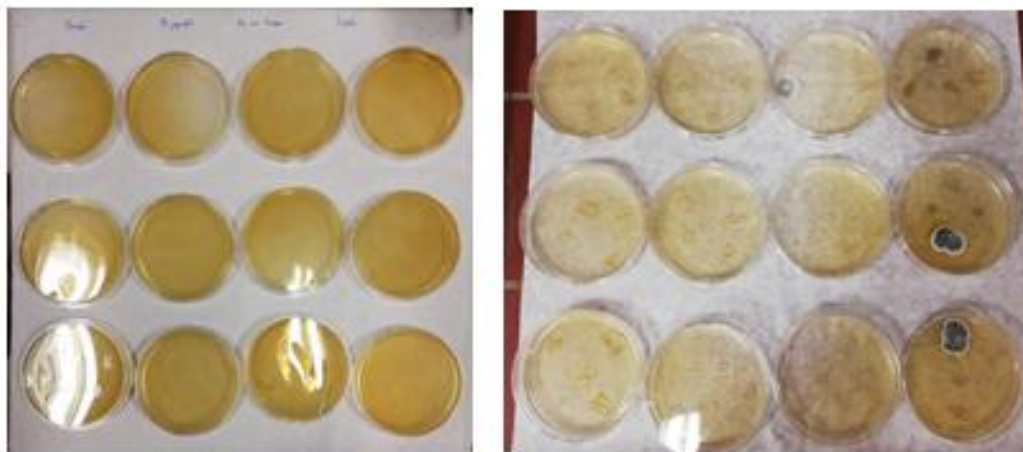
Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ώστε να υπάρχει εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Παρατηρούμε παρουσία ή απουσία ανάπτυξης μυκήτων και πιο συγκεκριμένα παρουσία αποικιών των μυκήτων *A.flavus* και του *A.parasiticus* οι οποίοι αναπτύσσουν έναν έντονο κίτρινοπορτοκαλί χρωματισμό στην αντιστροφή των αποικιών.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάπτυξης μυκήτων ή ζυμών των δειγμάτων

Ημέρα ανάλυσης από την ημέρα παραγωγής των προϊόντων	1 <sup>η</sup> ημέρα	6 <sup>η</sup> ημέρα	12 <sup>η</sup> ημέρα	18 <sup>η</sup> ημέρα	31 <sup>η</sup> ημέρα
	<b>Παρουσία αφλατοξινογόνων μυκήτων</b>				
<b>Μέλι</b>					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	-	-	-	-	Δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος*
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	-	-	-	-	-
<b>Με αιθέριο έλαιο βοτάνων</b>					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	-	-	-	-	-
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	-	-	-	-	-
<b>Με αιθέριο έλαιο γαρίφαλο</b>					
Μέλι με αλγινικό νάτριο	-	-	-	-	-
Μέλι με άγαρ	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι ξανθάνης	-	-	-	-	-
Μέλι με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Μέλι με κόμμι χαρουπιού	-	-	-	-	-

<b>Σταφυλόμελο</b>	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με άγαρ	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με κόμμι ξανθάνης	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με ζελατίνη	-	-	-	-	-
Σταφυλόμελο με κόμμι χαρουπιού	-	-	-	-	-

\*Παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια του προϊόντος μελέτης, συνεπώς δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος, καθώς το προϊόν πλέον κρίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση



*Εικόνα 29: Και στις δύο εικόνες η 1<sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο, η 2<sup>η</sup> στήλη μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο, η 3<sup>η</sup> στήλη αφορά μέλι με πηκτικό μέσο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων και η 4<sup>η</sup> στήλη σταφυλόμελο με πηκτικό μέσο. Αριστερά το πηκτικό μέσο είναι η ζελατίνη κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα από την παραγωγή και δεξιά το πηκτικό μέσο είναι άγαρ κατά τη 12<sup>η</sup> ημέρα.*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 11 μύκητες αναπτύχθηκαν στα δείγματα μελιού και σταφυλόμελου με πηκτικό μέσο το αλγινικό νάτριο και το χλωριούχο ασβέστιο από την πρώτη μέρα παραγωγής των προϊόντων. Σε όλο το χρονικό διάστημα μικροβιολογικής μελέτης δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αφλατοξινογόνων μυκήτων.

#### **8.2.4 Αποτελέσματα χρώσης – Ταυτοποίηση μικροοργανισμών**

Στη συνέχεια ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των αποικιών μυκήτων και ζυμών που αναπτύχθηκαν στα υπό εξέταση προϊόντα. Για τους μύκητες που αναπτύχθηκαν έγινε προσπάθεια ταξινόμησής τους σε κάποιο γένος με βάση τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται. Για την ταυτοποίηση του είδους του μύκητα απαιτούνται περαιτέρω παρατηρήσεις, σχετικά με το μήκος του κάθε στελέχους, το σχήμα και μέγεθος των κύστεων,

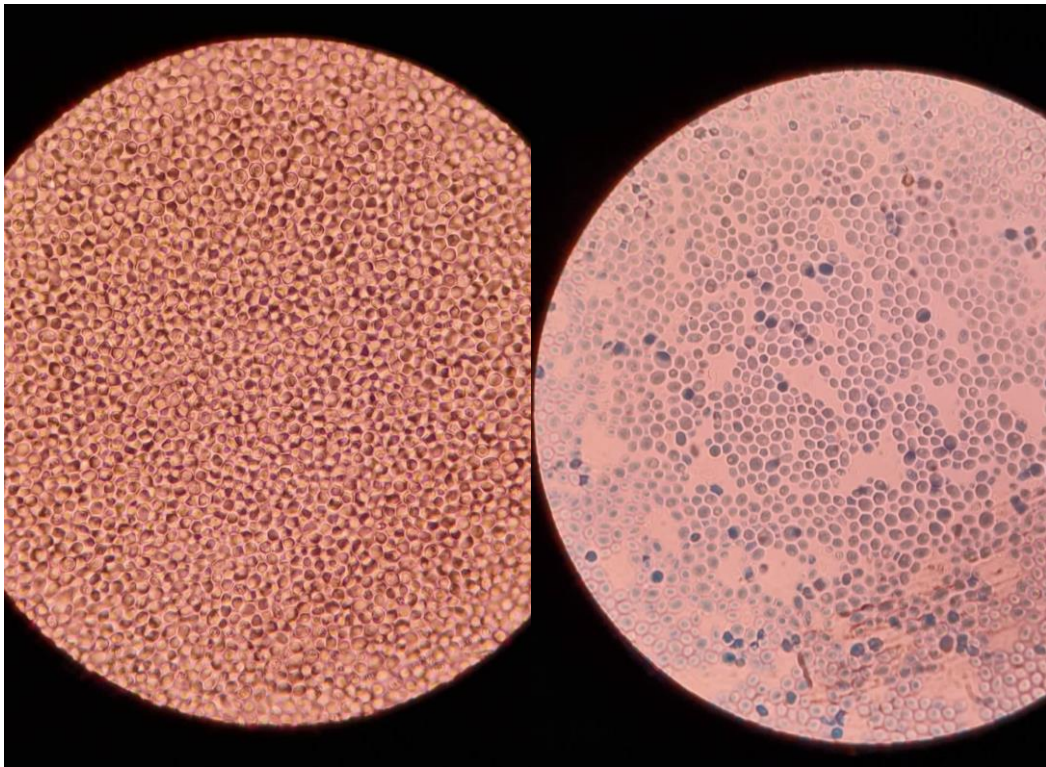
των στηριγμάτων, των φιαλιδίων, των κονιδίων, των ασκοσπορίων και των ασκοκαρπίων (κλειστοθήκιο είναι το σφαιρικό ή σφαιροειδές ασκοκάρπιο).

Σύμφωνα λοιπόν με τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο αναγνωρίστηκαν οι παρακάτω μύκητες σε κάποια από τα δείγματα που έφεραν ανάπτυξη (Πίνακας 12).

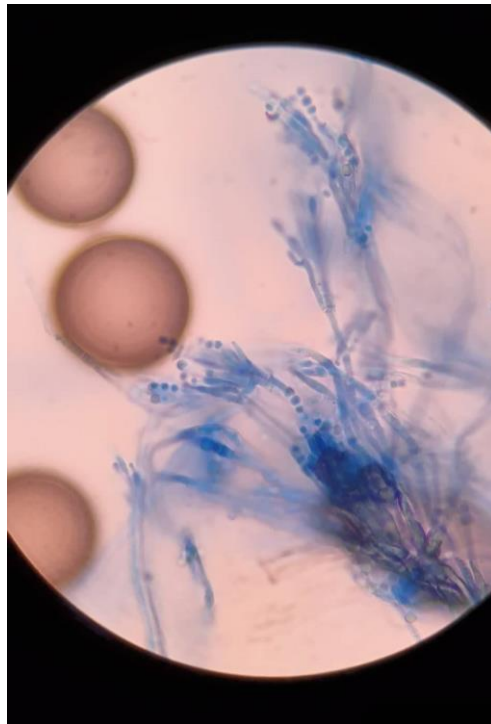
**Πίνακας 15: Μικροοργανισμοί που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο**

<b>Δείγματα</b>	<b>Θρεπτικό Υλικό</b>	<b>Μικροοργανισμός</b>
<b>Σταφυλόμελο με άγαρ</b>	SAB	<i>Penicillium</i>
<b>Μέλι με άγαρ</b>	SAB	<i>Penicillium</i>
<b>Σταφυλόμελο με κόμμα χαρουπιού</b>	SAB	<i>Penicillium</i>
<b>Μέλι με κόμμα χαρουπιού</b>	SAB	<i>Penicillium</i>
<b>Μέλι με αλγινικό νάτριο και αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων</b>	SAB	<i>Aspergillus</i>
<b>Σταφυλόμελο με αλγινικό νάτριο</b>	SAB	Ζυμομύκητες
<b>Μέλι με αλγινικό νάτριο</b>	SAB	<i>Aspergillus</i> Ζυμομύκητες
<b>Μέλι με αλγινικό και αιθέριο έλαιο γαρίφαλο</b>	SAB	<i>Penicillium</i>

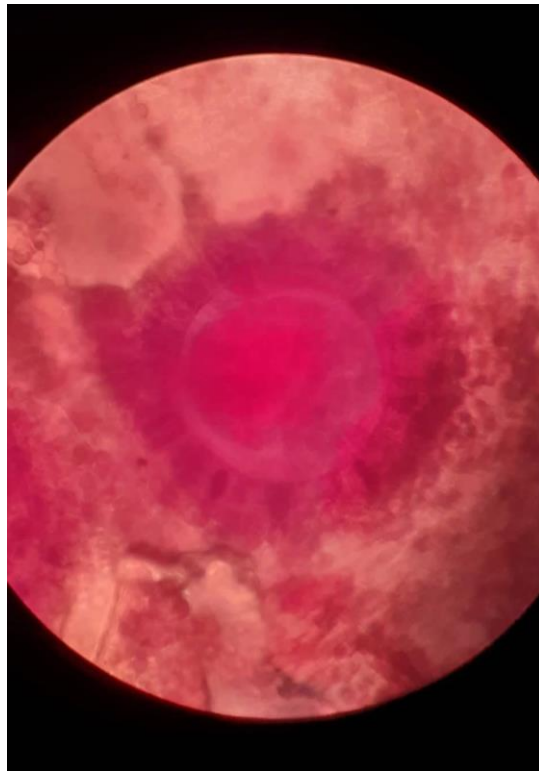




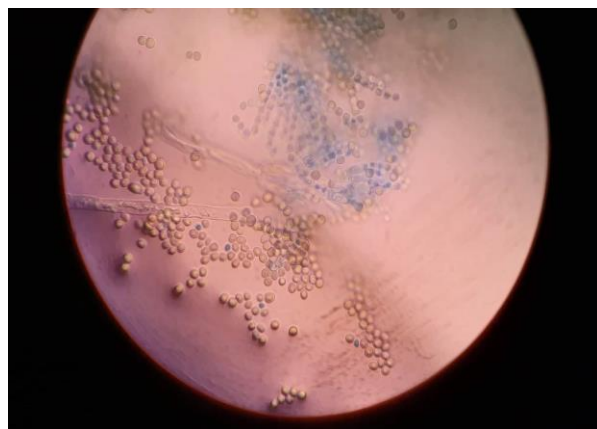
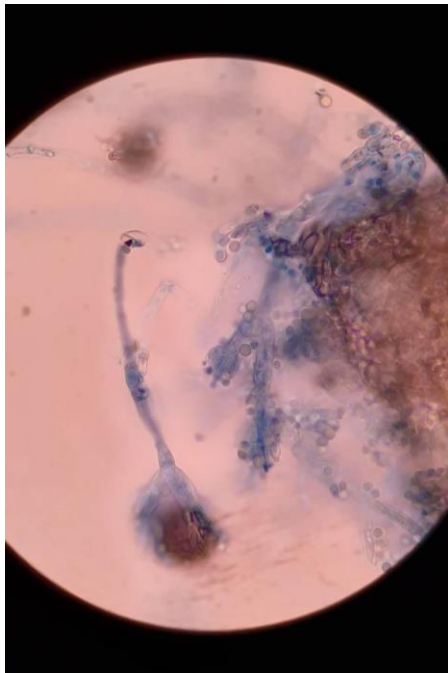
*Εικόνα 30: Ζυμομύκητες που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο*



*Εικόνα 31: Μύκητας Penicillium ο οποίος παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο*



**Εικόνα 32: Μύκητας *Aspergillus* που απομονώθηκε από τα δείγματα**



**Εικόνα 33: Μύκητας *Penicillium* παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο**

### 8.2.5 Συζήτηση αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που δόθηκαν στον πίνακα 9 φαίνεται πως τα δείγματα παρουσιάζουν μηδενικό ή μικρό μικροβιολογικό φορτίο. Η διατήρηση τους σε θερμοκρασία ψύξης 0-6 °C κατόπιν δειγματοληψίας από την ίδια ανοιχτή συσκευασία δεν αποτέλεσε θετικό στοιχείο για την ανάπτυξη βακτηρίων τουλάχιστον στο χρονικό διάστημα του ενός μήνα.

Όσον αφορά την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων όπως διακρίνουμε από τον πίνακα 10 υπάρχει ανάπτυξη από την πρώτη κιόλας ημέρα παραγωγής του μελιού με την προσθήκη αλγινικού νατρίου. Ανάπτυξη μυκήτων πραγματοποιείται και στο πετιμέζι με την προσθήκη αλγινικού νατρίου αλλά αυτή παρατηρείται από την 6<sup>η</sup> ημέρα ζωής του προϊόντος και έπειτα. Η προσθήκη αιθέριων ελαίων φαίνεται πως παρουσιάζει αντιμυκητιακή δράση και πιο συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο γαρίφαλου το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη μυκήτων στα δείγματα μελιού με αλγινικό νάτριο που παρουσίασαν ανάπτυξη χωρίς την προσθήκη του. Το αιθέριο έλαιο βοτάνων δεν παρουσίασε κάποια ανασταλτική δράση. Τα υπόλοιπα δείγματα διατηρήθηκαν και δεν παρουσίασαν ανάπτυξη τόσο στο μέλι όσο και στο σταφυλόμελο. Μόνο το μέλι με κόμμα χαρουπιού την 31<sup>η</sup> ημέρα ανέπτυξε μύκητες. Αντίθετα τα ίδια δείγματα στα οποία είχε γίνει προσθήκη αιθέριων ελαίων παρουσίασαν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, υποδεικνύοντας έτσι την αντιμυκητιακή δράση των χρησιμοποιούμενων αιθέριων ελαίων.

Στην προσπάθεια ταυτοποίησης των μυκήτων και των ζυμών που ανέπτυξαν τα δείγματα, αναγνωρίστηκαν λόγω των χαρακτηριστικών του σχήματος των μυκηλίων, των υφών και των κονιδίων, οι μύκητες γένους *Aspergillus* και *Penicillium*.(Εικόνες 27-29).

Τα δείγματα επιλέχθηκε να μελετηθούν όσον αφορά τη διατηρησιμότητά τους αφού ανοιχτεί η συσκευασία τους ώστε να διαπιστωθεί η ασφάλεια χρήσης τους, δηλαδή τα δείγματα δεν μελετήθηκαν όσον αφορά τη διάρκεια ζωής τους στο ράφι σε κλειστή συσκευασία. Επίσης, δε χρησιμοποιήθηκε κάποιο συντηρητικό στην παραγωγή τους ή κάποιο διάλυμα μέσα στο οποίο θα μπορούσαν να διατηρηθούν καλύτερα έτσι ώστε να μελετηθεί η διάρκεια ζωής τους με τις λιγότερο καλές συνθήκες συντήρησης στις οποίες μπορεί να επέλθει σε ένα απλό οικιακό ψυγείο.



## 9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ:ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 9.1 Αντιοξειδωτική δράση

Το σταφυλόμελο περιέχει μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο από το μέλι ανθέων. Η παρουσία πηκτικών μέσων στο μέλι, δείχνει πως το φαινολικό περιεχόμενο της πρώτης ύλης μειώνεται είτε παρεμποδίζεται ο προσδιορισμός του σύμφωνα με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Ενδεχομένως τα πηκτικά μέσα να παρεμποδίζουν την απορρόφηση και να δίνουν μηδενικό αποτέλεσμα. Όσον αφορά το σταφυλόμελο η προσθήκη πηκτικών μέσων μειώνει το αρχικό φαινολικό περιεχόμενο και περισσότερο η προσθήκη αλγινικού νατρίου. Το κόμμι χαρουπιού προσδίδει στο σταφυλόμελο ένα ποσοστό 25% σε φαινολικό περιεχόμενο. Η προσθήκη αιθέριου ελαίου τελικά παίζει σπουδαίο ρόλο διότι αυξάνει το φαινολικό περιεχόμενο των προϊόντων μελιού μέχρι και 70%(στο κόμμι χαρουπιού) από την πρώτη ύλη. Από τα δύο αιθέρια έλαια που επιλέχθηκαν στην έρευνα το γαρίφαλο έφερε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας το μέλι ανταποκρίνεται λίγο καλύτερα από το σταφυλόμελο. Με την προσθήκη των πηκτικών μέσων και τα δύο υλικά δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μείωσης ή αύξησης της ικανότητας γεγονός που αποδεικνύει πως η προσθήκη τους δε διαφοροποιεί την αντιοξειδωτική δράση της αρχικής πρώτης ύλης. Η προσθήκη των αιθέριων ελαίων όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης δε βοήθησε τα δείγματα με εξαίρεση το αιθέριο έλαιο μίγματος βοτάνων που αύξησε σε πολύ μικρό ποσοστό την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας στα δείγματα με άγαρ, ζελατίνη και κόμμι χαρουπιού. Στην περίπτωση του αλγινικού νατρίου η προσθήκη αιθέριων ελαίων φαίνεται πως μειώνει σε ποσοστό 25% την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Συμπερασματικά λοιπόν, η προσθήκη αιθέριων ελαίων φαίνεται να αυξάνει το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων. Ίσως η επιλογή άλλων αιθέριων ελαίων να έδινε άλλα αποτελέσματα καλύτερα ή χειρότερα. Γενικότερα όμως η δημιουργία προϊόντων με χρήση πηκτικών δε φαίνεται να διαφοροποιεί την αρχική αντιοξειδωτική ικανότητα και αυτό είναι θετικό διότι παραμένουν αναλλοίωτα τα βιοδραστικά συστατικά των πρωταρχικών υλικών του μελιού και του σταφυλόμελου.

## 9.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων διακρίνεται πως τα προϊόντα με τα πηκτικά διατηρούνται τουλάχιστον ένα μήνα αφότου ανοιχτεί η συσκευασία τους σε θερμοκρασία ψύξης. Το μοναδικό δείγμα όπου παρουσίασε από την πρώτη μέρα μύκητες είναι το μέλι με το αλγινικό νάτριο γεγονός που δηλώνει πως ίσως με την προσθήκη αυτού, δημιουργούνται ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη τους. Το ίδιο συμβαίνει και με το σταφυλόμελο, όμως από την 6<sup>η</sup> ημέρα ζωής. Τα αιθέρια έλαια που προστίθενται λειτουργούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες με μεγαλύτερη δράση εκείνη του γαρίφαλου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρώσης των μυκήτων φαίνεται πως δύο γένη μυκήτων αναπτύσσονται στα νέα προϊόντα μελιού και σταφυλόμελου, οι *Aspergillus* και *Penicillium*. Επίσης παρατηρήθηκε και ανάπτυξη ζυμομυκήτων. Χρειάζεται να γίνει πιο διερευνητική μελέτη σχετικά με τα είδη που αναπτύσσονται πιο συγκεκριμένα. Το μέλι και το σταφυλόμελο βάσει βιβλιογραφίας έχουν αντιμικροβιακή δράση.

## ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

- Τα καινοτόμα προϊόντα που δημιουργήθηκαν θα ήταν επιθυμητό να παραχθούν βιομηχανικά και να δημιουργηθεί μία νέα γκάμα προϊόντων όπως εκείνη των περλών σταφυλόμελου, της μαρμελάδας ή ζελέ μελιού και σταφυλόμελου.
- Θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και προσθήκη άλλων αιθέριων ελαίων που θα δίνουν γεύση και άρωμα στα καινοτόμα προϊόντα όπως εκείνο της μαστίχας. Έγινε πειραματική παραγωγή προϊόντων μελιού με ζελατίνη και κόμμι ξανθάνης και προσθήκη αιθέριου ελαίου μαστίχας και το αποτέλεσμα ήταν καταπληκτικό τόσο στην υφή του τελικού προϊόντος όσο και στη γεύση. Νέο προϊόν μαρμελάδας μελιού με γεύση μαστίχας.
- Θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω εάν τα πηκτικά παρεμποδίζουν τη δράση των φαινολικών ουσιών των δειγμάτων όσον αφορά και την απορρόφηση τους από τον ανθρώπινο οργανισμό μέσω *in vivo* μελετών.
- Θα μπορούσαν να γίνουν μικροβιολογικές αναλύσεις για το χρόνο ζωής των προϊόντων σε κλειστή συσκευασία για παραπάνω από έναν μήνα από την παραγωγή των προϊόντων. Το χρόνο ζωής στο ράφι δηλαδή.
- Επίσης, θα ήταν καλύτερο τα προϊόντα ειδικότερα οι πέρλες μελιού και σταφυλόμελου να διατηρούνται σε διάλυμα που θα αποτελείται από λίγο νερό και μέλι και αντίστοιχα σταφυλόμελο ώστε να παραταθεί ο χρόνος ζωής τους.
- Στην αγορά υπάρχουν ήδη πέρλες βαλσάμικου ξυδιού και πέρλες ελαιολάδου οι οποίες χρησιμοποιούνται στη μοριακή κουζίνα, έτσι η συγκεκριμένη μελέτη θα μπορούσε να επεκταθεί και με την παραγωγή προϊόντων με άλλες πρώτες ύλες όπως χυμό πορτοκαλιού.





## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

TPC	Total Phenolic Compounds
SAB	Sabouraud Agar
AFPA	Aspergillus Flavus – Aspergillus paraciticus agar
GA	Gallic Acid
AA	Ascorbic Acid
OMX	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα
H.A.T	Hydrogen Atom Transfer
E.T.	Electron Transfer
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Liang-YuChena,Chien-WeiChengb, Ji-YuanLianga, *Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols*, Food Chemistry, Volume 170, 1 March 2015, Pages 10-15
2. Φωτάκης Χαραλαμπος, *Μεταβολική μελέτη και σύγκριση αποσταγμάτων με φυσικοχημικές και αναλυτικές μεθόδους*, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας, Φεβρουάριος 2013.
3. Sagar B. Kedare & R. P. Singh, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*, J Food Sci Technol (July–August 2011) 48(4):412–422
4. Μαρκάκη Π.,Μαστρονικολή Σ.,«*ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*», Αθήνα 2008, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας Τομέας ΙΙ
5. Κόλλια Ελένη, *Παράγοντες αναστολής της βιοσύνθεσης των μυκοτοξινών σε αγροτικά και βιομηχανοποιημένα προϊόντα*, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας, Ιούλιος 2019.
6. Peter Barham, Leif H. Skibsted, Wender L. P. Bredie, Michael Bom Frøst, Per Møller, Jens Risbo, Pia Snitkjær and Louise Mørch Mortensen, *Molecular Gastronomy: A New Emerging Scientific Discipline*, Chem. Rev. 2010, 110, 2313–2365
7. Ceasar Vegaa, Job Ubbinkb, *Molecular gastronomy: a food fad or science supporting innovative cuisine?*, Trends in Food Science & Technology 19 (2008) 372e382
8. S. R. Shojaei, S. H.Nazari, *Aspergillus and their applications in food industry*, 7th Advances Against Aspergillosis Conference, Manchester, UK, 2016.
9. Γ. Μπαλατσούρας, *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα 2006, Κεφ. 7,8,9

10. Οδηγός για πρόσθετα τροφίμων Αριθμοί Ε, Γενικό Χημείο του Κράτους, 2008
11. Andressa Blainski, Gisely Cristiny Lopes and João Carlos Palazzo de Mello, *Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L.*, *Molecules* 2013, 18, 6852-6865; doi:10.3390/molecules18066852
12. Verica Đorđević, Bojana Balanc, Ana Belsćak-Cvitanović, Steva Lević, Kata Trifković, Ana Kalušević, Ivana Kostić, Draž Ćenka Komes, Branko Bugarski, Viktor Nedović, *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds*, *Food Eng Rev* DOI 10.1007/s12393-014-9106-7
13. Tetsujiro Matsushashi, Agar, Peter Harris, Book *Food gels*, Elsevier Science Publishers Ltd 1990
14. Pitt J.I., Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Journal of Food Protection*, 1993, 56(3): 265-269
15. Thom C., & Raper K.B., *Manual of Aspergilli*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1945
16. Μαρκάκη, Π., *Εργαστηριακές Σημειώσεις Μικροβιολογίας*, Αθήνα, 2003
17. Μπόσκου Δ., Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 1997, 183-184, 214-215
18. Thomas J. Montville, Karl R. Matthews, *Μικροβιολογία Τροφίμων*, έκδοση στην Ελληνική Γλώσσα 2010, 331-339
19. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker, *Βιολογία των μικροοργανισμών*, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007, 1088-1093
20. Χ. Προεστός, Π. Μαρκάκη, Τρόφιμα Έλεγχος Ποιότητας, Ασφάλεια και Μικροβιολογία, Εκδόσεις DaVinci, 2017, 349-356
21. Radomir Lasztity, *Microorganisms Important in Food Microbiology, Vol. III*, Food Quality and Standards, Encyclopedia of Life Support Systems.

22. Rajeev Bhat, Ravishankar V. Rai, and A.A. Karim, *Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns*, Vol 9, 2010, Comprehensive reviews in food science and food safety.
23. Hans P. van Egmond & Ronald C. Schothorst & Marco A. Jonker, *Regulations relating to mycotoxins in food*, Anal Bioanal Chem (2007) 389:147–157.
24. Γιάννης Ζαμπετάκης, Σταμάτης Θεοχάρης, Χαράλαμπος Καραντώνης, Χρυσόστομος Κιρκιλλής, Αθανάσιος Παντελόγλου, Σωτήρης Στασινός, *Νομοθεσία Τροφίμων και διατροφικοί κίνδυνοι*, Εκδόσεις Σταμούλης, 2011, 91-94.
25. Οδηγία 2001/110/ΕΚ του συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 2001 για το μέλι, Παράρτημα Ι.
26. Εγκυκλοπαίδεια Δομή, Έκδοσης 2002-2005, Τόμος 18.
27. Codex Alimentarius, *Standard for Honey*, CXS 12-1981, Adopted in 1981. Revised in 1987, 2001. Amended in 2019.
28. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Χημεία Τροφίμων*, 3<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 2006, 1400, 1415-1428
29. I. Manikis, A. Thrasivoulou, *The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters*, Apiacta 3, 2001, (3):106- 112.
30. Jill A. Snowdon, Dean O. Cliver, *Microorganisms in honey*, International Journal of Food Microbiology 31 (1996) IL26.
31. Nele Gheldof, Xiao-Hong Wang, and Nicki J. Engeseth, Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 5870–5877
32. Hubert OLBRICH, *The molasses, Fermentation Technologist*, Institut für Zuckerindustrie, Berlin (Germany) , Publish by Biotechnologie-Kempe GmbH (2006), 4-7
33. Theodoros Varzakas, Athanasios Labropoulos ,Stylianos Anestis, *Book Sweeteners, Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*, 2012 by Taylor & Francis Group, LLC, 3-5

34. Meryem Goksel, Mahmut Dogan, Omer Said Toker, Seda Ozgen, Kemal Sarioglu, Rasim Alper Oral, *The Effect of Starch Concentration and Temperature on Grape Molasses: Rheological and Textural Properties*, Food Bioprocess Technol (2013) 6:259–271 DOI 10.1007/s11947-011-0705-5.
35. Γενική Εγκυκλοπαίδεια Σύγχρονων Γνώσεων, Υδρία, Τόμος 10, 3185
36. Τζάνος Ιωάννης, Πτυχιακή Εργασία, *Πετιμέζι ένα χωρικό προϊόν, Παραγωγή και Τεχνολογία*, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 2017
37. A. Rana Selcuk, Engin Demiray, Yusuf Yilmaz, *Antioxidant Activity of Grape Seeds Obtained from Molasses (Pekmez) and Winery Production*, Akademik Gıda 9(5) (2011) 39-43.
38. Carla M. Guimaraes, Maria S. Giao, Sidonia S. Martinez, Ana I. Pintado, Manuela E. Pintado, Luis S. Bento and F. Xavier Malcata, *Antioxidant Activity of Sugar Molasses, Including Protective Effect Against DNA Oxidative Damage* *Antioxidant Activity of Sugar Molasses, Including Protective Effect Against DNA Oxidative Damage*, Journal of food science, Vol. 72, Nr. 1, 2007
39. Σαρλής Γ. (1994), *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά*, ΓΠΑ, Αθήνα
40. Mayaud, L., A. Carricajo, A. Zhiri, G. Aubert, 2008. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. Lett. Appl. Microbiol., 47: 167-173.
41. Amorati Riccardo, Foti C. Mario and Valgimigli Luca, 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. . Agric. Food Chem., 2013, 61 (46), pp 10835–10847
42. F. Bakkali, S. Averbek, D. Averbek, M. Idoomar, *Biological effects of essential oils – A review*, Volume 46, Issue 2, February 2008, Pages 446-475.
43. Wang, L., C.L. Weller, 2006. *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends Food Sci. Technol., 17: 300-312.
44. José-Luis Ríos, *Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined*, General Aspects, Part I, Elsevier Inc, 2016.

45. Καπετανάκου Ε. Αναστασία, Διδακτορική Διατριβή, *Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών των Aspergillus και Penicillium sp. και παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012
46. L. Mayaud, A. Carricajo, A. Zhiri, G. Aubert, *Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics*, Letters in Applied Microbiology 47 (2008) 167–173.
47. Lucchesi, M., F. Chemat and J. Smajda, 2004. "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro- distillation", Journal of Chromatography A, 1043(2): 323-327.
48. Meyer-Warnod, B., 1984. *Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. Perfume. Flavorist*, 9: 93-104.
49. A. A. Yadav, S. S. Chikate, R. B. Vilat, M. A. Suryawanshi, G.B.Kumbhar. *Review on Steam distillation: A Promising Technology for Extraction of Essential Oil*, International Journal of Advance Engineering and Research Development Volume 4, Issue 4, April 2017
50. Chrissie, W., 1996. "The Encyclopedia of Aromatherapy." Vermont: Healing Arts Press, pp: 16-21.
51. Dawidowicz, A.L., E. Rado, D. Wianowska, M. Mardarowicz and J. Gawdzik, 2008. *Application of PLE for the determination of essential oil components from Thymus Vulgaris L.* Talanta, 76: 878-884.
52. Soxhlet, F., 1879. "Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes". Dingler's Polytechnisches Journal (in German), 232: 461-465.
53. Κουμπής Α., Λυκάκης Ι, Ρήγας Δ. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Οργανικής Χημείας Ι*, Τμήμα Χημείας Α.Π.Θ 2012
54. Morten Hyldgaard, Tina Mygind and Rikke Louise Meyer, *Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components*, Front. Microbiol., 25 January 2012.
55. Riccardo Amorati, Mario C. Foti, and Luca Valgimigli, *Antioxidant Activity of Essential Oils*, J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 10835–10847.

56. Γιαννακουδάκη Άννα, Αναστασοπούλου Ευαγγελία, Πτυχιακή Εργασία, *Αιθέρια έλαια: η άλλη όψη του νομίσματος*, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, 2014
57. Ilhami Gulcin, *Antioxidant activity of food constituents: an overview*, Arch Toxicol (2012) 86:345–391
58. Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G., *Structure-Antioxidant Activity relationships of flavonoid and phenolic acids*. Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20: 933-956
59. Om P. Sharma & Tej K. Bhat, *DPPH antioxidant assay revisited Food Chemistry*, 2009, 113(4):1202–1205
60. Fereidoon Shahidi, Ying Zhong, and Anoma Chandrasekara. *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits. Antioxidants and human health*, John Wiley & Sons, Inc., 2012, 273-295
61. Ζαμπετάκης Γιάννης, Μαρκάκη Παναγιώτα, Προεστός Χαράλαμπος, *Χημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλης, 2014
62. Bueno J. M., Ramos-Escudero F., Saez-Plaza P., Munoz A. M., Jose Navas M. and Asuero, A. G. *Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2012, 42(2):102-125
63. Viktor Nedovica, Ana Kalusevica, Verica Manojlovicb, Steva Levica, Branko Bugarski, *An overview of encapsulation technologies for food applications*, Procedia Food Science 1 (2011) 1806 – 1815
64. Science & Cooking: *From Haute Cuisine to Soft Matter Science (chemistry)*, Course, Harvard University
65. Wilma J. Sime, Alginates, P. Harris (ed.), *Food Gels*, Chapter 2, Elsevier Science Publishers Ltd 1990
66. Edwin R. Morris, P. Harris (ed.), *Food Gels*, Chapter 8, Elsevier Science Publishers Ltd 1990
67. F. A. Johnston-Banks, P. Harris (ed.), *Food Gels*, Chapter 7, Elsevier Science Publishers Ltd 1990