

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της σταθερότητας του χρώματος χυμού ροδιού κατά
την ενσωμάτωσή του σε πηκτές πηκτίνης διάφορου βαθμού
μεθυλίωσης παρουσία συγχρωστικών ενώσεων**

ΔΙΟΝΥΣΙΑ Σ. ΜΠΙΣΚΙΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΧΡΥΣΑΥΓΗ ΓΑΡΔΕΛΗ

ΑΘΗΝΑ
Μαΐος 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της σταθερότητας του χρώματος χυμού ροδιού κατά την ενσωμάτωσή του σε πηκτές πηκτίνης διάφορου βαθμού μεθυλίωσης παρουσία συγχρωστικών ενώσεων

Stability determination of pomegranate juice color when incorporated into high and low methoxyl pectin gels and the co-chromatization effect of phenolic acids

ΔΙΟΝΥΣΙΑ Σ. ΜΠΙΣΚΙΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
Βασιλική Ευαγγελίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α
Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Περίληψη

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών που βρίσκονται στον χυμό του ροδιού. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές και υπεύθυνες για το κόκκινο, μωβ και ιώδες χρώμα στα φρούτα και τα λαχανικά. Το ελκυστικό κόκκινο χρώμα είναι το πιο σημαντικό κριτήριο ποιότητας στον χυμό των φρούτων που περιέχουν ανθοκυανίνες, συμπεριλαμβανομένου και του χυμού από ρόδι. Δυστυχώς, όμως είναι ιδιαίτερα ασταθείς και αποικοδομούνται, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καφέ χρώματος κατά την επεξεργασία και την αποθήκευσή τους. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών, όπως η θερμοκρασία επεξεργασίας και αποθήκευσης, η φύση των ανθοκυανινών (ακυλίωση ή γλυκοζυλίωση), το pH, το ασκορβικό οξύ, το υπεροξείδιο υδρογόνου, τα σάκχαρα, το φως και τα μέταλλα (Turfan et al., 2011).

Το χρώμα αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα ποιότητας των τροφίμων. Διευκολύνει τη διάκριση των νωπών τροφίμων, συνεισφέρει στη γεύση και κυρίως επηρεάζει την αποδοχή ή την απόρριψη ενός προϊόντος. Η ανάγκη για χρωστικές πρόσθετα τροφίμων υπάρχει προκειμένου να αντισταθμιστούν οι απώλειες του χρώματος λόγω επεξεργασίας και αποθήκευσης των προϊόντων αλλά και για τον χρωματισμό προϊόντων που δεν διαθέτουν φυσικό χρώμα, όπως τα γλυκά και τα ποτά. Η αντικατάσταση των τεχνητών χρωστικών από φυσικές αποτελεί συνεπώς σημαντική πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων και γι' αυτό το λόγο οι ανθοκυανίνες αποκτούν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην παραγωγή κόκκινων, μωβ και μπλε φυσικών χρωστικών στα τρόφιμα. Η έρευνα για την αποτελεσματική εφαρμογή τους ως χρωστικές τροφίμων εστιάζεται κυρίως στη βελτίωση της σταθερότητάς τους. Αναφορικά με τις ανθοκυανίνες το ενδιαφέρον εστιάζεται στη μελέτη της επίδρασης στη δομή των ανθοκυανινών, παραγόντων όπως το pH, η θερμοκρασία, το φως και το οξυγόνο αλλά και των αλληλεπιδράσεών τους με συστατικά των τροφίμων όπως είναι οι συγχρωστικές, τα σάκχαρα, το ασκορβικό οξύ και τα ένζυμα στην σταθερότητα του χρώματός τους (Buchweitz et al., 2013b).

Για τους παραπάνω λόγους, στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η σταθερότητα του χρώματος χυμού ροδιού (ποικιλία Ερμιόνη) κατά την ενσωμάτωσή του σε πηκτές πηκτικής υψηλής και χαμηλής μεθυλίωσης με ή χωρίς την παρουσία μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος. Η αποθήκευση των πηκτών έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) με χρονική διάρκεια 2 μηνών. Για την παρακολούθηση των χημικών μεταβολών των ανθοκυανινών και συνεπώς της μεταβολής του χρώματος

πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της συγκέντρωσης των προϊόντων πολυμερισμού τους, της συγκέντρωσης των ολικών μονομερών, μέτρηση του χρώματος στο σύστημα CIE Lab και συσχέτισης του με την ενεργότητα ύδατος. Σε όλα τα δείγματα εκτιμήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση τους. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που συγκρατήθηκαν στο πλέγμα της πηκτής έγινε με εκχύλιση με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε η θετική επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης (4°C) στη σταθερότητα των ανθοκυανινών του χυμού από τα επισπέρμια του ροδιού, καθώς και στην σταθερότητα του κόκκινου χρώματος. Το καφεϊκό οξύ δρα ως συγχρωστικός παράγοντας κυρίως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ACN φάνηκε ότι η παρουσία του ευνοεί την συγκράτηση κυρίως του μονογλυκοζίτη και διγλυκοζίτη της Cy-. Τέλος η προσθήκη μαννιτόλης φαίνεται να παρεμποδίζει έως ένα βαθμό τις αντιδράσεις αποικοδόμησης και πολυμερισμού των ανθοκυανινών.

Επιστημονική Περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις Κλειδιά: Ρόδι, Χυμός, Ανθοκυανίνες, Πηκτίνες, Βαθμός Μεθυλίωσης, Καφεϊκό Οξύ, Φαινολικά Οξέα, Μαννιτόλη, HPLC, SPE

Abstract

Anthocyanins (ACNs) are the largest and most important group of flavonoids present in pomegranate juice (PJ). ACNs are water soluble pigments and responsible for the red, purple and blue color in fruits and vegetables. An attractive red color is the most important quality criteria for fruit juices containing anthocyanins, including pomegranate juice. ACNs are also responsible for the orange, red and blue colors of many fruits and vegetables. Unfortunately, ACNs are unstable and susceptible to degradation, leading to a brownish color during processing and storage. Various factors affect the stability of ACNs, including the temperature of processing and storage, the chemical nature of ACNs (acylation or glucosylation), pH, ascorbic acid, hydrogen peroxide, sugars, light and metals. (Turfan et al., 2011).

Color is the most important quality attribute of food. It facilitates the distinction between fresh and aged food, adds to the flavor and predominantly influences acceptance or rejection of a product. Food coloring is predominantly applied to compensate for color losses due to processing and storage, and dyeing products lacking inherent color, such as sweets and beverages. Substitution of artificial dyes by their natural counterparts is therefore a major challenge for the food industry, and anthocyanins have gained increasing interest as red, purple and blue natural food colorants. However, their successful application mainly depends on stability improvements. Referring to ACNs, much interest has been dedicated to the impact of anthocyanin structure, extrinsic factors (pH, temperature, light and oxygen), and interactions with food ingredients such as co-pigments, sugars, ascorbic acid and enzymes on pigment stability (Buchweitz et al., 2013b).

For these reasons, in the present study the stability of pomegranate juice (variety Ermioni) was investigated during its integration into gels from high and low methoxy pectin with or without the presence of D-Mannitol and Caffeic Acid. The gels were stored at different temperatures (4°C and 20°C) and tested during a 2 months period. To monitor the chemical changes of anthocyanins and therefore the color change we conducted measures about the polymeric products that occurred, the determination of the total monomeric anthocyanin content, the color changes by CIE Lab and the color change was associated with the water activity (a_w). Total phenolic content and antioxidant capacity were evaluated in all model systems. Determination of anthocyanin contents that were absorbed into gel were monitored by solid phase extraction (SPE) and high pressure liquid chromatography (HPLC).

The results of the present study showed a positive effect of storage temperature (4 °C) on the stability of anthocyanins from pomegranate juice, as well as on the stability of the red color. Caffeic acid acts as a cohesive agent mainly at room temperature, while the quantitative determination of ACN has shown that its presence favors the retention of mainly

Cyg monoglycoside and diglycoside. Finally, the addition of D-Mannitol appears to inhibit to some extent the decomposition and polymerization reactions of anthocyanins.

Scientific Area: Food Chemistry

Key Words: Pomegranate, Juice, ACNs, Pectin Gels, DE Value, DM Value, Caffeic Acid, Phenolic Acids, D-Mannitol, HPLC, SPE

Στους γονείς μου Ελένη και Σπύρο και στην αδερφή μου Ηρώ

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020 στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και της συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας υπήρξαν ορισμένοι άνθρωποι που με βοήθησαν και με καθοδήγησαν ουσιαστικά και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Χρυσανγή Γαρδέλη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την στήριξη, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής και συγγραφής αυτής της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους Δρ. Βασιλική Ευαγγελίου και Δρ. Αθανάσιο Μαλλούχο για τις υποδείξεις και τις σημαντικές παρατηρήσεις τους επάνω στην εργασία.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ιωάννα Μαντάλα για τη φιλοξενία που μας παρείχε στο εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων καθώς και τους φοιτητές που με βοήθησαν στη μέτρηση της ενεργότητας ύδατος, που συμπεριλαμβάνεται στην παρούσα μελέτη.

Βεβαίως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, που με στήριζε συνεχώς, κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και χωρίς την βοήθεια της οποίας δεν θα είχα καταφέρει να υλοποιήσω όλους τους στόχους και τα όνειρά μου, τα οποία έχω επιτύχει μέχρι σήμερα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου Μαρία Σταυροπούλου όπως επίσης και όλους όσους συνυπήρξαμε στο εργαστήριο για το καλό κλίμα συνεργασίας, αλλά και τη βοήθειά τους σε ορισμένες περιπτώσεις

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	3
Abstract.....	5
Ευχαριστίες	7
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή	12
1.1. Ιστορική Αναδρομή	12
1.2. Γενικά Στοιχεία για το Ρόδι	12
1.3. Ποικιλίες Ροδιάς.....	14
1.3.1. Ελληνικές Ποικιλίες.....	16
1.3.2. Ξένες Ποικιλίες.....	16
1.4. Χημική Σύσταση του Ροδιού	17
1.5. Πολυφαινόλες	19
1.5.1. Φλαβονοειδή	19
1.5.2. Φαινολικά Οξέα	20
1.5.3. Ταννίνες	20
Κεφάλαιο 2 ^ο : Ανθοκυανίνες	22
2.1. Χημική Δομή Ανθοκυανινών	22
2.2. Χρώμα Ανθοκυανινών.....	24
2.3. Σταθερότητα των Ανθοκυανινών	25
2.3.1. Συγκέντρωση.....	25
2.3.2. Θερμοκρασία	25
2.3.3. Οξυγόνο	25
2.3.4. pH.....	26
2.3.5. Ένζυμα και Σάκχαρα.....	27
2.3.6. Χρώμα και Δομή.....	28
2.3.7. Συγχρωμάτωση	28
Κεφάλαιο 3 ^ο : Πηκτίνες	30
3.1. Εισαγωγή	30
3.2. Δομή	30
3.3. Κατηγορίες Πηκτινών	32
3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό πηκτής	33
3.5. Μηχανισμός Πήξης.....	34
3.5.1. Μηχανισμός Πήξης HM Πηκτινών	34
3.5.2. Μηχανισμός Πήξης LM Πηκτινών	35
3.6. Σακχαρόζη	37

3.7.	D - Μαννιτόλη	38
	Κεφάλαιο 4 ^ο : Τεχνικές και Μέθοδοι.....	39
4.1.	Φασματοσκοπικές Τεχνικές	39
4.2.	Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού.....	39
4.2.1.	Προσδιορισμός Ολικών Μονομερών Ανθοκυανινών	40
4.2.2.	Χρώμα Πολυμερισμού	40
4.2.3.	Μέθοδος Folin – Ciocalteu.....	41
4.2.4.	Προσδιορισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με την Μέθοδο DPPH	41
4.3.	Μέτρηση Χρώματος	43
4.4.	Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	44
5.4.1.	Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών	46
	Σκοπός.....	48
	Κεφάλαιο 5 ^ο : Πειραματικό Μέρος.....	49
5.1.	Προετοιμασία Χυμού.....	49
5.2.	Διαλύτες και Αντιδραστήρια.....	49
5.3.	Υλικά – Σκεύη - Όργανα	50
5.4.	Παρασκευή Διαλυμάτων	51
5.4.1.	Ρυθμιστικό διάλυμα Τρυγικού Οξέος, pH 3.0	51
5.4.2.	Διάλυμα Συγχρωμάτωσης Καφεϊκού Οξέος	51
5.4.3.	Διάλυμα Χλωριούχου Ασβεστίου (CaCl ₂).....	51
5.4.4.	Ρυθμιστικό Διάλυμα Χλωριούχου Καλίου (pH 1.0)	52
5.4.5.	Ρυθμιστικό Διάλυμα κιτρικού οξέος (pH 3.5) (για τη μέτρηση των πολυμερών)	52
5.4.6.	Ρυθμιστικό Διάλυμα Οξικού Νατρίου, 0,4M (pH 4.5) (για τη μέτρηση των μονομερών). 52	
5.4.7.	Διάλυμα Μεταδιθειώδους Καλίου (για τη μέτρηση των πολυμερών)	53
5.4.8.	Παρασκευή κινητής φάσης HPLC	53
5.5.	Προετοιμασία Πηκτών.....	54
5.5.1.	Εκχύλιση Ανθοκυανινών από τις Πηκτές	55
5.6.	Φασματοφωτομετρικοί Προσδιορισμοί	56
5.6.1.	Προσδιορισμός ολικών μονομερών ανθοκυανινών	56
5.6.2.	Χρώμα Πολυμερισμού	57
5.6.3.	Προσδιορισμός του Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη δοκιμή Folin - Ciocalteu (TPC) 58	
5.6.4.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	59
5.7.	Σταθερότητα Χρώματος	60
5.8.	Μέτρηση Ενεργότητας Ύδατος.....	61
5.9.	Προσδιορισμός Ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	61

5.9.1.	Διαδικασία Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	61
5.9.2.	Ανάλυση των Ανθοκυανινών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	62
5.9.2.1.	Συνθήκες Ανάλυσης	62
5.9.2.2.	Διάλυμα παρακαταθήκης εξωτερικού προτύπου	63
5.9.2.3.	Διαλύματα βαθμονόμησης του χλωριδίου της κυανιδίνης	64
5.9.	Στατιστική Ανάλυση	64
	Κεφάλαιο 6°	65
	Αποτελέσματα-Συζήτηση	65
6.1.	Προσδιορισμός Ολικών Μονομερών Ανθοκυανινών.....	65
6.2.	Χρώμα Πολυμερισμού Ανθοκυανινών.....	67
6.3.	Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU.....	69
6.4.	Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη δοκιμή DPPH	70
6.5.	Χρώμα.....	72
6.6.	Ενεργότητα ύδατος	79
6.7.	Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών του χυμού ροδιού με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC).....	80
6.8.	Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών που συγκρατήθηκαν στις Πηκτές	82
6.8.1.	Συγκράτηση ανθοκυανινών από τις πηκτές	82
6.8.2.	Η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στις ανθοκυάνες.....	84
	Συμπεράσματα	88
	Βιβλιογραφία.....	90
	Ιστοσελίδες	94
	Ελληνική Βιβλιογραφία	95
	Ξένα Βιβλιογραφία.....	90

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Το ρόδι (*Punica Granatum*) αποτελεί καρπό του φυτού ροδιά. Η ροδιά είναι φυτό του γένους πουνική (*Punica*) της οικογένειας πουνικίδες (*Punicaceae*) και ανήκει στην τάξη των μυρτωδών (*Myrtales*) (Longtin 2003). Το ρόδι αποτελεί για τον άνθρωπο ένα σύμβολο με πολύπλευρες ερμηνείες, με βασικότερες να είναι αυτές της ζωής, της υγείας, της μακροζωίας, τη γονιμότητας και της πνευματικότητας. Στον καρπό της ροδιάς, από την αρχαιότητα, αποδίδονταν φαρμακευτικές ιδιότητες, είτε ως αντιπαρασιτικό, είτε ως θεραπεία για προβλήματα του γαστρεντερικού συστήματος, όπως το έλκος και οι διάρροιες κ.α. (Aviram et al. 2000).

Κατάγεται από τη δυτική Ασία και πιο συγκεκριμένα από την περιοχή μεταξύ του σύγχρονου Ιράν, της οροσειράς των Ιμαλαΐων και της Βόρειας Ινδίας. (Faria, Calhau 2011) Οι πρώτες αναφορές που τοποθετούν το ρόδι στις χώρες γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου, έγιναν από την εποχή της ελληνικής μυθολογίας και του Ομήρου. Στην περιοχή της Λατινικής Αμερικής εισήχθη στα τέλη του 16ου αιώνα. Τέλος εντάχθηκε στην περιοχή της σημερινής Καλιφόρνια, μέσω των Ισπανών αποικιοκρατών το 1769 περίπου.

Σήμερα, καλλιεργείται ευρέως σε ολόκληρη την περιοχή της Μέσης Ανατολής και του Καυκάσου, τη βόρεια και τροπική Αφρική, τη Νότια και Κεντρική Ασία, τα ξηρότερα τμήματα της νοτιοανατολικής Ασίας και σ' ολόκληρο το μήκος της λεκάνης της Μεσογείου. Καλλιεργείται επίσης και στα ξηρότερα μέρη των Η.Π.Α, όπως είναι οι πολιτείες της Αριζόνα και της Καλιφόρνιας (Fadavi et al 2006).

Με την πάροδο των χρόνων και φτάνοντας στην σημερινή εποχή οι χρήσεις του ροδιού εκτείνονται σ' ένα ευρύ φάσμα, από την απλή καθημερινή μαγειρική του χρήση έως τον τομέα της ιατρικής. Χαρακτηριστική είναι η συμβολή του στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων του αλλά και στην καλή στοματική υγιεινή καθώς είναι πλούσιο σε αντιμικροβιακά. Τέλος χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα των καλλυντικών, κυρίως ως χρωστική (Vidal et al. 2003).

1.2. Γενικά Στοιχεία για το Ρόδι

Η ροδιά είναι φυλλοβόλος και αγκαθωτός θάμνος με το μέσο ύψος της να κυμαίνεται μεταξύ 1 με 1.5 μέτρο, ενώ ακόμα και οι πιο ανεπτυγμένες δεν ξεπερνούν τα 5 μέτρα. Η ρίζα της είναι ισχυρή γονατώδης και ο κορμός της διακλαδίζεται χαμηλά προκαλώντας πυκνή βλάστηση. Καλύπτεται από έναν κοκκινωπό φλοιό, ο οποίος αργότερα γίνεται γκρίζος. Ο κορμός της ροδιάς δε έχει κανονικό κυλινδρικό σχήμα αλλά φέρει στρεβλώσεις. Οι βλαστοί της ροδιάς στην αρχή αναπτύσσονται κατακόρυφα και κατόπιν αποκτούν κρεμοκλαδή εμφάνιση. Οι νεαροί βλαστοί, ιδιαίτερα στις πλευρικές δια-κλαδώσεις, φέρουν στις απολήξεις τους αγκάθια.

Οι οφθαλμοί είναι ξυλοφόροι ή μικτοί καρποφόροι και βρίσκονται στα πλάγια των βλαστών (Ποντίκης, 1996). Αμφότεροι, εκπτύσσονται την άνοιξη, στα μέσα περίπου του Απριλίου δίνοντας κανονική ή βραχεία βλάστηση αντίστοιχα (Δρογούδη Π., 2007).

Τα φύλλα της ροδιάς είναι λεία, στενά, επιμήκη λογχοειδούς σχήματος, αρχικά κοκκινωπού χρώματος που έπειτα εξελίσσονται σε βαθύ πράσινο, και μήκους 3-7 εκ. και πλάτους περίπου 2 εκ. Το κάθε δέντρο μπορεί να φέρει περισσότερα ή λιγότερα αγκαθωτά φύλλα το καθένα με το ανώτερο τους τμήμα να είναι πιο γυαλιστερό και να περιέχουν ιδιοβλάστες με εκκριτικές ουσίες οι οποίες ακόμα δεν έχουν αναγνωριστεί. (D. Holland et al, 2009). Φέρουν κοντό μίσχο και εκφύονται πυκνά και σε αντίθετη διάταξη. Το κάθε φύλλο αποτελείται από 4-5 πέταλα το καθένα. Οι περισσότερες ποικιλίες ροδιάς είναι φυλλοβόλες, υπάρχουν όμως και αείφυλλες (Δρογούδη et al. 2012).

Τα άνθη της είναι ακτινόμορφα, διγενή με διπλό συνήθως 6μελές περιάνθιο, μονήρη ή σχηματίζουν κυματοειδής ταξιανθίες και κατά βάση φέρουν το κόκκινο χρώμα ενώ συναντάμε και λευκά ανάλογα με την ποικιλία. Εκπτύσσονται ατομικά ή ανά 3-5. Τα άνθη φέρονται σε ομάδες των 2-7, στην άκρη της τρέχουσας βλάστησης. Έχουν πολύ μικρό ποδίσκο και πολύ σκληρό, σαρκώδη κάλυκα, που αποτελείται από 5-8 παχιά και σαρκώδη σέπαλα, συνενωμένα μεταξύ τους και έχουν στρογγυλό σχήμα. Τα άνθη φέρουν πολυάριθμους στήμονες. Ο στύλος είναι μονήρης και φέρει στην κορυφή πεπλατυσμένο στίγμα. Διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

- τα άγονα τα οποία είναι κωνικά στη βάση τους, βραχύστυλα και βραχυστήμονα ενώ το στίγμα τους βρίσκεται πολύ χαμηλότερα των ανθέρων, και
- τα καρποφόρα τα οποία είναι κυλινδρικά στην βάση τους, μακρόστυλα και μακροστήμονα, έγχρωμα, με το στίγμα τους να βρίσκεται στο ύψος των ανθέρων (Βαχαμίδης & Βέμμος, 2009).

Η ανθοφορία διαρκεί ένα μήνα και στην αρχή της το χρώμα των ανθών είναι πράσινο και στη συνέχεια γίνεται κόκκινο και μπορεί να δώσει 3 κύματα ανθών. Τα πιο πρώιμα θεωρούνται πιο γόνιμα. Τα άγονα άνθη και μεγάλο ποσοστό των γόνιμων πέφτουν μετά την άνθηση. Γονιμοποίηση του 5% των γόνιμων ανθών δίνει μεγάλη παραγωγή.

Οι καρποί (τα ρόδια) σχηματίζονται στην κορυφή των κλαδιών της χρονιάς. Η εποχή ωρίμανσής τους είναι μεταξύ του μήνα Σεπτεμβρίου και Οκτωβρίου. Σε περίοδο αξιολογής καρποφορίας εισέρχεται από τον 3^ο χρόνο της ηλικίας της, με μέση απόδοση 300 κιλά ανά στρέμμα, στο 4^ο έτος 800 κιλά ανά στρέμμα, στο 5^ο έτος στα 1200 κιλά ανά στρέμμα και σταθεροποιείται από το 6^ο έτος στα 2000 κιλά ανά στρέμμα. Συνολικά η παραγωγική της ζωή διαρκεί από 40 έως 50 έτη (Δρογούδη et al. 2012). Για την αμφίδρομη αύξηση τόσο της παραγωγής όσο και της ποιότητας των καρπών ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας αποτελούν τα δροσερά και ποτιστικά εδάφη με pH που κυμαίνεται από 5.5 έως 7.

Το ρόδι ως καρπός, ανατομικά μπορεί να διαχωριστεί σε 3 βασικά τμήματα:

- τον φλοιό (peel),
- τα επισπέρμια (arils) και
- τα σπέρματα (seeds)

Ο καρπός αναπτύσσεται από την ωοθήκη του άνθους και είναι σαρκώδης ράγα. Σχηματίζεται επάκρια αλλά και κατά μήκος των ετήσιων βλαστών, στις μασχάλες των φύλλων. Έχει σχήμα σφαιρικό κι ο φλοιός είναι κιτρινοπράσινος, ανάλογα με την ποικιλία (Βαχαμίδης και Βέμμος, 2009). Ο κάλυκας (κορώνα) βρίσκεται απέναντι από το βραχύ ποδίσκο και μοιάζει με στέμμα. Η κορυφή αυτής της κορώνας είναι από σχεδόν κλειστή έως εντελώς ανοικτή, ανάλογα με την ποικιλία και τη φάση ωρίμανσης (Holland et al. 2009). Ο φλοιός (peel) του ροδιού είναι δερματώδης και το πάχος της εξαρτάται από την ποικιλία του ροδιού.

Εσωτερικά του φλοιού βρίσκεται το μεσοκάρπιο (albedo) το οποίο αποτελείται από μεμβρανώδη, σπογγώδη ιστό με παχιά λευκοκίτρινα τοιχώματα πάνω στους οποίους προσφύονται τα σπέρματα (Δρογούδη et al. 2012). Τα σπέρματα περικλείονται σε σπόρους, τα επισπέρμια (arils), και είναι σκληρά ή ημίσκληρα ανάλογα την ποικιλία (Holland et al. 2009). Οι σπόροι χωρίζονται σε ομάδες με λεπτές μεμβράνες λευκού ή υπο-κίτρινου χρώματος.

Υπάρχει βασική ανομοιομορφία στην σύσταση του καρπού με το 50% αυτού να αντιστοιχεί στον φλοιό και το υπόλοιπο 50% στο εσωτερικό τμήμα (εδώδιμο). Το εδώδιμο μέρος του καρπού είναι τα επισπέρμια ενώ οι εσωτερικές μεμβράνες και η φλούδα δεν καταναλώνονται λόγω της στυφής τους γεύσης που δικαιολογείται από τη μεγάλη περιεκτικότητα σε ταννίνες. Βασικό παράγωγο είτε ολόκληρου του καρπού είτε μόνο των επισπερμίων είναι ο χυμός του ροδιού που αποτελεί περίπου το 30-40% του συνολικού βάρους του ροδιού (Medjaković & Jungbauer 2013). Εξωτερικοί παράγοντες όπως η περιοχή καλλιέργειας και το μικροκλίμα της, οι συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης αλλά και η ποικιλία του καρπού επηρεάζουν την χημική σύστασή του, εσωτερικά και εξωτερικά (Poyrazoglu et al. 2002).

1.3. Ποικιλίες Ροδιάς

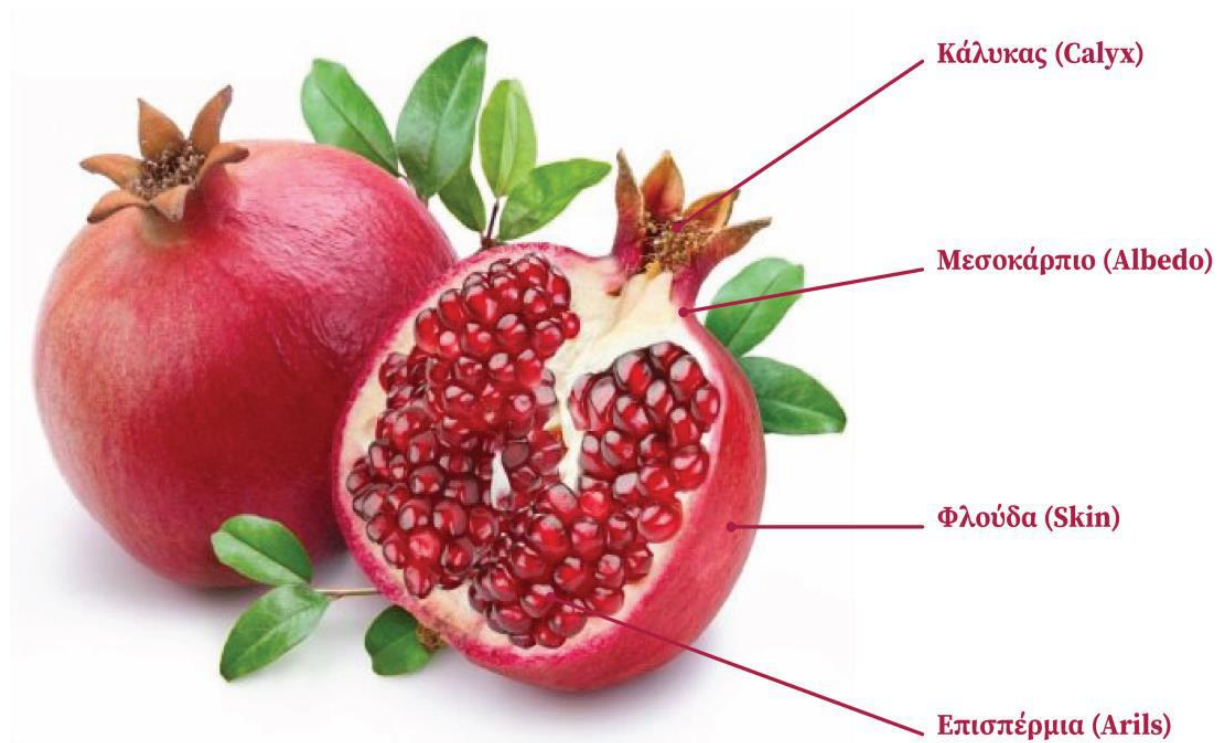
Πάνω από 500 ποικιλίες ροδιού έχουν ονομαστεί, αλλά τέτοια αρχαία και ευρέως διαδεδομένα φρούτα έχουν συχνά σημαντική συνωνυμία, στην οποία ο ίδιος βασικός γονότυπος είναι γνωστός με διαφορετικά ονόματα σε διαφορετικές περιοχές. Η συνωνυμία είναι πιθανό να ενθαρρύνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι το χρώμα του φλοιού και του σπόρου μπορεί να ποικίλει σημαντικά όταν καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές. Ορισμένα χαρακτηριστικά ποικίλλουν μεταξύ των γονότυπων ροδιού και είναι καθοριστικά για την αναγνώριση, την προτίμηση των καταναλωτών, την προτιμώμενη χρήση και ενδεχομένως την εξειδικευμένη εμπορία. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά είναι το μέγεθος των φρούτων, το χρώμα του φλοιού, σκληρότητα σπόρων, ωριμότητα, περιεχόμενο χυμού, οξύτητα, γλυκύτητα και στυφότητα (Stover & Mercure, 2007).

Οι ποικιλίες της ροδιάς διακρίνονται σε εδώδιμες ποικιλίες που προορίζονται για την παραγωγή καρπών και σε καλλωπιστικές ποικιλίες με σκοπό την παραγωγή ανθέων. Με τη σειρά τους οι εδώδιμες ποικιλίες χωρίζονται σε γλυκές, ημίγλυκες και ξινές ποικιλίες ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε οξέα. (Γάτσιος, 2010)

- **Γλυκές ποικιλίες:** αυτές που η περιεκτικότητα σε οξέα είναι μικρότερη του 0,9%,

- **Ημίγλυκες ποικιλίες:** κυμαίνεται μεταξύ 0,9-1,8%, ενώ
- **Ξινές ποικιλίες:** αυτές που η περιεκτικότητά τους σε οξέα ξεπερνά το 1,8%

Άλλη διάκριση μεταξύ των ποικιλιών είναι σε πρώιμες, ενδιάμεσες και όψιμες ποικιλίες, σε ποικιλίες με μαλακό και σκληρό σπέρμα και σε ποικιλίες που προορίζονται για χυμοποίηση ή επιτραπέζια χρήση (Mars 2000).



Εικόνα 1: Καρπός Ροδιάς

Οι περισσότερες ποικιλίες ροδιάς που καλλιεργούνται σήμερα παγκοσμίως έχουν προέλθει από τυχαία σπορόφυτα ή μεταλλάξεις και σε μερικές μόνο περιπτώσεις από διασταυρώσεις (π.χ. Ισραήλ, Ινδία, Ισπανία). Οι επιλογές των τοπικών ποικιλιών μέχρι τώρα γίνονταν με βάση τις προτιμήσεις των τοπικών πληθυσμών, ωστόσο η μεγάλη ανάγκη προώθησης των εξαγωγών οδήγησε τους παραγωγούς στην αναθεώρηση των κριτηρίων σχετικά με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των ποικιλιών ροδιάς που καλλιεργούνται. Για παράδειγμα στην Ελλάδα ενώ οι περισσότερες ντόπιες ποικιλίες ροδιάς είναι γλυκές, σήμερα καλλιεργούνται σε μεγάλες εκτάσεις γλυκόξινες ποικιλίες που προορίζονται για εξαγωγή και παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας χυμού. (Δρογούδη et al. 2012)

Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του καρπού που παίζουν ρόλο στην ταυτοποίηση μιας ποικιλίας, στην προτίμηση των καταναλωτών και στην επιλογή της μετέπειτα χρήσης τους είναι το μέγεθος και το χρώμα του καρπού, το χρώμα των σπόρων, η σκληρότητα των σπερμάτων, η περιεκτικότητα σε χυμό, ο βαθμός ωρίμανσης, η οξύτητα και η γλυκιά γεύση (Mars 2000).

1.3.1. Ελληνικές Ποικιλίες

Οι ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες έχουν προέλθει ως σπορόφυτα και στο εμπόριο φέρονται με το όνομα του τύπου προέλευσης.

- **Ερμιόνη:** Η ποικιλία «Ερμιόνη» καλλιεργείται στην περιοχή της Ερμιόνης Αργολίδας. Χαρακτηρίζεται από μεγάλους καρπούς με έντονο κόκκινο χρώμα καρπιδίων με γλυκιά γεύση. Αυτή είναι και η ποικιλία η οποία μελετάται στη παρούσα εργασία.
- **Πολίτικη:** Ο καρπός της είναι μεγάλου μεγέθους με βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 600-900g με λεπτό φλοιό, πρασινωπό που γίνεται ξανθοκίτρινος, στα σημεία που είναι εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία. Οι σπόροι είναι κόκκινοι, σαρκώδεις με ιδιαίτερα γλυκιά γεύση.
- **Καράβελος:** Έχει καρπούς μεγάλου μεγέθους, με μέσο βάρος 600-900g με πρασινωπό ή ρόδινο χρώμα στον φλοιό. Τα καρπίδια έχουν ανοιχτό κόκκινο χρώμα και έχει γλυκιά γεύση και μικρά σπέρματα.

Άλλες ελληνικές γλυκιές ποικιλίες είναι οι: **Γλυκιά Πατρών** (Ποικιλία με μεγάλο καρπό, χρωματιστό φλοιό και μικρά καρπίδια), **Τανάγρας** (Μεγάλοι καρποί, με κόκκινο και χονδρό φλοιό και ερυθρά χυμώδη καρπίδια), **Χίου** (Ποικιλία με μεγάλους χρωματιστούς καρπούς, οι οποίοι έχουν ερυθρά και χυμώδη καρπίδια).

Στις ελληνικές ξινές ποικιλίες συμπεριλαμβάνονται τα **λειφάνια** (μεγάλοι καρποί με μικρό χρονικό διάστημα συντήρησης), τα **τσιπορόδια** (μετρίου μεγέθους με ξανθό χρώμα σπόρων), τα **χονδρορόδια** (πολύ μεγάλοι καρποί με χονδρό φλοιό και μεσαίου μεγέθους καρπίδια), τα **κρασορόδια** (μέτριο μέγεθος με λεπτό κόκκινο φλοιό και έντονα κόκκινα καρπίδια), τα **ξινόροδια** (μικροί καρποί με έντονα κόκκινο φλοιό) και οι **γούνες** (μεσαίου μεγέθους καρποί με χονδρή και μαλακή φλούδα έντονου κόκκινου χρώματος. Καρπίδια με επίσης πολύ κόκκινο χρώμα.). (Γάτσιος 2010, gaiapedia.gr)

1.3.2. Ξένες Ποικιλίες

- **Wonderful:** Είναι η πιο διαδεδομένη Αμερικάνικη ποικιλία. Προήλθε από τη Φλόριντα και εισήχθη στην Καλιφόρνια το 1896. Αποτελεί την κύρια ποικιλία του εμπορίου στις Ηνωμένες Πολιτείες. Καλλιεργείται επίσης στη Δυτική Ευρώπη, το Ισραήλ και τη Χιλή. Έχει διπλά πορτοκαλοκόκκινα άνθη, τα οποία δίνουν πολύ μεγάλους καρπούς, χρώματος πορφυρό έως βαθύ ιώδες. Είναι παραγωγική ποικιλία και παρουσιάζει προσαρμοστικότητα σε διάφορες εδαφοκλιματικές συνθήκες, γι' αυτό έχει εξαπλωθεί σε πολλές περιοχές παγκοσμίως. Έχει γλυκόξινη γεύση γι' αυτό και είναι κατάλληλη για χυμοποίηση και όχι για νωπή κατανάλωση.
- **Early Wonderful:** Μεγάλο καρπό με βαθύ ερυθρό χρώμα και λεπτό φλοιό. Τα καρπίδια είναι πολύ εύγευστα. Πολύ παραγωγική ποικιλία.
- **Granada:** Προήλθε από την Καλιφόρνια και είναι γενετική μετάλλαξη της Wonderful. Τα καρπίδια είναι βαθυκόκκινου χρώματος και χυμώδη.

- **Acco:** Πρώιμη ποικιλία με χώρα προέλευσης το Ισραήλ. Ο καρπός της είναι μεσαίου μεγέθους περίπου 300 – 400g. Το χρώμα του φλοιού της όπως και των καρπιδίων της είναι έντονο κόκκινο με ιδιαίτερα γλυκιά γεύση.
- **Hicaznar:** Έχει προέλευση από την Τουρκία και παρόμοια χημική σύσταση με την ποικιλία Wonderful των ΗΠΑ. Η βασική τους διαφορά εντοπίζεται στο χρώμα του φλοιού και στην περίοδο συγκομιδής.
- **Mollar de Elche:** Θεωρείται η πιο εμπορική ποικιλία για νωπή κατανάλωση στη Δυτική Ευρώπη με προέλευση από την Ισπανία. Οι καρποί της είναι μεγάλου μεγέθους, με το πράσινο χρώμα να κυριαρχεί στο φλοιό της. Η συγκομιδή της γίνεται στα μέσα του φθινοπώρου, από τέλη Σεπτέμβρη έως αρχές Νοέμβρη.

Οι παραπάνω ξένες ποικιλίες καλλιεργούνται και σε διάφορα μέρη της Ελλάδας λόγω των παρόμοιων κλιματικών συνθηκών. (Γάτσιος 2010, gaiapedia.gr)

1.4. Χημική Σύσταση του Ροδιού

Το ρόδι ως καρπός, έχει πολύτιμα συστατικά στα διάφορα μέρη του, που περιλαμβάνουν αφενός το βρώσιμο τμήμα του, επισπέρμια και σπέρματα, και αφετέρου το μη βρώσιμο, δηλαδή τον φλοιό και τα λευκά εσωτερικά τοιχώματα. Ένα πολύ σημαντικό προϊόν που παράγεται από το ρόδι, και χρήζει εξέτασης ως προς το χημικό του περιεχόμενο, είναι ο χυμός, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τα επισπέρμια ή και από ολόκληρο τον καρπό.

Περίπου το 50% του βάρους του καρπού αντιστοιχεί στο φλοιό, ο οποίος αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή βιοδραστικών συστατικών. Στον φλοιό κυριαρχούν флаβονοειδή, κυρίως флаβονόλες, όπως λουτεολίνη, κερκετίνη και καμφερόλη, υδρολυόμενες ταννίνες, κυρίως ελλαγταννίνες (ETs), και προανθοκυανιδίνες (Seeram et al. 2005, Li et al. 2006). Ακόμα, περιέχονται μεταλλικά στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, άζωτο, φώσφορο, μαγνήσιο και νάτριο (Mirdehghan and Rahemi, 2007), καθώς και πολυσακχαρίτες (Jahfar et al., 2003).

Το εδώδιμο τμήμα του ροδιού (50%) αποτελείται κατά 40% από επισπέρμια και κατά 10% από σπέρματα. Τα επισπέρμια περιέχουν κατά 85% νερό, 10% σάκχαρα (κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη), ενώ το υπόλοιπο 5% αποτελείται από πηκτίνες, οργανικά οξέα (πχ ασκορβικό, κιτρικό και μηλικό οξύ) και πολυφαινόλες. Η κατηγορία πολυφαινόλων που κυριαρχεί στα επισπέρμια του ροδιού είναι τα флаβονοειδή και κυρίως οι ανθοκυανίνες (Aviram et al. 2000; Tezcan et al. 2009). Τα σπέρματα του ροδιού είναι πλούσια σε συνολικά λιπίδια τα οποία αποτελούν το 12% του συνολικού βάρους τους. Τα λιπίδια αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα (n-3) λιπαρά οξέα, κυρίως λινολενικό, λιγνελικό, πυρικό, ελαϊκό, στεατικό και παλμιτικό οξύ (Ozgul-Yucel, 2005; Fadavi et al., 2006). Τα σπέρματα επίσης, περιέχουν πρωτεΐνες, ακατέργαστες ίνες, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, πηκτίνες, σάκχαρα, πολυφαινόλες, αλλά και τα φυτοοιστρογόνα γενιστεΐνη και κουμπεστρόλη και το στεροειδές οιστρόνη.

Πίνακας 1: Θρεπτική αξία ροδιού ανά 100g και ανά καρπού, ("National Nutrient Database for Standard Reference Release 1 April , 2018 Basic Report 11134 , Cassava , raw," 2018)

Θρεπτικά Συστατικά	Αξία ανά 100 g	Βιταμίνες	Αξία ανά 100 g
Νερό	77.93 g	Βιταμίνη C, Ολικό Ασκορβικό Οξύ	10.2 mg
Ενέργεια	83 kcal	Θειαμίνη	0.067 mg
Πρωτεΐνη	1.67 g	Ριβαφλαβίνη	0.053 mg
Total lipid (fat)	1.17 g	Νιασίνη	0.293 mg
Υδατάνθρακες	18.70 g	Βιταμίνη B6	0.075 mg
Διαιτητικές Ίνες	4.00 g	Φυλλικό Οξύ DFE	38 µg
Ολικά Σάκχαρα	13.67 g	Βιταμίνη B12	0 µg
Μεταλλικά Στοιχεία	Αξία ανά 100 g	Βιταμίνη A RAE	0 µg
Ασβέστιο Ca	10 mg	Βιταμίνη A IU	0 IU
Σίδηρος Fe	0.30 mg	Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	0.60 mg
Μαγνήσιο Mg	12 mg	Βιταμίνη D (D2 + D3)	0 µg
Φώσφορος P	36 mg	Βιταμίνη D	0 IU
Κάλιο K	236 mg	Βιταμίνη K	16.4 µg
Νάτριο Na	3 mg	Άλλα Στοιχεία	
Ψευδάργυρος Zn	0.35 mg	Καφεΐνη	0 mg
Λιπίδια	Αξία ανά 100 g	Λιπίδια	Αξία ανά 100 g
Λιπαρά Οξέα, Κορεσμένα	0.120 g	Λιπαρά Οξέα, trans	0 g
Λιπαρά Οξέα, Μονοακόρεστα	0.093 g	Χοληστερόλη	0 mg
Λιπαρά Οξέα, Πολυακόρεστα	0.079 g	Αμινοξέα	-

Ωστόσο, η χημική σύσταση του καρπού του ροδιού παρουσιάζει διακυμάνσεις και εξαρτάται από την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, το μικροκλίμα, την ωριμότητα συλλογής, τις συνθήκες παραγωγής καθώς και αποθήκευσης (Poyrazoglu et al. 2002, Fadavi et al. 2006). Σημαντικές διάφορες έχουν αναφερθεί στο περιεχόμενό τους σε οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά, σάκχαρα, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και μεταλλικά ιχνοστοιχεία ανάλογα με το έτος και τον τόπο παραγωγής (Mirdehghan and Rahemi, 2007, Tezcan et al., 2009).

Ο χυμός του ροδιού και κύριως αυτός που προκύπτει για εμπορική χρήση, παραλαμβάνεται μέσω της συμπίεσης ολόκληρων των καρπών, με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται τόσο τα φλαβονοειδή (ανθοκυανίνες), που περιέχονται στα επισπέρμια του ροδιού, όσο και τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες), αλλά και οι υδρολυόμενες ταννίνες που περιέχονται στο φλοιό. Οι χυμοί που προκύπτουν από ολόκληρο τον καρπό ή μετά από εμποτισμό του φλοιού σε αυτόν για ένα χρονικό διάστημα εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιοδραστικά μόρια καθώς έχει φανεί ότι οι υδρολυόμενες ταννίνες που κυριαρχούν στο φλοιό του ροδιού είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού κατά 92% (Gil et al., 2000).

1.5. Πολυφαινόλες

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν τόσο ως δέκτες ηλεκτρονίων όσο και ως δότες ατόμου Η στις ελεύθερες ρίζες ($\text{RO}\bullet + \text{PPH} \rightarrow \text{ROH} + \text{PP}\bullet$). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al., 2005). Τέλος, ορισμένες πολυφαινόλες παρατηρήθηκε ότι δρουν αντιοξειδωτικά ενισχύοντας τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Fergusson P.L. 2001).

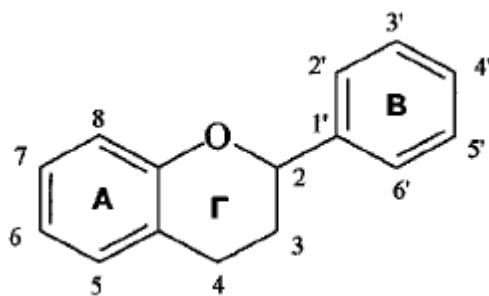
Η κυριότερη ομάδα χημικών ενώσεων που είναι υπεύθυνη για τις λειτουργικές ιδιότητες του καρπού του ροδιού είναι οι πολυφαινόλες σε οποιαδήποτε από τις μορφές τους. Οι πολυφαινόλες (φαινολικές ενώσεις) είναι αρκετά διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 (Harborne, 1993). Αυτές προκύπτουν ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και πολλές φορές εμφανίζονται με τη μορφή γλυκοζιτών. Τα κύρια σάκχαρα με τα οποία είναι συνδεδεμένες οι πολυφαινόλες είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη. Ορισμένες πολυφαινόλες είναι διαλυτές στο νερό, άλλες μόνο σε οργανικούς διαλύτες, ενώ άλλες δεν είναι διαλυτές σε κανένα διαλύτη.

Με τον όρο “πολυφαινόλες” στη διεθνή βιβλιογραφία νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απευθείας με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Οι φυσικές πολυφαινόλες περιλαμβάνουν απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φαινυλοπροπανοειδή, τα φλαβονοειδή και τα στιλβένια, ή / και υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες, οι λιγνάνες και οι μελανίνες. Βρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες, είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τους τμήμα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτης, δισακχαρίτης ή ολιγοσακχαρίτης. Επίσης, μπορεί να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

Έχουν βρεθεί πάνω από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες διαιρούνται σε πάνω από 10 κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των βενζολικών δακτυλίων και των ομάδων με τις οποίες είναι συνδεδεμένοι οι άνθρακες τους (Harborne, 1993).

1.5.1. Φλαβονοειδή

Η μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία των πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή, η κύρια ομάδα χρωστικών που απαντώνται στα φυτά. Η κατηγορία αυτή περιέχει πάνω από 5000 γνωστά μόρια ενώ μπορεί να διαφεθεί περαιτέρω σε 6 υποκατηγορίες. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους με 15 άτομα άνθρακα, οι οποίοι συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο και έχουν πολλούς πιθανούς υποκαταστάτες. Βρίσκονται, συνήθως, με τη μορφή γλυκοζιτών και ανάλογα με το σάκχαρο τροποποιούνται και οι ιδιότητές τους. Τα σταφύλια και τα προϊόντα τους αποτελούν κύρια πηγή φλαβονοειδών (Manach et al., 2004)



Εικόνα 2: Βασική Δομή Φλαβονοειδών

Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι: οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες. Ένα από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις τροφές είναι οι φλαβονόλες με περισσότερο συνηθισμένες τις κερκετίνη, καμφερόλη και λουτεολίνη (**van Elswijk et al. 2004**). Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή φρούτα και οι φλαβόνες στο σέλινο, ενώ οι κατεχίνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στις φράουλες, τα ρόδια και σε άλλα σαρκώδη φρούτα. Τέλος, οι ισοφλαβόνες όπως οι γενιστεΐνη και ντενζεΐνη βρίσκονται στα όσπρια και κυρίως στη σόγια (**Di Carlo et al., 1999**).

1.5.2. Φαινολικά Οξέα

Μία ακόμα πολύ σημαντική κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, των οποίων η δομή είναι απλούστερη από αυτή των φλαβονοειδών. Ως φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται τα μόρια που διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο δεσμευμένο σε έναν ή περισσότερους υδρογονωμένους υποκατάστατες, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών τους παραγώγων. Τα φαινολικά οξέα που υπάρχουν στο χυμό του ροδιού μπορούν να χωριστούν στα υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκινναμικά οξέα. Τα κυρίαρχα υδροξυβενζοϊκά οξέα στο ρόδι είναι το γαλλικό οξύ και το ελλαγικό οξύ (EA), καθώς και τα παράγωγά του (**Amakura et al., 2000**), ενώ τα πιο άφθονα υδροξυκινναμικά οξέα είναι το καφεϊκό, το χλωρογενικό και το π-κουμαρικό οξύ (**Poyrazoglu et al., 2002**).

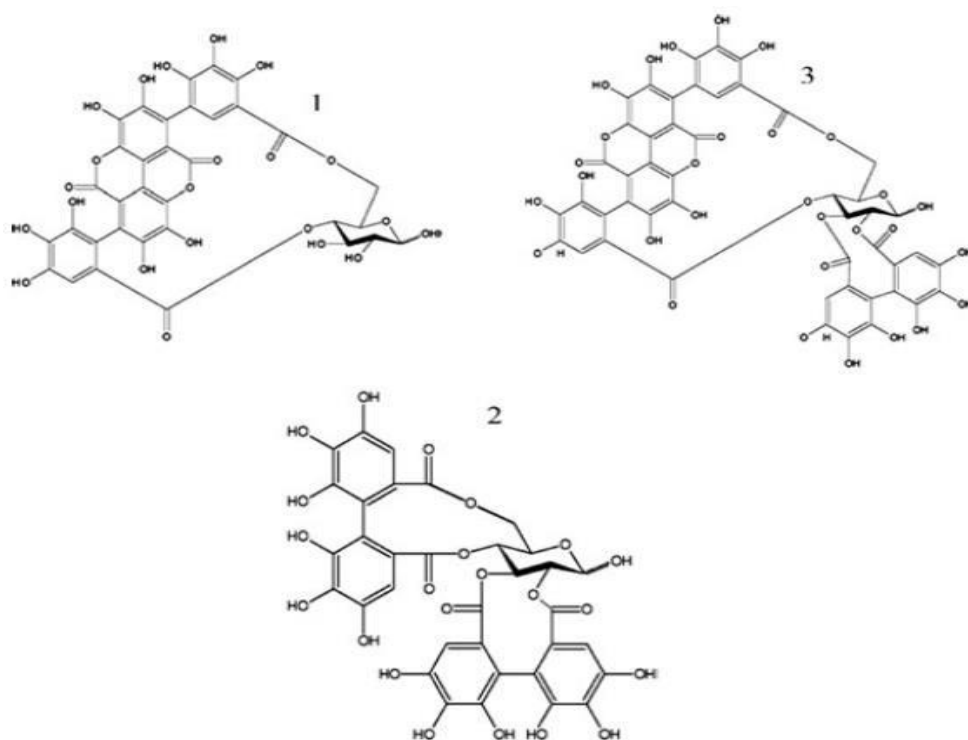
Το ελλαγικό οξύ παράγεται στα φυτά με την υδρόλυση των ελλαγιταννινών. Στο ρόδι, αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα συστατικά που θεωρείται υπεύθυνο για ένα μεγάλο μέρος της αντιοξειδωτικής, αντιπολλαπλασιαστικής, αλλά και άλλων σημαντικών βιολογικών δράσεων του καρπού (**Seeram et al., 2005**).

1.5.3. Ταννίνες

Είναι ενώσεις μεσαίου έως χαμηλού μοριακού βάρους. Οι ταννίνες είναι υδροξυλιωμένα μόρια όπου είναι ικανά να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με υδατάθρακες και πρωτεΐνες. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα βασίζεται και η στυφή γεύση τροφών που είναι πλούσια σε ταννίνες, καθώς σχηματίζονται ιζήματα με πρωτεΐνες του σιέλου. Είναι υψηλού μοριακού βάρους πολυφαινόλες που διαιρούνται σε 2 διακριτές χημικές κατηγορίες: τις υδρολυόμενες

ταννίνες, κυρίως ελλαγιταννίνες (ETs), και γαλλοταννίνες (GTs) και τις συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες, (Seeram et al., 2005).

- **Υδρολυόμενες ταννίνες:** Αποτελούνται από γαλλικό οξύ ή εξαϋδροξυ-διφενικό οξύ εστεροποιημένο με μια πολυόλη που είναι κυρίως γλυκόζη (Porter, 1989). Από τη συμπύκνωση των μεταβολιτών αυτών δημιουργούνται πολυμερή με υψηλό μοριακό βάρος. Η πιο γνωστή υδρολυόμενη τανίνη είναι το τανικό οξύ. Οι ETs είναι εστέρες από εξαϋδροξυδιφενικό οξύ και μια πολυόλη, συνήθως γλυκόζη ή κουινικό οξύ (Clifford and Scalbert, 2000). Ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε ETs, κυρίως πουνικαλίνη, πεντουνκαλαγίνη και πουνικαλαγίνη (Seeram et al., 2005). Η πουνικαλαγίνη αποτελεί την κυρίαρχη ET που απαντάται στο ρόδι και θεωρείται υπεύθυνη για σχεδόν το 50 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του χυμού του.



Εικόνα 3: Οι σημαντικότερες ETs που περιέχονται στο φλοιό του ροδιού. 1: πουνικαλίνη, 2: πεντουνκαλαγίνη, 3: πουνικαλαγίνη.

- **Συμπυκνωμένες ταννίνες:** Οι προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Προκύπτουν από πολυμερισμό μιας φλαβαν-3-όλης (κατεχίνη, επικατεχίνη, κ.α.) με ένα μόριο φλαβαν- 3,4-διόλης ή λευκοανθοκυανιδίνης. Η οξειδωτική συμπύκνωση πραγματοποιείται μεταξύ του άνθρακα C4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου και των ανθράκων C6 ή C8 των γειτονικών μονάδων (Porter, 1989). Αξιοσημείωτο, είναι ότι οι προανθοκυανιδίνες και οι υδρολυόμενες τανίνες χαμηλού μοριακού βάρους είναι διαλυτές σε διάφορους διαλύτες (νερό και οργανικούς), ενώ οι υδρολυόμενες υψηλού μοριακού βάρους τανίνες είναι αδιάλυτες. Τέλος, αδιάλυτες παραμένουν και οι τανίνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος ή με πολυσακχαρίτες.

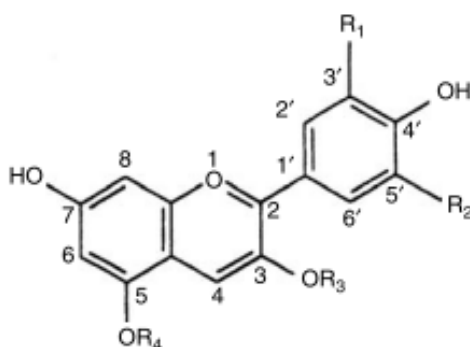
Κεφάλαιο 2^ο : Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη κατηγορία υδατοδιαλυτών χρωστικών του φυτικού βασιλείου. Σε αυτού του τύπου τις ενώσεις μπορεί να αποδοθεί κατά ένα μεγάλο ποσοστό το έντονο χρώμα λουλουδιών, φρούτων και φύλλων με χρώματα από κόκκινο σε βιολετί έως μπλέ. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αξιοσημείωτη αύξηση αναφορών σε νέες ανθοκυανίνες (Lohachoompol et al. 2008). Το γεγονός μπορεί να αποδοθεί τόσο στην πρόοδο που έχει σημειωθεί στον τομέα των αναλυτικών τεχνικών, όσο και στη διαπίστωση αρκετών επιστημόνων πως οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ιδιότητες ωφέλιμες για την υγεία του ανθρώπου. Έως το 2007 είχαν χαρακτηριστεί ως προς την ακριβή τους δομή, 575 ανθοκυανίνες.

2.1. Χημική Δομή Ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες (γλυκοζυλιωμένες ανθοκυανιδίνες) είναι η μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών που περιέχονται στα επισπέρμια του ροδιού, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χυμού. Αυτές οι χρωστικές ουσίες δίνουν στον καρπό και στο χυμό του ροδιού το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα.

Οι ανθοκυανίνες ανήκουν στην ομάδα των φλαβονοειδών λόγω του χαρακτηριστικού ανθρακικού σκελετού $C_6C_3C_6$. Σε κάθε ομάδα υπάρχουν πολλές διαφορετικές ενώσεις με το χρώμα να εξαρτάται από την παρουσία και τον αριθμό των υποκαταστάτων που συνδέονται με το μόριο. Η βασική δομή των ανθοκυανινών είναι το 2-φαινυλο-βενζοπυρύλιο του κατιόντος φλαβυλίου. Οι ανθοκυανίνες απαντώνται υπό τη μορφή γλυκοζιτών πολυυδροξυ- ή/και πο-λυμεθοξύ- παράγωγα του κατιόντος. Οι κύριες διαφορές είναι ο αριθμός των υδροξυλιωμένων ομάδων, η φύση και ο αριθμός των συνδεδεμένων σακχάρων, οι αλειφατικές ή αρωμα-τικές καρβοξυλομάδες που είναι συνδεδεμένες με το σάκχαρο στο μόριο, και η θέση αυτών των ομολόγων.



Εικόνα 4: Βασική δομή Ανθοκυανινών. Οι υποκαταστάτες R1 και R2 μπορεί να περιέχουν –H, –OH ή –OCH₃, ο R3 σάκχαρο και ο R4 –H ή σάκχαρο.

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας έχουν σάκχαρα και ακυλιωμένα σάκχαρα. Υπάρχουν κυρίως 4 μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και αραβινόζη) και 4 δισακχαρίτες

(ρουτινόζη, σαμπουμπιόση, λαθυρόζη και σοφορόζη) καθώς η εμφάνιση άλλων είναι εξαιρετικά σπάνια. Τρισακχαρίτες μπορούν να εμφανίζονται με γραμμική ή διακλαδισμένη αλυσίδα. Ο πιο κοινός γλυκοζίτης είναι η γλυκόζη (90%) και έπονται η ραμνόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη.

Οι γλυκοζίτες διασπώνται εύκολα κατά την διάρκεια μιας όξινα καταλυόμενης αντίδρασης, προς σχηματισμό των αντίστοιχων αγλυκόνων που αναφέρονται ως ανθοκυανιδίνες. Με δεδομένο ότι κάθε ανθοκυανιδίνη μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένη και ακυλιωμένη, σε διαφορετικές θέσεις, από διάφορα σάκχαρα και οξέα, μπορεί να υπάρξει ένας μεγάλος αριθμός συνδυασμών (Timberlake 1980).

Ακυλίωση των σακχάρων λαμβάνει χώρα, χωρίς εξαίρεση, στη θέση 3 του άγλυκου τμήματος. Η θέση 3 είναι πάντα κατειλημμένη από κάποιο σάκχαρο (ακυλιωμένο ή μη) και γλυκοζιλίωση μπορεί να λάβει χώρα στις θέσεις 5,7, 3 και πιθανόν στη θέση 4. Τα σάκχαρα παρέχουν σταθερότητα και διαλυτότητα στο άγλυκο τμήμα. Η φύση των μεμονωμένων σακχάρων έχει γενικά μικρή επίδραση σε αντίθεση με τη θέση που καταλαμβάνουν στο μόριο, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο για την χημική συμπεριφορά του μορίου. Σε κάποιες περιπτώσεις και με βάση τις αλλαγές του pH το ετεροκυκλικό άτομο οξυγόνου μπορεί να φορτιστεί θετικά συμβάλλοντας έτσι στη διαλυτότητα των ανθοκυανινών στο νερό.

Το 65% των ανθοκυανινών που έχουν απομονωθεί και έχουν χαρακτηριστεί περιέχουν ακυλιωμένα σάκχαρα. Οι βασικές ομάδες ακυλίωσης είναι αλειφατικά ή/και αρωματικά οξέα. Από τα αρωματικά οξέα τα βασικότερα είναι το *p*-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ, ενώ από τα αλειφατικά το μηλονικό και το οξικό οξύ. Στην περίπτωση των αλειφατικών οξέων ο εστερικός δεσμός που σχηματίζουν με την ανθοκυανιδίνη είναι ασθενείς, και κατά συνέπεια είναι πιθανή η υδρόλυση με αποδέσμευση του οξέος (Timberlake 1980).

Αν και υπάρχουν 30 διαφορετικές ανθοκυανιδίνες, το 90% των ανθοκυανινών προέρχεται κυρίως από τις έξι βασικές ανθοκυανίνες: Πελαργονιδίνη, Κυανιδίνη, Πεονιδίνη, Δελφινιδίνη, Πετουινιδίνη, και Μαλβινιδίνη, οι οποίες διαφέρουν μόνο στις ομάδες υποκατάστασης του Β δακτυλίου.

Πίνακας 2: Δομικές πληροφορίες των πιο άφθονων αγλυκόνων ανθοκυανιδίνης στη φύση (Ramos. P et al. 2014)

Υποκαταστάτες									
Ονομασία	Συντομογραφία	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Χρώμα
Κυανιδίνη	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Πορτοκαλί - Κόκκινο
Δελφινιδίνη	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Μπλε - Κόκκινο
Μαλβιδίνη	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Μπλε - Κόκκινο
Πελαργονιδίνη	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Πορτοκαλί - Κόκκινο
Πεονιδίνη	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Πορτοκαλί - Κόκκινο
Πετουινιδίνη	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Μπλε - Κόκκινο

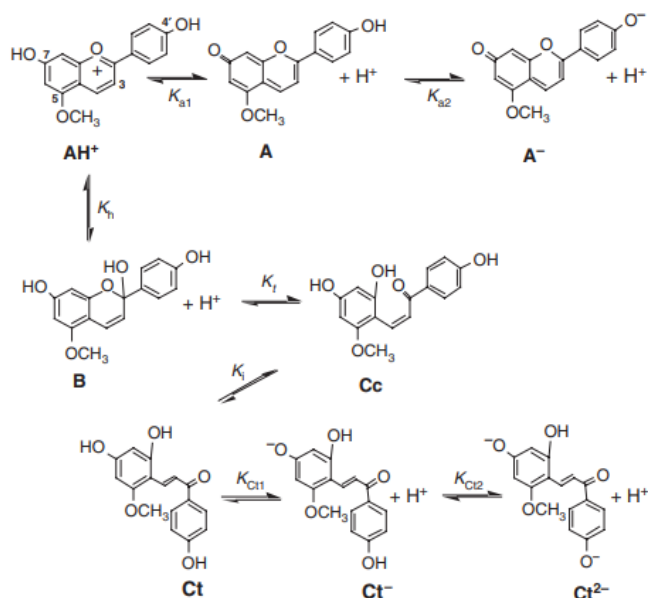
2.2. Χρώμα Ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες χαρακτηρίζονται από μία ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4 και 7 και ένα σάκχαρο στη θέση 3 (μονογλυκοσίδες) ή στις 3 και 5 (διγλυκοζίτες). Στις ανθοκυανιδίνες οι ομάδες υδροξυλίου παίρνουν τις θέσεις των γλυκοζιτών, οδηγώντας σε ασταθείς δομές σε διαλύματα. Αντιθέτως, οι αποκαλούμενες δεοξυανθοκυανιδίνες αντιστοιχούν στις «ανθοκυανιδίνες» που δεν έχουν το υδροξύλιο στη θέση 3 (αλλά φέρουν υδροξύλιο στη θέση 5) και είναι αρκετά σταθερές σε διαλύματα.

Τόσο οι ανθοκυανίνες όσο και η ανθοκυανιδίνες υφίστανται πολλαπλούς δομικούς μετασχηματισμούς σε υδατικά διαλύματα ακολουθώντας τους ίδιους βασικούς μηχανισμούς. Το κατιόν φλαβυλίου (AH^+) είναι το κυρίαρχο είδος σε πολύ όξινα διαλύματα, αλλά με την αύξηση του pH πραγματοποιούνται μια σειρά περισσότερα ή λιγότερα αναστρέψιμων χημικών αντιδράσεων:

- μεταφορά πρωτονίων που οδηγεί στην κινειδική βάση (**A**),
- ενυδάτωση του κατιόντος φλαβυλίου που δημιουργεί την άχρωμη ημικέταλη (**B**),
- αντίδραση ταυτομέρειας, υπεύθυνη για το άνοιγμα του δακτυλίου, και την παραγωγή της ελαφριά κίτρινης απόχρωσης της Ζ-χαλκόνης, μορφή (**Cc**) και τέλος,
- ισομερισμός cis-trans για τον σχηματισμό της ελαφρά κίτρινης Ε-χαλκόνης (**Ct**).

Επιπλέον, σε υψηλότερο pH και ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου, βρίσκονται περαιτέρω αποπρωτονιωμένα είδη. Υπεύθυνα για το χρώμα είναι το AH^+ και οι κινειδικές βάσεις, A και A^- .



Εικόνα 5: Δομικοί Μετασχηματισμοί των Ανθοκυανινών

2.3. Σταθερότητα των Ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες είναι σχετικά ασταθείς, με υψηλή σταθερότητα όταν βρίσκονται σε όξινες συνθήκες. Τόσο τα χαρακτηριστικά της χρωστικής (απόχρωση και χρώμα) και η σταθερότητά της επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τους υποκαταστάτες στην αγκυρόνη. Η αποικοδόμηση των ανθοκυανινών δεν συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της εκχύλισης από φυτικούς ιστούς αλλά και κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των τροφίμων.

Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν την αποικοδόμηση των ανθοκυανινών είναι το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση οξυγόνου. Παράγοντες λιγότερο σημαντικοί είναι η παρουσία αποικοδομητικών ενζύμων, ασκορβικού οξέος, διοξειδίου του θείου, μεταλλικών ιόντων και σάκχαρων. Επιπλέον, η συγχρωμάτωση μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό αποικοδόμησης.

2.3.1. Συγκέντρωση

Η αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών ευνοεί τη σταθερότητα τους. Επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρώματος σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Πιο συγκεκριμένα μεταβολή στη συγκέντρωση από 10^{-4} σε 10^{-2} συνεπάγεται 300 φορές πιο έντονο χρώμα. Οι ανθοκυανίνες είναι πιο σταθερές σε υψηλές συγκεντρώσεις.

2.3.2. Θερμοκρασία

Οι ανθοκυανίνες είναι ευαίσθητες όταν μεταβάλλεται η θερμοκρασία. Αύξηση στη θερμοκρασία συνεπάγεται την επιτάχυνση της αντίδρασης αποσύνθεσης των χρωστικών. Το πρώτο στάδιο της αποσύνθεσης είναι ο σχηματισμός της χαλκόνης. Στη συνέχεια ακολουθεί υδρόλυση του γλυκοζιτικού δεσμού, που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ασταθούς ανθοκυανιδίνης. Το φως είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών, αλλά παράλληλα καταλύει τις αντιδράσεις αποσύνθεσης τους.

2.3.3. Οξυγόνο

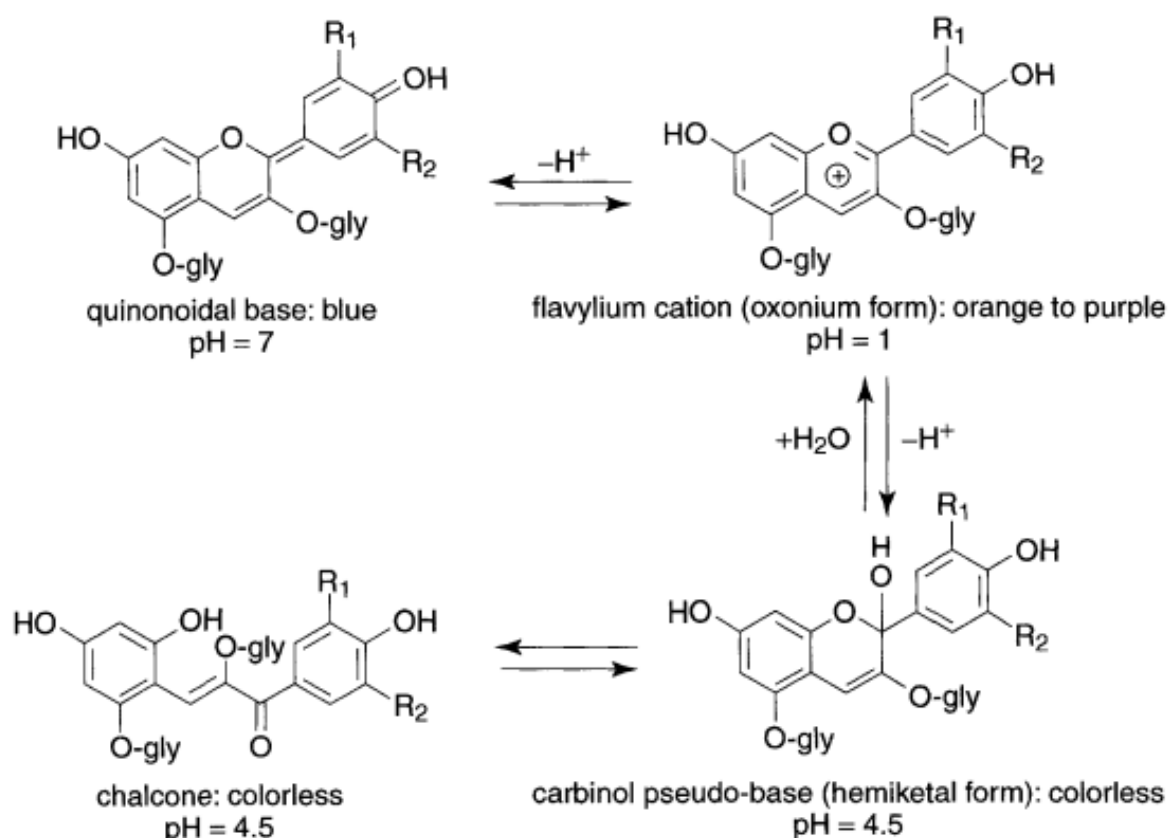
Η παρουσία μοριακού οξυγόνου σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία είναι ο μεγαλύτερος εχθρός της σταθερότητας των ανθοκυανινών. Μπορεί να δράσει τόσο άμεσα, οξειδώνοντας απευθείας την χρωστική, είτε έμμεσα όπου οξειδωμένα συστατικά του διαλύματος αντιδρούν με τις ανθοκυανίνες με αποτέλεσμα την παραγωγή άχρωμων ή καφέ προϊόντων.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί επίσης να έχει αρνητική επίδραση στις ανθοκυανίνες. Το H_2O_2 μπορεί να παραχθεί εμμέσως από ασκορβικό οξύ. Κατά τη διάσπαση του H_2O_2 σε υδατικά διαλύματα παράγονται προϊόντα όπως ελεύθερες ρίζες (η κυρίως η ρίζα $\cdot OH$) και το ανιόν $HO_2\cdot$ που ευθύνονται για την οξείδωση και τη βαθμιαία αποσύνθεση των ανθοκυανινών. Επιπροσθέτως τα παράγωγα της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου καταλύουν και την οξείδωση φαινολικών ενώσεων προς κινόνες, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να διασπάσουν τις χρωστικές.

2.3.4. pH

Σε ένα υδατικό μέσο, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, οι ανθοκυανίνες μπορούν να υπάρχουν σε 4 πιθανές δομές οι οποίες εξαρτώνται από το pH:

- Τη κυανή κινουοειδή βάση, *quinonoidal base*
- Το κόκκινο κατιόν φλαβυλίου, *flavylium cation*
- Την άχρωμη ημικεταλη (ψευδοβάση), *pseudobase*, και
- Την έγχρωμη χαλκόνη, *chalcone*



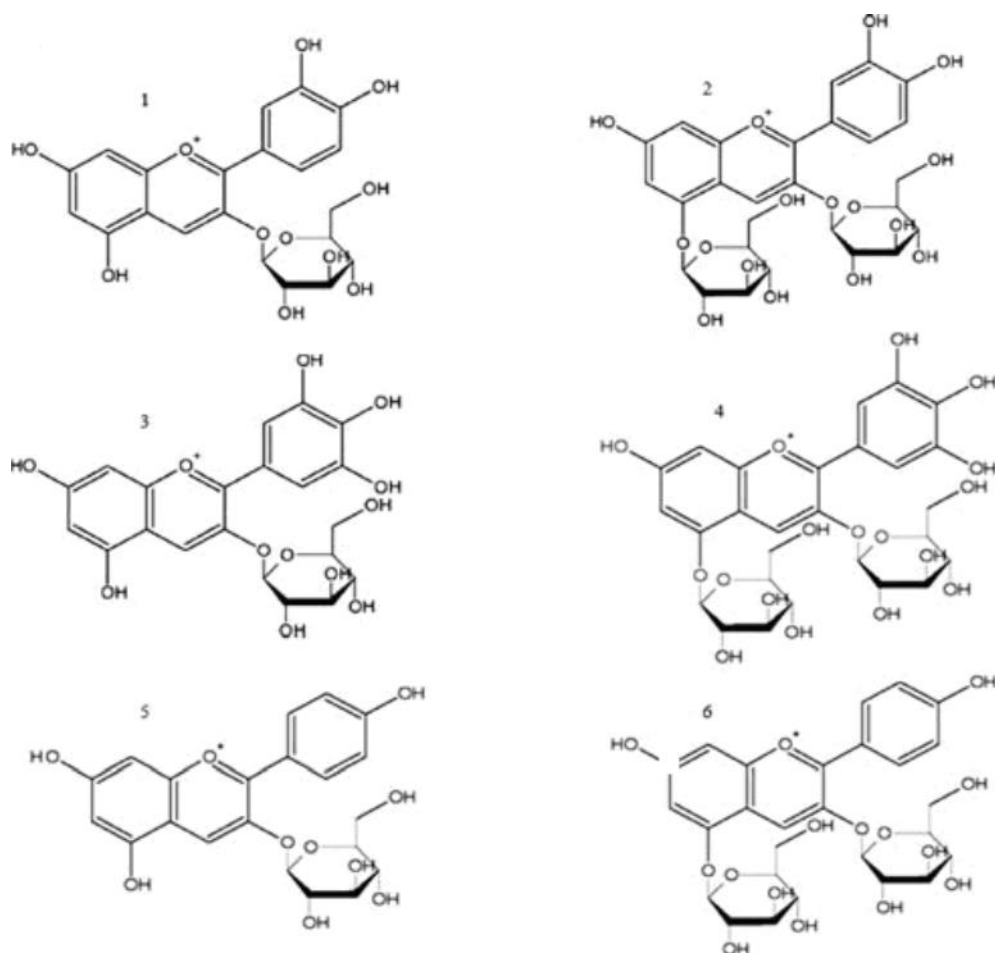
Εικόνα 6: Δομές Ανθοκυανινών σε διαφορετικά pH

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η έγχρωμη μορφή οξωνίου κυριαρχεί σε pH 1.0 και η μορφή της άχρωμης ημικεταλης σε 4.5. Οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν έντονο χρώμα (tinctorial strength) σε pH 1.0, όταν τα μόρια της χρωστικής είναι κυρίως σε ιονισμένη μορφή. Σε pH 4.5, οι ανθοκυανίνες στους χυμούς φρούτων είναι σχεδόν άχρωμες (ή ελαφρώς μπλε) εφόσον δεν υπάρχουν κίτρινα φλαβονοειδή. Σε περίπτωση που υπάρχουν κίτρινες χρωστικές, όπως συμβαίνει στα φρούτα, ο χυμός θα είναι πράσινος. Οι αλλαγές στο χρώμα σχετίζονται με τη μεταβολή στη θέση των διπλών δεσμών τους.

2.3.5. Ένζυμα και Σάκχαρα

Ένζυμα όπως οι γλυκοζιδάσες ευνοούν την αποσύνθεση των ανθοκυανινών. Ευθύνονται για τον μετασχηματισμό των χρωστικών στην πιο ασταθή μορφή (ανθοκυανιδίνης) καθώς διασπούν τον δεσμό μεταξύ γλυκοζίτη και του άγλυκου τμήματος. Οι περοξυδάσες και φαινολάσες, όπως φαινολοξειδάσες και πολυφαίνυλοξειδάσες είναι ένζυμα που απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς και επίσης επιφέρουν την αποσύνθεση των ανθοκυανινών. Στην ενζυματική αποσύνθεση των ανθοκυανινών οι κινόνες παίζουν σημαντικό ρόλο. Τα ένζυμα οξειδώνουν διάφορες φαινολικές ενώσεις προς τις αντίστοιχες κινόνες, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με τις χρωστικές. Η δομή κάποιων ανθοκυανινών μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην ενζυματική αποσύνθεση. Η πελαργονιδίνες δεν αντιδρούν με την πολυφαίνυλοξειδάση, σε αντίθεση με τις κυανίνες που αντιδρούν άμεσα. Για το ίδιο ένζυμο έχει βρεθεί πως οι μαλβινίνες είναι πιο σταθερές σε σχέση με τις δελφινιδίνες.

Η παρουσία σακχάρων καθώς και ενώσεων που προκύπτουν από την αποσύνθεσή τους, έχει επισημανθεί ως παράγοντας που δρα κατά της σταθερότητας των ανθοκυανινών.



Εικόνα 7: Σημαντικότερες ανθοκυανίνες που περιέχονται στο χυμό του ροδιού 1: κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 2: κυανιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτης, 3: δελφινίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 4: δελφινίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτης, 5: πελαργονιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 6: πελαργονιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτης.

2.3.6. Χρώμα και Δομή

Η αύξηση του αριθμού των υποκατάστατων στο μόριο της ανθοκυανιδίνης έχει ως αποτέλεσμα μια βαθύτερη απόχρωση. Η εμβάθυνση της απόχρωσης είναι το αποτέλεσμα μιας βαθοχρωμικής μετατόπισης (μεγαλύτερο μήκος κύματος), που σημαίνει ότι η ζώνη απορρόφησης φωτός στο ορατό φάσμα μετατοπίζεται από μικρότερο μήκος κύματος σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, με επακόλουθη αλλαγή του χρώματος από πορτοκαλί / κόκκινο σε πορφυρό / μπλε. Η αντίθετη αλλαγή αναφέρεται ως υψοχρωμική μετατόπιση.

Η βαθοχρωμική μετατόπιση οφείλεται στην παρουσία αυξοχρωμων ομάδων (auxochrome). Πρόκειται για ομάδες που από μόνες τους δεν έχουν χρωμοφόρες ιδιότητες αλλά προκαλούν εμβάθυνση στην απόχρωση όταν συνδέονται με τα έγχρωμα μόρια. Οι αυξοχρωμες ομάδες είναι ομάδες που δίνουν ηλεκτρόνια και στην περίπτωση των ανθοκυανιδίνων είναι οι ομάδες υδροξυλίου και μεθοξυλίου. Επειδή οι μεθοξυομάδες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων από αυτή των υδροξυλομάδων, προκαλούν μεγαλύτερη βαθοχρωμική μετατόπιση από ό,τι οι ομάδες υδροξυλίου.

2.3.7. Συγχρωμάτωση

Παρότι η μέση τιμή του pH των φυσικών προϊόντων που περιέχουν ανθοκυανίνες είναι μέτρια όξινο προκαλείται γρήγορος αποχρωματισμός των περισσότερων μορίων φλαβυλίου, δηλ. σχηματισμός άχρωμων μορφών του μορίου. Συνεπώς, θεωρείται ότι το χρώμα των μορίων των ανθοκυανινών *in vino* επηρεάζεται, εκτός από την τιμή pH του περιβάλλοντος, τη δομή τους και τη συγκέντρωσή τους και από τη σύσταση του μέσου στο οποίο βρίσκονται. Η μεγάλη ποικιλία της σύστασης των φυσικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση πολλών και διαφορετικών μορίων με τις ανθοκυανίνες. Η συγχρωμάτωση είναι μία από τις πιθανές αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα και γενικά θεωρείται ότι είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το χρώμα των φυτών *in vino*. Η συγχρωμάτωση ευθύνεται για τη σταθεροποίηση της έγχρωμης δομής των ανθοκυανινών και συνεπώς είναι υπεύθυνη για την ενίσχυση του χρώματός τους (Marković et al., 2005).

Οι συγχρωστικές ενώσεις είναι άχρωμα μόρια τα οποία όταν προστίθενται σε διαλύματα ανθοκυανινών ενισχύουν την ένταση του χρώματος και την σταθερότητα των διαλυμάτων (Jamei & Babaloo, 2017). Πρόκειται για ηλεκτρονιακά πλούσιες ενώσεις (electron-rich Systems) οι οποίες μπορούν να συνδεθούν με το ηλεκτρονιακά ελλειμματικό ιόν φλαβυλίου. Με αυτήν τη σύνδεση αποφεύγεται η πυρινόφιλη προσθήκη μορίων νερού στο ιόν φλαβυλίου (Βλάμης). Η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως **διαμοριακή συγχρωμάτωση**, κατά την οποία επίπεδα συστήματα πλούσια σε **π** ηλεκτρόνια μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με το χρωμοφόρο τμήμα των ανθοκυανινών (C-2) εμποδίζοντας την προσβολή τους από το νερό. Στην περίπτωση αυτή και οι δύο περιοχές του μορίου μπορούν να καλυφθούν.

Η διαμοριακή συγχρωμάτωση μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη πολυφαινολών σε διάλυμα ανθοκυανινών, όπου συμβαίνει «επιστοιβάξη» της μίας πάνω στην άλλη. Στην περίπτωση αυτή η αποικοδόμηση σε κινσιεδείς βάσεις είναι αργή με αποτέλεσμα το χρώμα να παραμένει σταθερό και έντονο σε υψηλότερα pH.

Τα φλαβονοειδή είναι γνωστές συγχρωστικές ενώσεις με τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες και φλαβανόλες να έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Επιπλέον τα φαινολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένων των υδροξυκινναμωμικού και υδροξυβενζοϊκού οξέος, έχουν φανεί

να έχουν ισχυρή επίδραση στη σταθερότητα των ανθοκυανινών. Σε ερευνητικές εργασίες έχει φανεί (Marković et al., 2005) ότι το δεψικό οξύ (tannic acid) και το φερουλικό απέδωσαν ισχυρή υπερχρωμική μετατόπιση (hyperchromic effect) σε εκχυλίσματα σταφυλιών.

Εκτός από την διαμοριακή συγχρωμάτωση συμβαίνει και **ενδομοριακή συγχρωμάτωση**. Αρωματικά ή αλειφατικά λιπαρά οργανικά οξέα με αρωματικές ομάδες δεσμεύονται στο σάκχαρο της ανθοκυανίνης με έναν ακυλικό δεσμό προς σχηματισμό ενδομοριακών συμπλόκων. Η συμπλοκοποίηση εξαρτάται από το είδος της ακυλιωτικής ομάδας, το μήκος του σακχάρου και τη θέση της ακυλίωσης. Επάγεται από ένζυμα (αλκυλτρανσφεράσες), ενισχύει το κόκκινο χρώμα σε pH 4-5 και τη σταθερότητα των ανθοκυανινών στο φως, στη θερμότητα και στο οξυγόνο.

3.1. Εισαγωγή

Η πηκτίνη είναι ένας δομικός ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχεται στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Αρχικά απομονώθηκε και περιεγράφηκε το 1825 από τον Heneri Bracannot. Στη φυσική της μορφή, η πηκτίνη είναι ένας υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτών ή των καρπών τους. Κύριες πηγές παραλαβής της πηκτίνης είναι:

- κυρίως τα παραπροϊόντα εσπεριδοειδών (φλοιός από λεμόνια, πορτοκάλια κλπ.) 25 – 35%
- Μήλα 10 – 15%
- Ζαχαρότευτλα 10 – 20%
- Πατάτες 2 – 3% (Cyber Colloids.com).

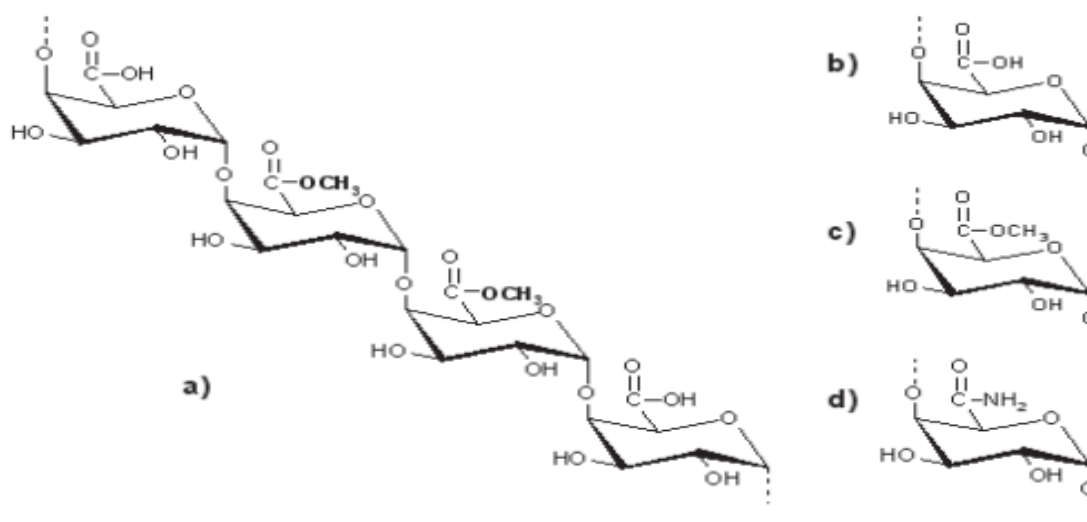
Με την χρήση αυτών των ουσιών δημιουργούνται πηκτές, κατά τη θέρμανση τους με ζάχαρη ή οξέα. Η βιολογική δράση των πηκτινών είναι ανάλογη με αυτή των άπεπτων φυτικών ινών. Στην βιομηχανία τροφίμων λειτουργούν ως πυκνωτικά μέσα, σταθεροποιητές δηλαδή ως πρόσθετα που διατηρούν τη δομή των τροφίμων. Ο σχηματισμός των πηκτινών είναι ένα από τα πολύτιμα χημικά πρόσθετα στην βιομηχανία των μαρμελάδων, ζελεδών, πελτέδων (Espinoza et al. 2018).

3.2. Δομή

Η δομή της πηκτίνης δεν έχει σε κάποιο σταθερό μοτίβο, καθώς αποτελείται από 17 μονοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν πάνω από 20 διαφορετικούς τρόπους σύνδεσης· εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή προέλευσής της, αλλά και από τον τρόπο παραλαβής της (Bagal - Kestwal et al. 2019). Ο κορμός της πηκτινικής αλυσίδας βασίζεται σε γραμμικά πολυμερή του α-D-γαλακτουρονικού οξέος ενωμένα με α-1,4-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Έχει μέσο μοριακό βάρος 50000 – 150000 και περιέχει από 200 – 10000 δομικές μονάδες γαλακτουρονικού οξέος. Το συνολικό ποσοστό του γαλακτουρονικού οξέος στο μόριο της πηκτίνης (% GA), για να θεωρείται ως πρόσθετο τροφίμων πρέπει να είναι στο ελάχιστο 65 % (Flutto 2003).

Άλλα βασικά πολυμερή της πηκτινικής αλυσίδας είναι η ομογαλακτουρονάνη (HGA), η ραμνογαλακτουρονάνη I και II (RGI - RGII), η ξυλογαλακτουρονάνη (XGA) και η αραβινογαλακτάνη I και II (AGI – AGII). Η πλέον άφθονη περιοχή στο πεκτικό μακρομόριο είναι η ομογαλακτουρονάνη, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 60% όλης της πηκτινικής αλυσίδας (Gawkowska et al. 2018).

Μέρος των καρβοξυλομάδων κατά μήκος της πηκτίνης εστεροποιείται παρουσία μεθοξυλομάδων. Οι ελεύθερες υδροξυλομάδες της πηκτινικής αλυσίδας ενώνονται με ακετυλομάδες στις θέσεις O_2 και O_3 (BeMiller 2019). Γενικά, η διαμόρφωση της πηκτινικής αλυσίδας έχει ελικοειδή μορφή, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευκαμψία. Μόρια ραμνόζης διακόπτουν αυτή τη διαμόρφωση, (Andress 1999) και δημιουργούνται πλευρικές αλυσίδες οι οποίες τείνουν να εμφανίζονται σε ομάδες. Σ' αυτές τις πλευρικές αλυσίδες εντοπίζονται ουδέτερα γλυκαντικά όπως η D-ξυλόζη, η D-γαλακτόζη και η L-αραβινόζη. Αποτελούν το 10 – 15% του συνολικού μοριακού βάρους της πηκτίνης (Thakur 1997).



Εικόνα 8: α) Ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα μορίου πηκτίνης και λειτουργικών ομάδων: β) καρβοξυλίου, γ) εστέρα. δ) αμίδιο στην αλυσίδα πηκτίνης.

Τέτοια τμήματα καλούνται “hairy (τριχωτά)” (Cyber Colloids.com). Οι “τριχώδεις” περιοχές των πηκτινών είναι ακόμη πιο εύκαμπτες. Η δομή των πηκτινών διογκώνεται εξαιτίας του φορτίου των καρβοξυλομάδων. Η αύξηση αυτή μπορεί να αποφευχθεί με δημιουργία ενώσεων με δισθενή κατιόντα. Οι τιμές της pK_a είναι περίπου 2,9 και έτσι διασφαλίζεται σε πλήθος συνθηκών το σημαντικό αρνητικό φορτίο. Παρόμοιος χώρος καταλαμβάνεται απ’ τους μεθυλεστέρες, οι οποίοι είναι πιο υδρόφοβοι και έτσι διαφοροποιούνται ως προς την επίδραση στην δόμηση του περιβάλλοντος ύδατος. (May 1990)

Η πηκτίνη είναι ένα υπερβολικά ετερογενές υλικό και οποιαδήποτε αναφορά στο μοριακό βάρος της ή στο βαθμό εστεροποίησης της ισχύει για τα μοριακά είδη που βρίσκονται σε συγκεκριμένο διάλυμα. Έτσι μέσες τιμές M.B. μόνες τους, δεν ορίζουν τη λειτουργικότητα μιας συγκεκριμένης πηκτίνης, διότι διαφορετικές μέθοδοι παρασκευής πηκτίνης καταλήγουν σε πηκτίνες με ίδια ακριβώς μέση τιμή M.B. ή βαθμού εστεροποίησης αλλά με διαφορετική κατανομή του μοριακού βάρους και των μεθυλεστέρων, άρα και με διαφορετικές εξολοκλήρου ιδιότητες (Αναγνωστοπούλου et al. 2008).

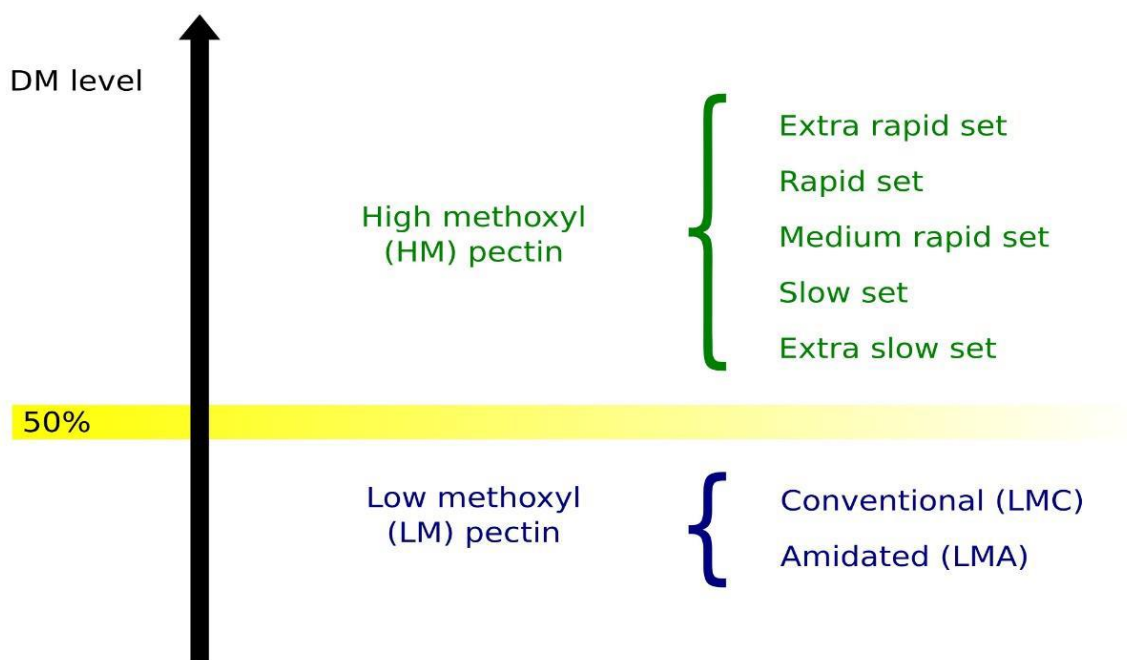
3.3. Κατηγορίες Πηκτινών

Ο διαχωρισμός των πηκτινών σε κατηγορίες γίνεται ως προς τον βαθμό εστεροποίησης και τον βαθμό αμιδίωσης. Ως βαθμός εστεροποίησης (DE) ορίζεται το ποσοστό των στερεοποιημένων μονάδων γαλακτουρονικού οξέος στο μόριο μιας πηκτίνης και θεωρείται το σημαντικότερο μέγεθος για την κατάταξη των πηκτινών (Ευαγγελίου 2018). Ως βαθμός αμιδίωσης (DA) ορίζεται αντίστοιχα το ποσοστό των αμιδιωμένων μονάδων γαλακτουρονικού οξέος (Flutto 2003). Με βάση λοιπόν τα παραπάνω οι πηκτίνες διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- **Πρωτοπηκτίνη:** Είναι η μη υδατοδιαλυτή πηκτινική ουσία που βρίσκεται κυρίως στη μεσοκυττάρια στοιβάδα των φυτικών ιστών. Όταν η πρωτοπηκτίνη υποστεί περιορισμένη υδρόλυση λαμβάνονται από αυτή τα υδατοδιαλυτά πηκτινικά οξέα (Βλάμης 2018)
- **Πηκτίνες Υψηλής Μεθυλίωσης (High Methoxy, HM)** όπου η πηκτωματοποίησή τους επιτυγχάνεται παρουσία οξέος, σε τιμές pH κάτω του 3.5 και το ποσοστό των στερεών στοιχείων ξεπερνά το 55%. Επιπρόσθετα οι πηκτίνες υψηλής μεθυλίωσης μπορούν να διαχωριστούν σε :
 - **Βραδείας πήξεως (slow set) (DE: 60 - 64%):** Για να σχηματιστεί πηκτή το μίγμα πρέπει μετά τη θέρμανση ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου συνήθως στους 25-30 °C.
 - **Μεσαίας πήξεως (medium rapid set) (DE: 65 - 69%):** Η πήξη επιτυγχάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία οξέος και σακχάρου.
 - **Ταχείας πήξεως (rapid set) (DE: 70 - 75%):** Πήζουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες συνήθως στους 85 °C. Είναι απαραίτητη η προσθήκη οξέος, ώστε η τιμή του pH να είναι στο διάστημα 2.7 – 3.5 (Ευαγγελίου 2018).
 - **Πολύ Υψηλού Αριθμού Μεθοξυλίου-Πηκτίνες(VHM) (ultra-rapid set) (DE: 80 - 90%):** Πήζουν μόνο παρουσία σακχάρου. Η τιμή του pH δεν αποτελεί παράγοντα επίδρασης της πήξης, η ταχύτητα της οποίας είναι σχεδόν στιγμιαία (Γιαννακούρου 2017, Βλάμης 2018). Συνήθως χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων καραμελοποιίας και όχι στην παρασκευή πηκτών.
- **Πηκτίνες Χαμηλής Μεθυλίωσης (DE: 20 - 50%):** Πήζουν σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες, περίπου στους 60 °C. Απαραίτητη για την πήξη τους κρίνεται η παρουσία ιόντων ασβεστίου ή άλλων παρεμφερών δισθενών ιόντων, δημιουργώντας ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδατανθρακικών αλυσίδων. Τελικώς πήζουν σύμφωνα με το λεγόμενο egg-box model. Έχουν ευρύ φάσμα pH 2.5 – 6.5. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων (Rajni et al. 1979).
- **Αμιδιωμένες Πηκτίνες Χαμηλής Μεθυλίωσης (DE: 30 – 35%, DA: 15 – 22%):** Έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τις πηκτίνες χαμηλής μεθυλίωσης. Βασική διαφορά τους είναι ότι

λόγω της αμινοποίησης η πήξη επιτυγχάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η νομοθεσία δεν επιτρέπει ο βαθμός αμιδίωσης να ξεπερνά το 25% (Flutto 2003).

- **Πηκτικά Οξέα (DE < 10%):** Είναι πηκτινικές ύλες που δεν έχουν μεθυλεστερομάδες, με τη διάσπαση του μορίου τους παράγονται τα πολυγαλακτουρονικά οξέα και είναι αδιάλυτες στο νερό (Ευαγγελίου 2018).



Εικόνα 9: Είδη Πηκτινών ανάλογα με τον Βαθμό Εστεροποίησης

Οι πηκτίνες εκτός από την διάκρισή τους σύμφωνα με τους βαθμούς εστεροποίησης και αμιδίωσης, χωρίζονται και σε κατηγορίες (βαθμοί ή ποιότητες) με βάση την καθαρότητά τους. Βαθμός πηκτίνης είναι το βάρος του σακχάρου που δεσμεύεται από 1 g πηκτίνης για να σχηματίσει πήκτωμα σε ορισμένο χρόνο κάτω από κατάλληλες συνθήκες (όξινο περιβάλλον).

3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό πηκτής

Ο σχηματισμός πηκτής, από την κατάσταση της πλήρους διαλύσεως του πολυμερούς, προκαλείται με φυσικές ή χημικές μεταβολές, οι οποίες τείνουν να μειώσουν τη διαλυτότητα της πηκτίνης. Τούτο ευνοεί το σχηματισμό τοπικής κρυσταλλώσεως.

Οι πιο σπουδαίοι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τη διαλυτότητα της πηκτίνης (τάση για σχηματισμό πηκτής) είναι (Γιαννακούρου 2017):

- **Θερμοκρασία:** Κατά τη ψύξη ενός θερμού διαλύματος πηκτίνης, οι θερμικές κινήσεις των μορίων ελαττώνονται και αυξάνεται η τάση τους να συνδυαστούν σ' ένα πλέγμα πηκτίνης. Οποιοδήποτε σύστημα, που περιέχει πηκτίνη και βρίσκεται σε συνθήκες σχηματισμού πηκτίνης, έχει ένα άνω όριο θερμοκρασίας, πάνω από το οποίο δεν είναι

δυνατό να συμβεί πήξη (Rajni et al. 1979). Κάτω από αυτή την κρίσιμη θερμοκρασία οι LM πηκτίνες πήζουν σχεδόν στιγμιαία, ενώ για την πήξη των HM πηκτινών απαιτείται χρονικό διάστημα, το οποίο σχετίζεται με τη θερμοκρασία που πραγματοποιείται η πήξη. Η διαφορά στην ταχύτητα πήξης μιας HM πηκτίνης προσδιορίζεται από τον βαθμό εστεροποίησης της. Σε αντίθεση με τις LM πηκτίνες, οι HM πηκτίνες σχηματίζουν πήγματα που δεν είναι αντιστρεπτά ως προς τη θερμοκρασία.

- **Μοριακή σύνθεση της πηκτίνης (Βαθμός Εστεροποίησης):** Ο βαθμός εστεροποίησης των γαλακτουρονικών οξέων επηρεάζει τόσο την πυκνότητα του φορτίου του πολυμερούς όσο και τον αριθμό των θέσεων για υδρόφοβη αλληλεπίδραση. Καθώς το μόριο της πηκτίνης με υψηλό βαθμό εστεροποίησης είναι λιγότερο φορτισμένα, μπορούν να σχηματίσουν πηκτές σε υψηλότερο pH και αρχίζουν να ζελατινοποιούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.
- **pH:** Όσο χαμηλότερο το pH, τόσο χαμηλότερη είναι η απόκρουση μεταξύ των μορίων της πηκτίνης και, κατά συνέπεια, τόσο πιο εύκολη θα είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι το χαμηλό pH θα οδηγήσει σε ταχύτερη πήξη σε πηκτίνες υψηλής μεθυλίωσης. Η πηκτίνη έχει pK_a 3.5 περίπου, και επομένως οι HM-πηκτίνες απαιτούν τιμές pH κάτω από 3.5 για να σχηματίσουν πηκτές.
- **Σάκχαρα και Ενεργότητα Ύδατος (a_w):** Η ενεργότητα ύδατος και το είδος του σακχάρου μπορούν να επηρεάσουν τον τρόπο που μπορεί να αναπτυχθούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της πηκτίνης. Καθώς η ενεργότητα του νερού μειώνεται, είναι πιο εύκολο να αλληλοεπιδράσουν, προκαλώντας ταχύτερη πήξη και αυξάνοντας την τελική ισχύ της πηκτής. Ο πιο συνήθεις τρόπος για τη μείωση της a_w σε ένα σύστημα τροφίμων είναι μέσω προσθήκης σακχάρων (Einhorn-Stoll, 2018). Τα σάκχαρα γενικά ανταγωνίζονται την πηκτίνη ως προς το νερό που είναι διαθέσιμο για ενυδάτωση και τείνουν να αφυδατώσουν τα μόρια της πηκτίνης στο διάλυμα (Λάζος 2002). Υψηλές συγκεντρώσεις στερεών σημαίνει διαθέσιμο λιγότερο νερό, λιγότερη κρυστάλλωση ή σχηματισμός πηκτής. Με συγκεντρώσεις διαλυτών στερεών $> 85\%$, η επίδραση της αφυδατώσεως είναι πολύ ισχυρή, οπότε δεν υπάρχει έλεγχος πήξεως οποιασδήποτε εμπορικής πηκτίνης (May 1990).
- **Συγκέντρωση της πηκτίνης:** Η συγκέντρωση της HM-πηκτίνης αυξάνει τη τελική ισχύ της πηκτής, λόγω της αύξησης του αριθμού των ζωνών σύνδεσης, αυξάνοντας τον αριθμό των αλυσίδων με ελαστική δραστηριότητα. Μια αύξηση στο μοριακό βάρος θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα. Ο ρυθμός ζελατινοποίησης αυξάνεται με την αυξανόμενη συγκέντρωση της πηκτίνης.

3.5. Μηχανισμός Πήξης

3.5.1. Μηχανισμός Πήξης HM Πηκτινών

Η βασική φυσικοχημική ιδιότητα της πηκτίνης είναι η πηκτωματοποίησή της, όπου η απόδοση της εξαρτάται από το μοριακό βάρος (Brehnholt 2009). Απαραίτητη προϋπόθεση

για την σωστή πήξη των ΗΜ πηκτινών είναι η ύπαρξη ζάχαρης σε όξινο περιβάλλον (Γιαννακούρου 2017). Η πηκτίνη αποτελεί τον πηκτικό παράγοντα, ενώ η ζάχαρη και το όξινο περιβάλλον προκαλούν τις απαραίτητες φυσικοχημικές μεταβολές της πηκτίνης στο νερό. Στον αντίποδα, η σωστή πήξη των L.M πηκτινών αν και επιτυγχάνεται σε μεγαλύτερο εύρος τιμών pH απαιτεί την παρουσία κατιόντων (Brejnholt 2009).

Με την προσθήκη οξέος, γίνεται περιορισμός του ιονισμού των μη εστεροποιημένων ομάδων της πηκτίνης, πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους του αρνητικού τους φορτίου και περιορισμένη ικανότητα ενυδάτωσης (Σακελλάρης 1986)

Η προσθήκη της ζάχαρης, προκαλεί μείωση της ενυδάτωσης μορίων πηκτίνης λόγω ισχυρού ανταγωνισμού με το νερό. Σε ΗΜ πηκτίνες η ζάχαρη έχει την τάση να αφυδατώνει τα μόρια τους). Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της ζάχαρης, τόσο λιγότερο είναι το διαθέσιμο νερό, το οποίο δρα ως διαλύτης για τις πηκτίνες (οπότε η ζάχαρη επηρεάζει την ισορροπία στο σύστημα πηκτίνης-νερού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη θρόμβωση της πηκτίνης και τη δημιουργία ενός δικτυωτού πλέγματος από ίνες μέσα στο οποίο εγκλωβίζεται η ζάχαρη. Η πυκνότητα και η συνεκτικότητα του δικτυωτού πλέγματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της πηκτίνης (Σακελλάρης 1986).

Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της ζάχαρης, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα νερού δεσμεύεται με αποτέλεσμα να αυξάνει ανάλογα και η συνεκτικότητα και η ισχύς της παραγόμενης πηκτής. Με την προσθήκη της ζάχαρης, μειώνονται οι ενδομοριακές και διαμοριακές απωστικές δυνάμεις και χάνεται μεγάλου μέρους του νερού ενυδάτωσης.

Ο σχηματισμός ικανοποιητικού πηκτώματος απαιτεί τη δημιουργία πολλών υδρόφοβων ζωνών σύνδεσης μικρού μήκους (διαφορετικά ευνοείται ο σχηματισμός ιζήματος) (May 1990). Επιγραμματικά για τις ΗΜ-πηκτίνες :

- Σχηματισμός υδρόφοβων ζωνών σύνδεσης ανάμεσα στα μόρια πηκτινών
- Συνένωση των μορίων των ΗΜ πηκτινών σε σταθερό δίκτυο με εγκλωβισμό στα μεσοδιαστήματά του, του νερού και διαλυμένων ουσιών (σακχαρόζη και οξύ)
- Σχηματισμό πηκτώματος

Αν δεν δημιουργηθούν οι υδρόφοβες ζώνες σύνδεσης, δεν ξεπερνιέται το φράγμα της εντροπίας για να σχηματισθεί πήκτωμα, ούτε επιτυγχάνεται η αναγκαία προσέγγιση των γειτονικών μορίων πηκτίνης για την πληρέστερη ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου.

3.5.2. Μηχανισμός Πήξης LM Πηκτινών

Ο σχηματισμός πηκτώματος στηρίζεται στη συνένωση ιονισμένων καρβοξυλομάδων (-COO-) δύο γειτονικών μορίων με γέφυρες Ca^{2+} .

Οι LM πηκτίνες με DE 50% ή μικρότερο σχηματίζουν πήκτωμα αλλά με διαφορετικό μηχανισμό από ότι οι ΗΜ πηκτίνες. Δεν απαιτούν υψηλά ποσοστά ζάχαρης ή χαμηλή τιμή pH για να ξεκινήσει η διαδικασία πήξης αλλά την παρουσία δισθενούς κατιόντος όπως ασβεστίου. Έτσι το δισθενές κατιόν συνενώνεται με τις ιονισμένες ομάδες (-COO-) γειτονικών αλυσίδων και σχηματίζεται πήκτωμα.

Οι LM πηκτίνες παράγονται από τις HM πηκτίνες με χημική (όξινη-αλκαλική) ή ενζυμική απομεθυλίωση. Η όξινη απομεθυλίωση μπορεί να γίνει ταυτόχρονα με την εξαγωγή της πηκτίνης από την πρώτη ύλη. Η επεξεργασία αυτή συνήθως μειώνει το MB της πηκτίνης αν και νεώτερες μέθοδοι δίνουν πηκτίνες με μεγάλο MB και χαμηλό DE. Μερικές πηγές πηκτίνης, όπως ηλιόσποροι, έχουν από τη φύση τους χαμηλό DE και μια προσεκτική επεξεργασία δίνει πηκτίνη με μεγάλο MB και χαμηλό DE (Ishii et al. 1979). Στις LM πηκτίνες, που έχουν παραχθεί με χημική απεστεροποίηση, η κατανομή των ελεύθερων καρβοξυλίων είναι τυχαία, ενώ στις LM πηκτίνες, που έχουν υποστεί ενζυμική απεστεροποίηση, κατά κανόνα δεν είναι τυχαία.

Οι χημικώς απομεθυλωμένες LM πηκτίνες σχηματίζουν καλύτερα πηκτώματα από τις περισσότερες ενζυμικώς απομεθυλωμένες LM πηκτίνες. Για να σχηματισθούν καλά πηκτώματα με LM πηκτίνες πρέπει η συγκέντρωση Ca^{2+} να είναι σε ορισμένα επίπεδα.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι άριστες συγκεντρώσεις Ca^{2+} για το σχηματισμό πηκτώματος με LM πηκτίνες σε mg/g είναι 4-10 για ενζυμικώς απομεθυλωμένες πηκτίνες και 30-60 για LM πηκτίνες που έχουν υποστεί όξινη απομεθυλίωση (Ishii et al. 1979). Τα πηκτώματα με γέφυρες ιόντων ασβεστίου σχηματίζονται χωρίς την παρουσία σακχαρόζης, όμως η αύξηση των διαλυτών στερεών με τη προσθήκη μικρής ποσότητας σακχαρόζης αυξάνει τη συνεκτικότητα του πηκτώματος. Η ικανότητα των LM πηκτινών να σχηματίζουν πηκτές με λιγότερη περιεκτικότητα σε ζάχαρη επιτρέπει τη παραγωγή διαιτητικών μαρμελάδων και ζελεδών, ενώ η ικανότητα τους να ζελοποιούν με ασβέστιο σε υψηλότερο pH, επιτρέπει αυτές να παράγουν ζελέδες με ευαίσθητα στην οξύτητα τρόφιμα, όπως το γάλα.

Η απαιτούμενη ενέργεια για ζελοποίηση με LM πηκτίνες είναι πολύ λιγότερη από την αντίστοιχη των HM πηκτινών. Τέλος τα πηκτώματα με LM πηκτίνες είναι θερμοαντιστρεπτά (δηλαδή υγροποιούνται κατά τη θέρμανση και ξαναπήζουν κατά τη ψύξη).

Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα της Πηκτής

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα της πηκτής είναι:

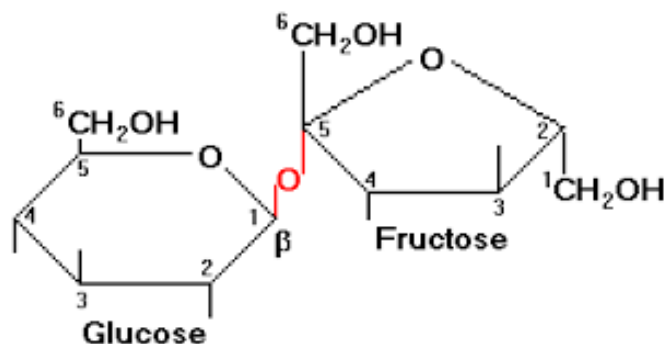
- Συνέχεια: (πλέγματος & πυκνότητα ινιδίων)
- Σκληρότητα: (ελέγχεται από την οξύτητα. Άριστο pH= 3,2)
- Ακαμψία: (ποσό & τύπος σακχάρου + οξύ, άριστη συγκέντρωση διαλυτών στερεών (σάκχαρο) 67,5%)
- Διαλύματα σακχαρόζης με περιεκτικότητα 56-68% έχουν την τάση να κρυσταλλώνονται
- Βρασμός παρουσία οξέος $\Rightarrow$ ιμμερτοποίηση(υδρόλυση ζάχαρης σε γλυκόζη και φρουκτόζη)

Άριστη ιμμερτοποίηση: 40% (60% σακχαρόζη & 40% γλυκόζη και φρουκτόζη) (Σακελλάρης 1986)

3.6. Σακχαρόζη

Η σακχαρόζη (sucrose) είναι οργανική κρυσταλλική, γλυκαντική ουσία και ο πλέον διαδεδομένος δισακχαρίτης στη φύση. Βρίσκεται σε διάφορα φυτικά προϊόντα (φρούτα, χαρούπια κ.α.). Η παραγωγή της ζάχαρης γίνεται, κυρίως, από τα σακχαρότευτλα και τα σακχαροκάλαμα μετά από κατάλληλη επεξεργασία. Ο μοριακός χημικός της τύπος είναι $C_{12}H_{22}O_{11}$ και στην καθαρή μορφή της είναι λευκή και άχρωμη. Όταν θερμαίνεται άνω των $20^{\circ}C$, μετατρέπεται σε μία μάζα κολλώδη με χρώμα καφέ και γεύση πικρή, η γνωστή μας καραμέλα. Όπως όλοι οι πολυσακχαρίτες, υδρολύεται σε διαλύματα οξέων ή βάσεων και σε ιδιαίτερα ένζυμα, οπότε χωρίζεται στους μονοσακχαρίτες που την αποτελούν. Αποτελείται από ένα μόριο α -D(+) γλυκόζης και ένα μόριο β -D (-) φρουκτόζης που συνδέονται μεταξύ τους με $\alpha, \beta \rightarrow 1,2$ γλυκοζιτικό δεσμό. Η σακχαρόζη διαλύεται εύκολα στο νερό και το διάλυμα της είναι δεξιόστροφο.

Κατά την υδρόλυσή της, είτε με το ένζυμο ιμβερτάση, είτε με αραιό οξύ, παράγεται ισομοριακό μίγμα D (+) γλυκόζης και D(-) φρουκτόζης.



Εικόνα 10: Δομή Μορίου Σακχαρόζης

Οι βασικότερες λειτουργίες της ζάχαρης στα τρόφιμα περιλαμβάνουν την διαλυτότητα της στο νερό και την ικανότητά της να μειώσει το σημείο ψύξης και να αυξηθεί το σημείο βρασμού. Η ζάχαρη είναι αποτελεσματική στη μείωση των σημείων πήξης.

Η ζάχαρη παίζει σημαντικό ρόλο στην επέκταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αρτοποιίας. Μπορεί να συνδεθεί με τα μόρια του νερού, επιβραδύνοντας την απώλεια υγρασίας και την πρόληψη του μπαγιατέματος στα ψημένα τρόφιμα. Επιπλέον, η γλυκόζη / φρουκτόζη μίγμα σε ιμβερτοποιημένη ζάχαρη που υπάρχει στις μαρμελάδες και ζελέ βοηθά στην αναστολή της ανάπτυξης μικροβίων και, αργότερα, της αλλοίωσης (Zumbe et al. 2001).

Η ζάχαρη μπορεί να ενεργήσει ως αντιοξειδωτικό σε ορισμένα συστήματα τροφίμων. Είναι σε θέση να μπλοκάρει ιόντα μετάλλων (π.χ. χαλκός, σίδηρος) και να αποτρέψει ή να επιβραδύνει τις αντιδράσεις οξείδωσης, που κάνουν τα τρόφιμα να επιδεινώνονται.

Τα κυριότερα είδη ζάχαρης που φέρονται στο εμπόριο είναι η κρυσταλλική ζάχαρη, η ζάχαρη άχνη που παράγεται από άλεση της κρυσταλλικής ζάχαρης και περιέχει άμυλο 3%, περίπου, για να αποφεύγεται το σβόλιασμα και η καφέ ζάχαρη (Brown sugar), η οποία είναι κρυσταλλική ζάχαρη με μικρές ποσότητες μελάσας.

Στην τεχνολογία των πηκτινών, η ζάχαρη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη γλυκαντική ουσία. Οστόσο τα τελευταία χρόνια γίνεται έρευνα με άλλες γλυκαντικές ουσίες

για να αντικατασταθεί μέρος της ζάχαρης. Σε πηκτίνες με μεγάλο αριθμό ολικών διαλυτών στερεών 68 % και πάνω παρατηρείται κρυσταλλοποίηση της ζάχαρης κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και για αυτό είναι απαραίτητη η χρήση ανάστροφου σακχάρου. Αν η συγκέντρωση ζάχαρης είναι πολύ υψηλή, το πήγμα κρατάει λιγότερο νερό με αποτέλεσμα να χάνει τις ιδιότητες του, πιθανώς λόγω υδρόλυσης (Belitz et al. 2009).

3.7. D - Μαννιτόλη

Η μαννιτόλη ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε το 1806 από τον Proust και είναι μια εξαενδρική γλυκο-αλκοόλη ισομερής της σορβιτόλης αλλά και της δουλσιτόλης. Αποτελεί την πρώτη κρυσταλλική αλδιτόλη που βρέθηκε και απομονώθηκε από φυτικούς ιστούς. Μεγαλύτερα ποσοστά της ουσίας υπάρχουν στα εξιδρώματα πλατανιών ή ελαιόδεντρων.

Παράγεται με υδρογόνωση προϊόντων που περιέχουν μονοσακχαρίτες όπως ινβερτοσάκχαρο ή αμυλοσιρόπια. Χρησιμοποιείται από όλες τις χώρες τις Ε.Ε. σαν γλυκαντική ύλη και σαν σταθεροποιητής σε καραμέλες, τσίχλες κ.α. στις ΗΠΑ θεωρείται σαν πρόσθετο και επιτρέπεται μόνο σε ορισμένα προϊόντα (Zumbe et al. 2001).

Είναι άσπρη και άοσμη κρυσταλλική ύλη με γλυκιά και δροσιστική γεύση. Η γλυκύτητα της είναι 50% από αυτήν της ζάχαρης. Η θερμιδική της απόδοση είναι 1,6 kcal/gr. Είναι ευδιάλυτη στο νερό ενώ ελάχιστα διαλυτή στην αιθανόλη και αδιάλυτη στον αιθέρα. Δεν εμφανίζει αντιδράσεις Maillard καθότι δεν διαθέτει ελεύθερες καρβονυλικές ομάδες και είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε αντίθεση με άλλες πολυόζες δεν είναι αρκετά υγροσκοπική.

Εξαιτίας της χαμηλής υγροσκοπικότητας είναι ιδανική για επικάλυψη σε σκληρές καραμέλες, ξηρά φρούτα και τσίχλες. Χρησιμοποιείται επίσης σε σοκολάτες χωρίς ζάχαρη, σιρόπι για το βήχα κ.ά. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συγκεντρώσεις άνω του 25% κατά βάρος. Κατάλληλα υποστρώματα με τα οποία μπορεί να συνδεθεί η μαννιτόλη είναι η ζελατίνη, η μεθυλοκυτταρίνη το άμυλο και η σορβιτόλη (Zumbe et al. 2001).

Η μαννιτόλη στον οργανισμό οξειδώνεται προς φρουκτόζη και απορροφάται με αργό ρυθμό με παθητική διαπήδηση μέσα στα έντερα γεγονός που σημαίνει ότι δεν 29 απαιτείται η ινσουλίνη και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια και από τους διαβητικούς. Εμφανίζει ακόμα καθαρκτικές και διουρητικές ιδιότητες (Belitz et al. 2009).

Πίνακας 3: Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά Σακχαρόζης και Μαννιτόλης (Zumbe et al. 2001)

	Σακχαρόζη	Μαννιτόλη
Μοριακό βάρος (g/mol)	342	182
Γλυκύτητα	1	0.5
Διαλυτότητα στους 20° C (% Dissolved Solids)	67	20
Υγροσκοπικότητα/ERH (στους 20° C)	84	94

Κεφάλαιο 4^ο: Τεχνικές και Μέθοδοι

4.1. Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες βασίζονται στην ατομική και μοριακή φασματοσκοπία. Η φασματοσκοπία είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει την περιοχή της επιστήμης, η οποία ασχολείται με την αλληλεπίδραση διαφόρων τύπων ακτινοβολίας με την ύλη. Η φασματοφωτομετρία και οι φασματομετρικές τεχνικές αναφέρονται στη μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας με φωτοηλεκτρικούς μεταλλάκτες ή άλλου τύπου ηλεκτρονικές διατάξεις.

Οι συχνότερα φασματομετρικές τεχνικές βασίζονται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία είναι ένας τύπος ενέργειας που εμφανίζεται με διαφορετικές μορφές, όπως είναι το φως και η ακτινοβολούμενη θερμότητα. Λιγότερο αισθητές μορφές είναι οι ακτίνες γ και οι ακτίνες Χ καθώς και η υπεριώδης ακτινοβολία, όπως οι ακτινοβολίες μικροκυμάτων και ραδιοσυχνοτήτων.

4.2. Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας οφείλεται στη διέγερση δεσμικών ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια τα μήκη κύματος των απορροφήσεων μπορούν να συσχετισθούν με τους τύπους των δεσμών στα εξεταζόμενα σωματίδια. Έτσι, η φασματομετρία μοριακής απορρόφησης αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο.

Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των δειγμάτων βασίστηκαν στη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis, που συνδέεται με τη μέτρηση της απορρόφησης. Η ζώνη απορρόφησης χωρίζεται σε δύο περιοχές, αυτή του εγγύς υπεριώδους στα 190-400nm και αυτή του ορατού στα 400-800nm (Skoog et al. 2017). Η τεχνολογία του συγκεκριμένου οργάνου βασίζεται στις μεταπτώσεις των μορίων, που συνδέονται με τη μεταβολή της κατάστασης τους από σταθερή σε διεγερμένη, λόγω της ακτινοβολίας που προσδίδεται σε αυτά. Συνεπώς, λαμβάνουν χώρα μεταπηδήσεις τροχιακών από τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας προς τα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας (McMurry et al. 2010).

Το όργανο αυτό αποτελείται από μία πηγή φωτός, ένα μονοχρωμάτορα, που επιλέγει το εύρος του μήκους κύματος που εκπέμπεται και έναν ανιχνευτή, ο οποίος λαμβάνει την ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα. Για την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται μία λάμπα δευτερίου, ενώ για την ορατή περιοχή χρησιμοποιείται μία λάμπα βολφραμίου. Τα φασματοφωτόμετρα χωρίζονται σε μονής και διπλής δέσμης, ανάλογα με το αν το ποσοστό ακτινοβολίας διέρχεται

ολοκληρωτικά διαμέσου του δείγματος ή αν χωρίζεται σε δύο δέσμες πριν φτάσει στο δείγμα, αντίστοιχα. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται και κυψελίδα αναφοράς (McMurry et al. 2010).

Πίνακας 4: Χρώμα που παρατηρείται ανάλογα με το μήκος κύματος

Περιοχή φάσματος	Χρώμα που παρατηρείται	Φυσικά προϊόντα λ _{max} απορρόφησης
400-420 nm	Κίτρινο	
420-440 nm	Πορτοκαλί	Β-καροτένιο (καρότο)/452 nm
440-490 nm	Κόκκινο	Λυκοπένιο (τομάτα)/474 nm
490-570 nm	Ιώδες	Κυανιδίνη (άνθη)/545 nm
570-585 nm	Μπλε	
585-620 nm	Γαλάζιο	
620-780 nm	Πράσινο	α-χλωροφύλλη (πράσινα φύλλα)/420 & 680 nm

4.2.1. Προσδιορισμός Ολικών Μονομερών Ανθοκυανινών

Ο προσδιορισμός των ολικών μονομερών ανθοκυανινών πραγματοποιείται με βάση την επίσημη μέθοδο «pH-differential method» των Wrolstad E. R., et al. (2005). Σύμφωνα με αυτή, οι μονομερείς ανθοκυανίνες υπόκεινται σε αντιστρεπτές αλλαγές χρώματος, όταν το pH του μέσου αλλάξει. Πιο αναλυτικά, σε pH 1.0 κυριαρχεί η μορφή του κατιόντος φλαβυλίου, η οποία είναι έγχρωμη και προσδίδει κόκκινο-πορτοκαλί χρωματισμό, ενώ, σε pH 4.5 κυριαρχεί η ημικεταλική μορφή, η οποία είναι άχρωμη. Η μέθοδος «pH-differential method» βασίζεται σε αυτή την ιδιότητα των μονομερών ανθοκυανινών και δίνει ακριβή και γρήγορα αποτελέσματα, ακόμα και υπό την ύπαρξη πολυμερών ανθοκυανινών, καθώς αυτές έχουν σταθερό χρώμα ανεξάρτητα του pH.

Οι αλλαγές στο χρώμα λόγω της μεταβολής του pH ανιχνεύονται φασματοφωτομετρικά (UV/Vis spectroscopy), με βάση τη διαφορά στην απορρόφηση στο λ_{vis-max} των μονομερών ανθοκυανινών και έτσι προσδιορίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε αυτές.

4.2.2. Χρώμα Πολυμερισμού

Ο προσδιορισμός του βαθμού πολυμερισμού των ανθοκυανινών στο χυμό του ροδιού πραγματοποιείται με την μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος το οποίο έχει προηγουμένως υποβληθεί σε επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο (Rodriguez-Saona et al. 2004). Οι ανθοκυανίνες αντιδρούν με τα όξινα θειώδη ιόντα και μετατρέπονται σε άχρωμες ενώσεις (αντίδραση προσθήκης). Η αντίδραση ευνοείται σε ισχυρά όξινο pH και είναι αμφίδρομη. Τα πολυμερισμένα σύμπλοκα ανθοκυανινών (ή ανθοκυανινών-ταννινών) είναι ανθεκτικά στη διαύγαση με όξινα θειώδη ιόντα, ενώ η ίδια αντίδραση ολοκληρώνεται πολύ γρήγορα για τις μονομερείς ανθοκυανίνες. Η απορρόφηση στα 420nm του διαυγασμένου

δείγματος με όξινο θειώδες νάτριο χρησιμεύει ως δείκτης του **χρώματος πολυμερισμού (polymeric color)**. Η **χρωματική πυκνότητα (color density)** ορίζεται ως το άθροισμα των απορροφήσεων στο μέγιστο μήκος κύματος, $\lambda_{\max}$ και στα 420nm. Η αναλογία μεταξύ του χρώματος πολυμερισμού και της χρωματικής πυκνότητας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ποσοστού του χρώματος που οφείλεται στα προϊόντα πολυμερισμού (**%polymeric color**).

Η απορρόφηση στα 420 nm του διαυγασμένου δείγματος λαμβάνεται γιατί η συσσώρευση σκουρόχρωμων χρωστικών ενώσεων αυξάνει την απορρόφηση στην κλίμακα απορροφήσεων από 400 έως 440 nm.

4.2.3. Μέθοδος Folin – Ciocalteu

Η εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων γίνεται σχεδόν αποκλειστικά με τη χρωματομετρική δοκιμή Folin-Ciocalteu (F-C) (Singleton & Rossi 1965). Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των ολικών φαινολικών συστατικών ενός φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών (Παππάς 2018).

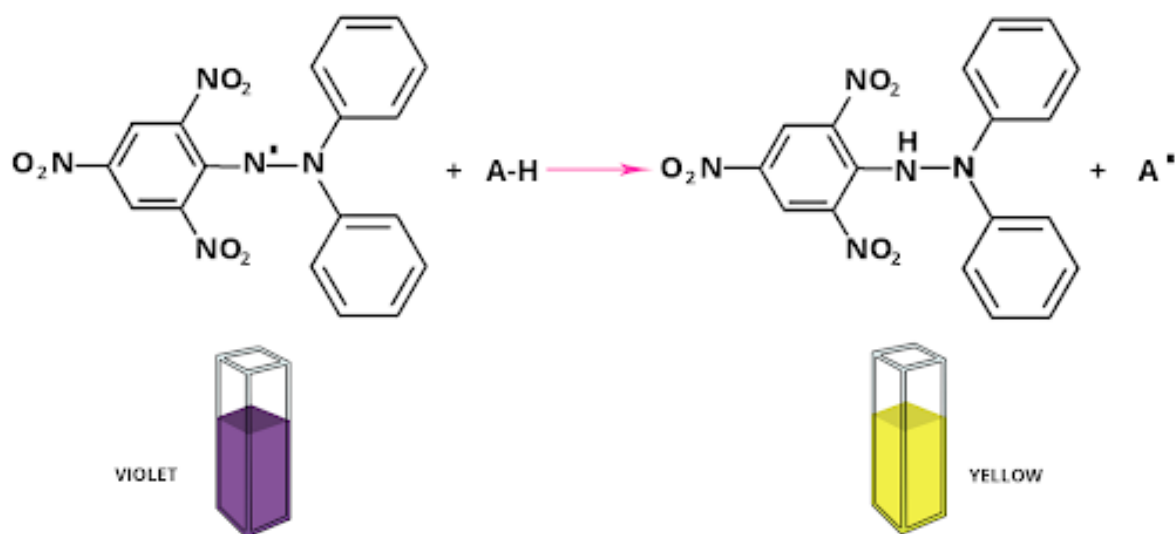
Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβολφραμικού ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφορομολυβδαινικού οξέος ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Η χημική αντίδραση δεν είναι ακριβώς γνωστή. Σε αλκαλικό περιβάλλον (διάλυμα Na_2CO_3), τα φαινολικά συστατικά οξειδώνονται ενώ τα ετεροπολυμερή οξέα ανάγονται σε μίγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}) μπλε χρώματος (Singleton & Rossi 1965).

Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση ενός φυτικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες εκφράζεται ως mg πρότυπης φαινόλης ανά kg ή (g) φυτικού υλικού ή δείγματος. Το αποτέλεσμα μπορεί να επηρεαστεί ουσιαστικά από την επιλογή του προτύπου και η σχετική συγκέντρωση των επιμέρους φαινολών στο προς ανάλυση δείγμα, καθώς και η μοριακή απορρόφηση ανά δραστική ομάδα φαινολών διαφοροποιείται (Μαλλούχος 2018).

4.2.4. Προσδιορισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με την Μέθοδο DPPH

Η ρίζα DPPH (1.1-διφαινυλο-1-πυκρλυδραζίλιο) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Αποτελεί μία από τις πιο γνωστές και ως αποτέλεσμα πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων φυσικών προϊόντων. (Brand-Williams et al. 1995) Η ρίζα DPPH αλληλοεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται, είτε μέσω της πρόσληψης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET), είτε μέσω της πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT).

Χαρακτηριστικό χρώμα του διαλύματος της DPPH είναι το μωβ (πορφυρό) χρώμα και απορροφά στα 515nm. Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων (κατά τα άλλα σταθερών) ριζών του DPPH και παραγωγή ανοιχτόχρωμου προϊόντος (από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο) και κατά επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης (Brand – Williams et al. 1995). Συνεπώς η ρίζα 1.1 διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) ανάγεται και μετατρέπεται σε 1.1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H) και μια νέα ελεύθερη ρίζα $A^\bullet$. Η προκύπτουσα ρίζα $A^\bullet$ είναι λιγότερο ενεργή και υπό αυτήν τη μορφή μπορεί να αναγεννηθεί και να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 11: Αναγωγή της ρίζας DPPH

Η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την έκφραση των αποτελεσμάτων είναι η “αποτελεσματική συγκέντρωση” ή αναφερόμενη ως τιμή EC50% ή IC50% η οποία αντιπροσωπεύει το ποσοστό του δείγματος-εκχυλίσματος που απαιτείται για να μειωθεί η απορρόφηση του διαλύματος DPPH κατά 50% (Brand – Williams et al. 1995). Η έκφραση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την τιμή IC50% έχει το μειονέκτημα ότι όσο πιο υψηλή είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο πιο χαμηλή είναι η τιμή IC50%, έτσι σε αποτελέσματα που παρουσιάζονται με μορφή ραβδογράμματος (bar chart) μπορούν να σχηματισθούν εσφαλμένα συμπεράσματα.

Αποτελεί *in vitro* τεχνική και κύριο πλεονέκτημά της είναι ότι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών του DPPH από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του δείγματος και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού διαλύματος αντίδρασης (π.χ. εκχύλισμα ροδιού-DPPH) δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Η μέθοδος DPPH θεωρείται ως μία σχετικά απλή μέθοδος στο τεχνικό της κομμάτι, παρουσιάζει όμως ορισμένα βασικά μειονεκτήματα τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στη χρήση της. Αν και η DPPH αποτελεί μία πολύ σταθερή ρίζα αζώτου, δεν καταδεικνύει κοινά σημεία με άλλες πολύ ενεργές υπεροξυ-ρίζες που παίρνουν μέρος στην λιπιδική υπεροξείδωση. Αρκετές αντιοξειδωτικές ουσίες που θα αντιδρούσαν

γρηγορότερα, όταν θα βρίσκονταν με κάποια άλλη από τις υπεροξυ-ρίζες, έχουν μεγαλύτερο χρόνο αντίδρασης ή και καθόλου με την DPPH (Παππάς 2018).

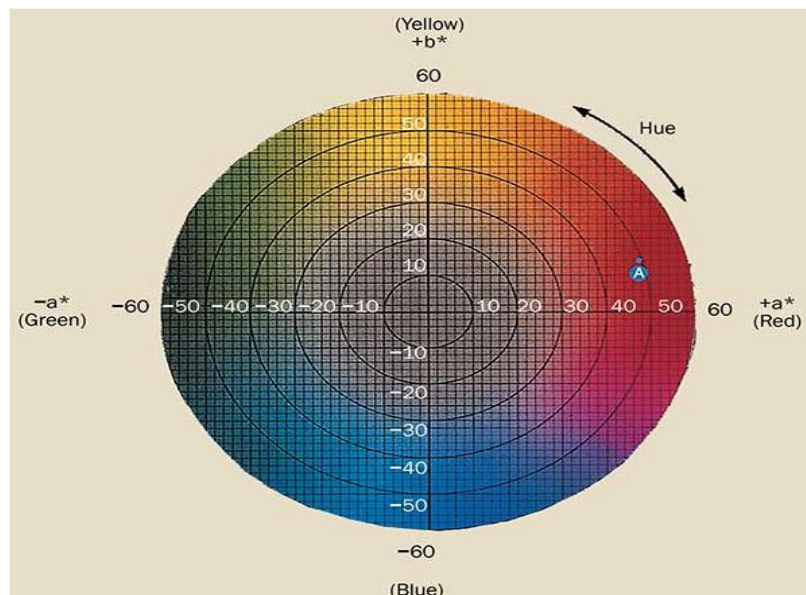
4.3. Μέτρηση Χρώματος

Το πιο σημαντικό σύστημα είναι το CIE (Commission Internationale de l'Eclairage, 1931). Τα χρωματομετρικά συστήματα της CIE είναι τα μόνα παγκοσμίως αποδεκτά για την μέτρηση του χρώματος με συνέπεια όλα τα διεθνή πρότυπα να είναι βασισμένα σε αυτά που ορίζονται από αυτή.

Το χρωματικό μοντέλο **CIELab** ή L^* , a^* , b^* πρόκειται για ένα ομοιόμορφο οπτικά χρωματικό χώρο (uniform color space) ο οποίος προσομοιάζει καλύτερα από όλα τα χρωματικά συστήματα ή μοντέλα στην ανθρώπινη αντίληψη των χρωματικών διαφορών. Το κάθε χρώμα περιγράφεται από 3 συντεταγμένες. Στο CIELab χρωματικό μοντέλο οι χρωματικές συντεταγμένες ονομάζονται L^* , a^* και b^* , (γι' αυτό και η ονομασία) και απεικονίζονται σε τρισδιάστατο καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων. Ο παράγοντας L^* (Lightness) αποθηκεύει όλη την πληροφορία φωτεινότητας της εικόνας παίρνοντας τιμές από 0 (μαύρο) έως 100 (λευκό) ενώ οι παράγοντες a^* και b^* την πληροφορία χρώματος χωρίς να υπάρχουν για αυτά κάποια αριθμητικά όρια. Θετικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κόκκινου. Αρνητικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του πράσινου. Θετικές τιμές του b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κίτρινου. Αρνητικές τιμές b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του μπλε.

Το χρωματικό μοντέλο που περιγράφεται CIELab, μπορεί να αναπαρασταθεί και σε κυλινδρικό σύστημα πολικών συντεταγμένων με το μοντέλο CIE L^* , C^* , h , όπου:

- L^* είναι η φωτεινότητα (Lightness)
- C^* (Chroma), Χρωματική πυκνότητα:
Προσδιορίζει την συγκέντρωση δηλαδή την ένταση ή την καθαρότητα του χρώματος ή διαφορετικά τη σχέση μεταξύ της εντονότητας και της φωτεινότητας της μελετώμενης απόχρωσης



Εικόνα 12: Το Χρωματικό Μοντέλο Cielab

- Χροιά h (hue angle):
Μετράται σε μοίρες και προσδιορίζει την απόχρωση παίρνοντας τιμές 0° για το κόκκινο-πορφυρό, 90° για το κίτρινο, 180° για το γαλαζοπράσινο και 270° για το μπλε.

Ο κορεσμός (saturation) ενός χρώματος περιγράφει τον βαθμό καθαρότητάς του σε σχέση με το ουδέτερο γκρι και προσδιορίζει άμεσα την ένταση του χρώματος. Ο κορεσμός των χρωμάτων συχνά αναφέρεται και ως chroma (C*) ή χρωματική πυκνότητα. Ο κορεσμός και το C* καθορίζουν την καθαρότητα μιας απόχρωσης. Για παράδειγμα, ένα έντονα καθαρό κόκκινο χρώμα έχει ένα υψηλό επίπεδο κορεσμού, ενώ ένα φτωχότερο / πιο σκούρο κόκκινο (κόκκινο αναμεμιγμένο με ένα μέρος της αντίθετης αποχρώσεώς του, οδηγεί το κόκκινο να πλησιάσει στο ουδέτερο γκρι) έχει χαμηλότερο επίπεδο καθαρότητας και συνεπώς κορεσμού.

Ο παράγοντας C* υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Ο παράγοντας h° υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$h^\circ = \text{τόξο εφαπτομένης } (b^*/a^*) \text{ για } a^* > 0 \text{ και } b^* \geq 0$$

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η καταγραφή του χρώματος με την κλίμακα τριών συντεταγμένων L-a-b (σύστημα Munsell). Η συνιστώσα L αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα, με το πολύ φωτεινό να μεταφράζεται ως L=100 και το σκοτεινό ως L=0. Η συνιστώσα a αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ του πράσινου (-a) και του κόκκινου (+a) και η συνιστώσα b αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ του μπλε (-b) και του κίτρινου (+b) (Figura & Teixeira, 2007).

Η μεταβολή του χρώματος συμβολίζεται ως ΔE και ισούται με (Sahin & Sumnu, 2006):

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Όπου :

ΔL είναι η μεταβολή της φωτεινότητας του δείγματος σε σχέση με ένα τυφλό και ισούται με: $\Delta L = L_{\text{δείγματος}} - L_{\text{τυφλού}}$

Δa είναι η μεταβολή κόκκινου / πράσινου και ισούται με: $\Delta a = a_{\text{δείγματος}} - a_{\text{τυφλού}}$

Δb είναι η μεταβολή κίτρινου / μπλε και ισούται με: $\Delta b = b_{\text{δείγματος}} - b_{\text{τυφλού}}$

4.4. Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί σήμερα μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών, προσφέροντας ακρίβεια, ευκολία και εξοικονόμηση χρόνου, αφού η ανάλυση είναι αρκετά σύντομη και δεν προ απαιτείται ιδιαίτερη κατεργασία των δειγμάτων.

Η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε κλασική, όταν η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση επιτυγχάνεται λόγω της βαρύτητας και η στατική φάση αποτελείται από σχετικά μεγάλης διαμέτρου σωματίδια και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography). Η χρωματογραφία υψηλής

απόδοσης υπερέχει των άλλων μεθόδων υγρής χρωματογραφίας λόγω της μεγάλης διακριτικής ικανότητας, της ταχύτητας, της ευαισθησίας και της δυνατότητας που παρέχει για ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που διαχωρίζει. Στην υγρή χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση είναι στέρεο πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε σταθερό υπόστρωμα, που ενσωματώνεται σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή (Λάμπρου 2017).

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
- Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρίεται η απορρόφηση του φωτός. Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι παρακάτω:
 - ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector),
 - ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD),
 - αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector),
 - ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
 - φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)
 - ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR) (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector),
 - ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector),
 - φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector).

Οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων, που είναι και οι πιο συχνά απαντούμενοι. Επίσης, αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται και φασματογράφοι μάζας.

- Καταγραφικό: Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης στέλνεται στη συνέχεια σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
- Δεξαμενή αποβλήτων: Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. Όταν είναι επιθυμητή η συλλογή κλασμάτων της κινητής φάσης, (όπως στην προπαρασκευαστική HPLC), χρησιμοποιείται αυτόματος κλασματοσυλλέκτης (fraction collector).

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και κινητής φάσης διακρίνεται σε:

- Κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη.
- Ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών. (Μαλλούχος 2018)

Τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό πολυφαινολών στα φυσικά προϊόντα, εφαρμόζονται σχεδόν αποκλειστικά μέθοδοι αναλυτικής χρωματογραφίας. Έπειτα, από την αποδοχή του Οργανισμού Αναλυτικής Χημείας (Assosiation of official Analytical Chemists, AOAC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης- ανάστροφης φάσης (reversed-phase high liquid chromatography, RP-HPLC) σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (ultraviolet-visible, UV-Vis), αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανάλυσης για τις συγκεκριμένες αναλύσεις. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με την σύγκριση των κορυφών του δείγματος με αυτές των πρότυπων (Standard) ουσιών. (Greiling H. & Ruediger R. 1991.)

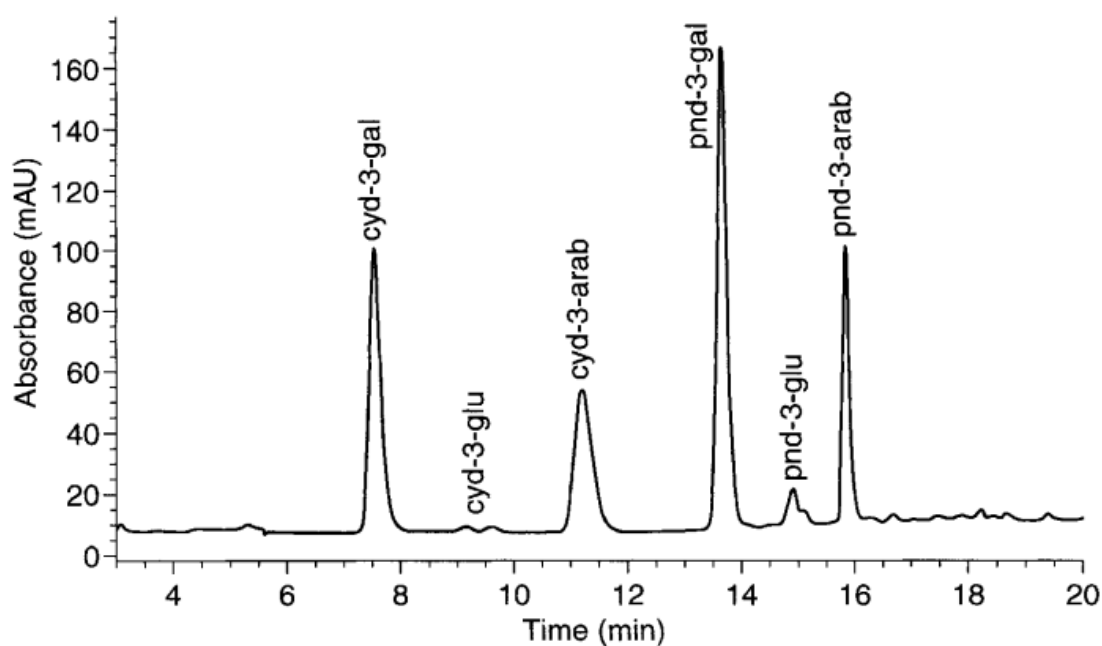
5.4.1. Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών

Η ανάλυση των ανθοκυανινών είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση προϊόντων καθώς το δαχτυλικό αποτύπωμα των ανθοκυανινών είναι ξεχωριστό για κάθε προϊόν. Έχει αποδειχθεί ότι η ανάλυση ανθοκυανινών μέσω HPLC μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό της γνησιότητας των διάφορων χυμών φρούτων που περιέχουν ανθοκυανίνες. Υπάρχουν μόνο έξι ανθοκυανιδίνες στην φύση, έτσι ένα χρωματογράφημα μπορεί συχνά να απλουστεύει την ανάλυση. Βοηθάει επίσης να επιβεβαιώνεται η ταυτότητα της μητρικής ένωσης ή των ενώσεων με ταυτοποίηση των αγλυκόνων.

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών είναι το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των ολικών καθώς και των επιμέρους ανθοκυανινών σε οποιοδήποτε τύπο φυτικού ιστού. Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης είναι από τα πιο σημαντικά βήματα στην ανάλυση των ανθοκυανινών και εξαρτάται από τον σκοπό της εκχύλισης, τη φύση των ανθοκυανινών και το αρχικό υλικό. Η γνώση των παραγόντων που επηρεάζουν τη δομή και τη σταθερότητα των ανθοκυανινών είναι ζωτικής σημασίας.

Στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στα κύτταρα κοντά στην επιφάνεια. Διαδικασίες εκχύλισης έχουν γενικά εμπλέξει τη χρήση όξινων διαλυτών, οι οποίοι μετουσιώνουν τις μεμβράνες του κυτταρικού ιστού και ταυτόχρονα διαλύουν τις χρωστικές ουσίες. Τα οξέα τείνουν να σταθεροποιούν τις ανθοκυανίνες αλλά επίσης μπορεί να αλλάξει τη μορφή της χρωστικής με σπάσιμο των ενώσεων με μέταλλα, συγχρωστικές ή άλλους παράγοντες.

Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων που περιέχουν ανθοκυανίνες είναι συχνά απαραίτητος, καθώς οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκχύλιση δεν είναι ειδικοί για τις ανθοκυανίνες. Ο καθαρισμός των ανθοκυανινών χρησιμοποιώντας εκχύλιση σε στερεή φάση (SPE) επιτρέπει στην απομάκρυνση αρκετών παρεμβαλλόμενων ενώσεων που υπάρχουν στα ακατέργαστα εκχυλίσματα. Οι μικροστήλες που περιέχουν C18 αλυσίδες συνδεδεμένες με πυρίτιο κατακρατούν υδρόφοβες οργανικές ενώσεις καθώς απομακρύνει ταυτόχρονα σάκχαρα και οξέα. Ξέπλυμα της στήλης με οξικό αιθυλεστέρα απομακρύνει τις φαινολικές ενώσεις εκτός από τις ανθοκυανίνες.



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα HPLC από χυμό cranberry. Οι κορυφές έχουν ταυτοποιηθεί πάνω στο σχήμα

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σταθερότητας του χρώματος χυμού ροδιού κατά την ενσωμάτωσή του σε πηκτές διάφορου βαθμού μεθυλίωσης και η επίδραση της προσθήκης καφεϊκού οξέος σε αυτές. Το χρώμα των μορίων των ανθοκυανινών *in vino* επηρεάζεται, εκτός από την τιμή pH του περιβάλλοντος, τη δομή και τη συγκέντρωσή τους, και από τη σύσταση του μέσου στο οποίο βρίσκονται. Η μεγάλη ποικιλία της σύστασης στα φυσικά προϊόντα έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση πολλών και διαφορετικών μορίων με τις ανθοκυανίνες. Η συγχρωμάτωση είναι μία από τις πιθανές αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα και γενικά θεωρείται ότι είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το χρώμα των φυτών *in vino*. Η συγχρωμάτωση ευθύνεται για τη σταθεροποίηση της έγχρωμης δομής των ανθοκυανινών και συνεπώς είναι υπεύθυνη για την ενίσχυση του χρώματός τους (Markovic et al., 2005).

Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις με συγχρωστική δράση με τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες και φλαβανόλες να έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Επιπλέον τα φαινολικά οξέα, παράγωγα του υδροξυκυαναμωμικού (κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό) και υδροξυβενζοϊκού οξέος (πρωτοκατεχουϊκό και γαλλικό), έχουν δείξει ισχυρή επίδραση στη σταθερότητα των ανθοκυανινών. Σε ερευνητικές εργασίες επίσης φάνηκε ότι το δεψικό οξύ (tannic acid) και το φερουλικό απέδωσαν ισχυρή υπερχρωμική μετατόπιση (hyperchromic effect) σε εκχυλίσματα σταφυλιών (Jamei & Babaloo, 2017).

Στην παρούσα εργασία χυμός ροδιού (εσοδείας 2019) ποικιλίας Ερμιόνη, που προμηθεύτηκε από την ομώνυμη περιοχή, ενσωματώθηκε σε πηκτές υψηλής (HM, μήλου και εσπεριδοειδών, degree of esterification 68%, MRS-150, Cargill) και χαμηλής μεθυλίωσης (LM, degree of esterification 29%, OFF-300C, Cargill). Το καφεϊκό οξύ προστέθηκε σε συγκέντρωση 333,9 mg/L, τηρώντας αναλογία 1:1 συγχρωστική : ανθοκυανίνες (Jamei & Babaloo, 2017). Επιπλέον στις LM πηκτές προστέθηκε η γλυκαντική ουσία μαννιτόλη προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση στην διατήρηση του χρώματος των ανθοκυανινών. Οι πηκτές διαμοιράστηκαν σε τρυβλία Petri και αποθηκεύτηκαν για διάστημα 50 ημερών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου (συμβατικά λαμβάνεται 4°C) σε κλειστούς περιέκτες για τον αποκλεισμό του φωτός.

Για την παρακολούθηση των χημικών μεταβολών των ανθοκυανινών και συνεπώς της μεταβολής του χρώματος των πηκτών, μετρήθηκε το χρώμα στο σύστημα CIE Lab και η ενεργότητα του ύδατος (aw). Οι ανθοκυανίνες εκχυλίστηκαν από τις πηκτές, σε τακτά χρονικά διαστήματα και στο εκχύλισμα μετρήθηκε η συγκέντρωση των ολικών μονομερών ανθοκυανινών, των προϊόντων πολυμερισμού, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση τους. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών που συγκρατήθηκαν στο πλέγμα των πηκτών έγινε με εκχύλιση με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Κεφάλαιο 5°: Πειραματικό Μέρος

5.1. Προετοιμασία Χυμού

Τα ρόδια που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην ελληνική ποικιλία ροδιών Ερμιόνη και προμηθεύτηκαν από την περιοχή της Ερμιόνης (Ν. Αργολίδας, Πελοπόννησος). Μετά από προσεκτική διαλογή απορρίφθηκαν τα τραυματισμένα φρούτα και τα υπόλοιπα αποφλοιώθηκαν με το χέρι.

Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν τα επισπέρμια από το δίκτυο των εσωτερικών μεμβρανών του καρπού και τοποθετήθηκαν σε υφασμάτινη μουσελίνα. Χειρωνακτικά διαχωρίστηκε ο χυμός από τα σπέρματα του καρπού, ο οποίος μοιράστηκε ισόποσα σε περιέκτες των 50 mL.

Οι περιέκτες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο για αποφυγή επαφής με το φως και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη θερμοκρασίας -80°C , έως ότου χρησιμοποιηθούν για ανάλυση.

Πριν από κάθε ανάλυση αποψύχεται η απαραίτητη ποσότητα χυμού και φυγοκεντρείται για $t = 15\text{min}$ στις 4000 στροφές ώστε να διαχωριστούν τα μη υδατοδιαλυτά συστατικά του.

5.2. Διαλύτες και Αντιδραστήρια

- Απιονισμένο Νερό (H_2O)
- Απεσταγμένο Νερό (H_2O)
- Μεθανόλη (CH_3OH)
- Αιθανόλη ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
- Οξικός Αιθυλεστέρας ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)
- Πυκνό Υδροχλώριο (HCl)
- Φορμικό Οξύ (HCOOH)
- Αδρανές Άζωτο (N_2)
- Folin - Ciocalteu
- Φυγοκεντρημένος χυμός Ροδιού
- Unipeptine MRS 150 Citrus (DE 68%)
- Unipeptine OF 300C (DE 29%)
- Σακχαρόζη
- D-Mannitol
- Βενζοϊκό Οξύ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$)
- Τρυγικό Οξύ ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$)
- Διένυδρο Τρυγικό Νάτριο ($\text{C}_4\text{H}_8\text{Na}_2\text{O}_8$)
- Καφεϊκό Οξύ ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$)
- Γαλλικό Οξύ $[(\text{OH})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}]$
- Χλωριούχο Ασβέστιο (CaCl_2)
- Χλωριούχο Κάλιο (KCl)
- Άνυδρο Κιτρικό Νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$)
- Μονοένυδρο Κιτρικό Οξύ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- Οξικό Νάτριο ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$)
- Μεταδιθειώδες Κάλιο ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$)
- Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3)

5.3. Υλικά – Σκεύη - Όργανα

5.3.1. Υλικά – Σκεύη

- Ποτήρια Ζέσεως Beaker
- Μαγνητάκια Ανάδευσης
- Πλαστικές Πιπέτες Pasteur (3mL)
- Μηχανικές Πιπέτες (1mL, 5mL)
- Τρυβλία Petri
- Ογκομετρικές Φιάλες (5mL, 10mL, 50mL, 100mL, 1L)
- Σιφώνια Πληρώσεως (5mL, 10mL)
- Σύριγγα Gas Tight
- Vial χωρητικότητας 5mL
- Vial χωρητικότητας 2mL για αυτόματο δειγματολήπτη
- Φιαλίδια με βιδωτό πώμα (10mL)
- Πλαστικές Κυψελίδες (4mL)
- Φιάλες Αποθήκευσης Duran
- Συσκευή Millipore
- Σύριγγες μιας χρήσης
- Φίλτρα Σύριγγος
- Σφαιρικές Φιάλες
- Κωνικές Φιάλες (10mL)

5.3.2. Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός, ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, Mettler AE200, (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)
- Όργανο προσδιορισμού τιμής pH, Five Easy Plus pH meter FP20 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)
- Χρωματόμετρο, Lovibond LC100 (Tintometer, Amesbury, UK)
- Συσκευή Ενεργότητας Ύδατος, Hygrolab C1 (Rotronic AG, Bassersdorf, Germany)
- Θερμαντικές Πλάκες Ανάδευσης
- Φυγόκεντρος, Hellenic Labware K80 (Hellenic Labware, Athens, Greece)
- Περιστροφικός Εξατμιστήρας Κενού
- Κυκλοαναδευτήρας τύπου Vortex , ZX₃ (Velp Scientifica, Usmate, Italy)
- Συσκευή Αντλίας Κενού για SPE
- Μικροστήλη, Chromabond C₁₈ (Macherey-Nagel, Düren, Germany).
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, Jasco V-530 (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- Σύστημα Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, Perkin Elmer Flexar FX-20 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)
- Στήλη, Kinetex EVO C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

5.4. Παρασκευή Διαλυμάτων

5.4.1. Ρυθμιστικό διάλυμα Τρυγικού Οξέος, pH 3.0

Για την δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος τρυγικού οξέος χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Τρυγικό Οξύ $C_4H_6O_6$** , M.Wt : 150.09 g/mol

Διάλυμα 0.1 M περιέχει 15.009 g/L

- **Διένυδρο Τρυγικό Νάτριο $C_4H_8Na_2O_8$** , M.Wt : 230.08 g/mol

Διάλυμα 0.1 M περιέχει 23.008 g/L

- **Απιονισμένο Νερό (H_2O)**

Για να έχει το Ρυθμιστικό Διάλυμα δείκτη pH = 3.00 ζυγίστηκαν 1.13 ± 0.01 g Tartaric Acid και 0.58 ± 0.01 g Sodium Tartate Dihydrate τα οποία αναμίχθηκαν σε 1L απιονισμένο νερό.

5.4.2. Διάλυμα Συγχρωμάτωσης Καφεϊκού Οξέος

Για την δημιουργία του διαλύματος συγχρωμάτωσης καφεϊκού οξέος χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Καφεϊκό οξύ, $C_8H_8O_4$** , M.Wt : 180.16 g/mol
- **Απιονισμένο Νερό (H_2O)**
- **Αιθανόλη (C_2H_6O)**

Από διάλυμα παρακαταθήκης καφεϊκού οξέος 1000mg/L (σε 80:20 v/v απ. H_2O /αιθανόλη) μεταφέρονται 38 mL σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και ο όγκος συμπληρώνεται με απ. H_2O . Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 380 mg/L από το οποίο μεταφέρονται 50 g (όση είναι και η ποσότητα του χυμού που ενσωματώνεται σε 500g πηκτής) στο διάλυμα του πολυμερούς.

5.4.3. Διάλυμα Χλωριούχου Ασβεστίου ($CaCl_2$)

Για την δημιουργία του διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Άνυδρο Χλωριούχο Ασβέστιο $CaCl_2$** , M.Wt : 110.98 g/mol
- **Απιονισμένο Νερό (H_2O)**

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL ζυγίστηκαν 0.1500 ± 0.0010 g $CaCl_2$ και ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.

5.4.4. Ρυθμιστικό Διάλυμα Χλωριούχου Καλίου (pH 1.0)

Για την δημιουργία του διαλύματος χλωριούχου καλίου χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Χλωριούχο κάλιο (KCl)**, M.Wt = 74.55 g/mol

Διάλυμα 0.025M περιέχει 1.86 g/L

- **Απεσταγμένο Νερό (H_2O)**

Ζυγίζεται 1.86 g KCl σε ποτήρι ζέσεως και προστίθενται 980 mL απεσταγμένου H_2O . Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος 1.0 ± 0.05 με τη χρήση πυκνού HCl. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1L και συμπληρώνεται έως τη χαραγή με απεσταγμένο νερό

Το pH του διαλύματος πρέπει να ελέγχεται και να ρυθμίζεται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

5.4.5. Ρυθμιστικό Διάλυμα κιτρικού οξέος (pH 3.5) (για τη μέτρηση των πολυμερών)

Για την δημιουργία του διαλύματος κιτρικού οξέος χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Άνυδρο Κιτρικό Νάτριο ($C_6H_5O_7Na_3$)**, M.Wt = 294.55 g/mol

Διάλυμα 0.0213M περιέχει 6.275g/L

- **Μονοένυδρο Κιτρικό Οξύ ($C_6H_8O_7$) + H_2O** , M.Wt = 210.14 g/mol

Διάλυμα 0.0787M περιέχει 15.11g/L

Ζυγίζεται 6.275 ± 0.001 g Άνυδρο Κιτρικό Νάτριο ($C_6H_5O_7Na_3$) και 15.11 ± 0.01 g Μονοένυδρο Κιτρικό Οξύ ($C_6H_8O_7$) + H_2O σε ποτήρι ζέσεως και προστίθενται σε 980 mL απεσταγμένου H_2O . Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος να είναι (1.0 ± 0.05) με πυκνό HCl. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη του 1L και πληρώνουμε τον όγκο της με απεσταγμένο H_2O . Το πρότυπο διάλυμα μεταφέρεται σε φιάλη τύπου duran και αποθηκεύεται στο ψυγείο για 1 μήνα. Πριν από κάθε ανάλυση, βγάζουμε την απαραίτητη ποσότητα πρότυπου διαλύματος ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και ρυθμίζουμε το pH του.

5.4.6. Ρυθμιστικό Διάλυμα Οξικού Νατρίου, 0,4M (pH 4.5) (για τη μέτρηση των μονομερών)

Για την δημιουργία του διαλύματος οξικού νατρίου χρειαστήκαμε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- **Οξικό Νάτριο ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)**, M.Wt = 136.08 g/mol
Διάλυμα 0.4M περιέχει 54.43 g/L
- **Απεσταγμένο Νερό (H_2O)**

Ζυγίζονται 54.43 g ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) σε ποτήρι ζέσεως και προστίθενται περίπου 960 mL απεσταγμένου H_2O . Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο 4.5 ± 0.05 με πυκνό HCl. Μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό έως τη χαραγή.

5.4.7. Διάλυμα Μεταδιθειώδους Καλίου (για τη μέτρηση των πολυμερών)

Διάλυση 1g μεταδιθειώδους καλίου ($K_2S_2O_5$) σε 5mL απεσταγμένου νερού.

Το αντιδραστήριο αυτό πρέπει να παρασκευάζεται την ίδια μέρα του πειράματος. Διαφορετικά αναπτύσσει κίτρινο χρώμα το οποίο θα συμβάλλει στη μέτρηση της απορρόφησης και θα παρεμβαίνει στη ποσοτικοποίηση.

5.4.8. Παρασκευή κινητής φάσης HPLC

5.4.8.1. Διαλύτης Α: Νερό οξινισμένο με 5 % v/v Φορμικό οξύ
Σε 475 mL απεσταγμένου νερού προσθέτουμε 25 mL φορμικού οξέος.

5.4.8.2. Διαλύτης Β: Μεθανόλη οξινισμένη με 5% v/v Φορμικό οξύ
Σε 475 mL CH_3OH προσθέτουμε 25 mL φορμικού οξέος.

Πριν από τη χρήση των διαλυτών στη χρωματογραφική ανάλυση και προκειμένου να μην υπάρχουν στερεά σωματίδια κατά τη ροή τους διαμέσου της στήλης διηθούνται υπό κενό σε συσκευή Millipore.

5.5. Προετοιμασία Πηκτών

Πίνακας 5: Σύσταση Πηκτών

500g πηκτής							
	HM			LM		LM-M	
Unipeptine MRS 150 Citrus	5.00 ± 0.01 g		Unipeptine OF 300C	5.00 ± 0.01 g		5.00 ± 0.01 g	
Buffer Τρυγικού Οξέος	70.00 ± 0.01 g	120.00 ± 0.01 g	H ₂ O	350.00 ± 0.01 g	400.00 ± 0.01 g	275.00 ± 0.01 g	320.00 ± 0.01 g
Διάλυμα Καφεϊκού Οξέος 380 mg/L	50.00 ± 0.01 g	-	Διάλυμα Καφεϊκού Οξέος 380 mg/L	50.00 ± 0.01 g	-	50.00 ± 0.01 g	-
Σακχαρόζη	325.00 ± 0.01 g		D-Mannitol	-	-	75.00 ± 0.01 g	
Βενζοϊκό Οξύ	0.2 ± 0.001 g		Βενζοϊκό Οξύ	0.2 ± 0.001 g		0.2 ± 0.001 g	
Φυγοκεντρη μένος Χυμός Ροδιού	50.00 ± 0.01 g		Φυγοκεντρημένο ς Χυμός Ροδιού	50.00 ± 0.01 g		50.00 ± 0.01 g	
			Διάλυμα 0,015% w/v CaCl ₂	50.00 ± 0.01 g		50.00 ± 0.01 g	

5g πηκτίνης προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα (τρυγικού οξέος) ή απιονισμένου νερού (οι ποσότητες φαίνονται στον Πίνακα 5) υπό συνεχή ανάδευση και θέρμανση στους 90°C έως την πλήρη διασπορά του πολυμερούς. Στη συνέχεια προστίθενται κατά περίπτωση 325g σακχαρόζης (65%) ή 75 g μαννιτόλης στις LM πηκτίνες (15%) και 0,2 g βενζοϊκού οξέος και η θέρμανση συνεχίζεται έως την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Το διάλυμα απομακρύνεται από την θερμαντική εστία και προστίθενται 50g χυμού ή και 50g καφεϊκού οξέος ή και 50 g δμ χλωριούχου ασβεστίου 0,015%w/v (στις LM πηκτίνες) και γίνεται ρύθμιση του βάρους στα 500g, είτε με την προσθήκη νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος είτε με την εξάτμισή τους.

Το διάλυμα του πολυμερούς μοιράζεται σε τρυβλία που το καθένα περιέχει 20g



Εικόνα 14: Προετοιμασία Δειγμάτων

(Hubberman et al. 2006). Οι πηκτές αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συντήρησης στο σκοτάδι για 8 εβδομάδες περίπου (60 ημέρες).

Πίνακας 6: Κωδικοποίηση Δειγμάτων

Κωδικοί	Κατάσταση	Περιγραφή	Θερμοκρασία Αποθήκευσης
HM	Πηκτή	Τρυγικό οξύ, 65% σακχαρόζη, 1% πηκτίνη	περιβάλλον
HM-4	Πηκτή	Τρυγικό οξύ, 65% σακχαρόζη, 1% πηκτίνη	ψύξη
HM-C	Πηκτή	Τρυγικό οξύ, 65% σακχαρόζη, 1% πηκτίνη,caffeic acid	περιβάλλον
HM-C4	Πηκτή	Τρυγικό οξύ, 65% σακχαρόζη, 1% πηκτίνη,caffeic acid	ψύξη
LM	Πηκτή	0.015% w/w Ca++, 1% πηκτινη	περιβάλλον
LM4	Πηκτή	0.015% w/w Ca++, 1% πηκτινη	ψύξη
LM-C	Πηκτή	0.015% w/w Ca++, 1% πηκτινη, caffeic acid	περιβάλλον
LM-C4	Πηκτή	0.015% w/w Ca++, 1% πηκτινη, caffeic acid	ψύξη
LM-M	Πηκτή	Ca++,15% μαννιτόλη,1% πηκτίνη	περιβάλλον
LM-M4	Πηκτή	Ca++,15% μαννιτόλη,1% πηκτίνη	ψύξη
LM-CM	Πηκτή	Ca++,15% μαννιτόλη,1% πηκτίνη, καφεϊκό οξύ	περιβάλλον
LM-CM4	Πηκτή	Ca++,15% μαννιτόλη,1% πηκτίνη, καφεϊκό οξύ	ψύξη

5.5.1. Εκχύλιση Ανθοκυανινών από τις Πηκτές

Η εκχύλιση των ανθοκυανινών από τις πηκτές πηκτίνης υψηλής και χαμηλής μεθυλίωσης έγινε σύμφωνα με τους Melgarejo et al., 2011. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 10 g πηκτής (1g χυμού) σε τεμάχια 2x2 cm. 75 mL διαλύματος Μεθανόλη/Οξικό οξύ/Νερό (25:1:24 v/v) προστέθηκαν στην τεμαχισμένη πηκτή και το μίγμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά (σε εστία με ανάδευση) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (Hellenic Labware K-80) στις 4000 rpm για 15min και διηθήθηκε με τη χρήση διηθητικού χαρτιού. Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό (40°C) σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 4 mL οξινισμένο νερό (0,01 % (v/v)). Τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των ολικών μονομερών και του χρώματος πολυμερισμού λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση 1:4 (1g χυμού/4 mL οξινισμένο νερό).

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται για την παραλαβή εκχυλίσματος χυμού ροδιού από τις πηκτές, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του κλάσματος των ανθοκυανινών. 5 g πηκτής (0.5g χυμού) σε τεμάχια 2x2 cm προστέθηκαν σε 75 mL

διαλύματος Μεθανόλη/Οξικό οξύ/Νερό (25:1:24 v/v) και το μίγμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (Hellenic Labware K-80) στις 4000 rpm για 5min και διηθήθηκε με τη χρήση διηθητικού χαρτιού. Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 4 mL οξινισμένο νερό (0,01 % (v/v) HCl), αραιώση 1:8 (0,5g χυμού/4 mL οξινισμένο νερό). Από το εκχύλισμα απομονώθηκε το κλάσμα των ανθοκυανινών με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) όπως περιγράφεται ακολούθως σε μικροστήλη Chromabond C₁₈ (500 mg, 6ml) (Rodriguez-Saona et al. 2004).

Για την παραλαβή των εκχυλισμάτων, από τις πηκτές, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin – Ciocalteu) και της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης (δοκιμή DPPH), χρησιμοποιήθηκαν 5 g πηκτής (0.5g χυμού) σε τεμάχια 2x2 cm και 20 mL μίγματος Μεθανόλη/Οξικό οξύ/Νερό (10:0.4:9.6 v/v) (αραιώση 1:40) και επαναλήφθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω, χωρίς να ακολουθήσει συμπύκνωση του διηθήματος.

5.6. Φασματοφωτομετρικοί Προσδιορισμοί

5.6.1. Προσδιορισμός ολικών μονομερών ανθοκυανινών

Η περιεκτικότητα σε μονομερείς ανθοκυάνες (ACNs) βασίστηκε στην μέθοδο που προτείνεται από τους Wrolstad, R.E. et al. 2005. Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου το χρώμα των μονομερών ανθοκυανινών εξαρτάται από το pH, με αποτέλεσμα η έγχρωμη μορφή οξονίου να επικρατεί σε pH 1,0, ενώ η άχρωμη ημικεταλική μορφή κυριαρχεί σε pH 4,5. Η διαφορά στην απορρόφηση των δύο διαλυμάτων στα 520 nm είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των έγχρωμων συστατικών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ως προς τον 3-γλυκοζίτη της κυανιδίνης (Cy-3-gluc). Οι πολυμερείς μορφές των ανθοκυανινών είναι ανθεκτικές και δεν αλλάζει το χρώμα τους με τις αλλαγές στο pH και συνεπώς δεν περιλαμβάνονται στις μετρήσεις καθώς απορροφούν τόσο σε pH 4,5 όσο και σε pH 1,0. Ο προσδιορισμός του παράγοντα αραιώσης (dilution factor, DF) του χυμού, έγινε με τη χρήση διαλύματος χλωριούχου καλίου (0,025M pH = 1.0), έως ότου η απορρόφηση του χυμού ροδιού βρεθεί εντός της γραμμικής περιοχής του φασματοφωτόμετρου ($A < 1,2$). Η αραιώση που προσδιορίστηκε για τα δείγματα προς εξέταση ήταν 1:20 (DF = 20).

Σύμφωνα με τη μέθοδο η ποσότητα του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% του συνολικού όγκου, ώστε να είναι επιτυγχάνεται η ρύθμιση του pH με τη χρήση των διαλυμάτων KCl με pH = 1.0 και CH₃COONa (0,4M) με pH = 4.5. Σε 2 ογκομετρικές φιάλες των 5 mL, προστίθεται 1 mL δείγματος και η πρώτη συμπληρώνεται με 4 mL διαλύματος KCl με pH = 1.0, ενώ η δεύτερη με 4 mL διαλύματος CH₃COONa (0.4M) με pH = 4.5.

Τα διαλύματα αναδεύονται και παραμένουν σε ηρεμία για 15 min. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης γίνεται σε δύο μήκη κύματος. Αρχικά στα 512 nm

(A_{512}), το οποίο είναι το $\lambda_{vis-max}$ των μονομερών ανθοκυανινών του δείγματος προς ανάλυση και στη συνέχεια στα 700 nm (A_{700}) για διόρθωση της θολότητας των δειγμάτων. Η μέτρηση της απορρόφησης θα πρέπει να γίνει σε χρονικό διάστημα εντός 20 – 50 min από την προετοιμασία. Ως τυφλό για τον μηδενισμό του οργάνου και στα δύο μήκη κύματος χρησιμοποιείται απεσταγμένο H_2O .

Η απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH=1.0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH=4.5}$$

Η συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανινών του δείγματος (**Monomeric Anthocyanin Pigment (MAP)** σε mg/L δείγματος) υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{MAP (cyanidin-3-glycoside equivalents, mg/liter)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$$\text{όπου: } A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH=1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH=4,5}$$

MW: μοριακό βάρος της cyanidin-3-glycoside (449.2 g/mol)

DF: ο συντελεστής αραιώσης που προσδιορίστηκε (DF = 20)

l: το μήκος διαδρομής σε cm

ϵ : η γραμμομοριακή απορροφητικότητα (σε $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$)

1000: για μετατροπή των g σε mg

5.6.2. Χρώμα Πολυμερισμού

Ο προσδιορισμός του παράγοντα αραιώσης (dilution factor, DF) για τη μέτρηση του χρώματος πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και στον προσδιορισμό των ολικών μονομερών, με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου καλίου.

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προσθέτουμε 2 mL δείγματος και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να γίνει η κατάλληλη αραιώση (DF=20).

Στη συνέχεια, γίνονται δύο επιμέρους διαλυτοποιήσεις όπου 2.8 mL του αραιωμένου δείγματος αναδεύονται στη μία περίπτωση με 0.2 mL απεσταγμένου H_2O (control solution) και στη δεύτερη με 0.2 mL από το Bisulfide solution (bleached solution).

Ακολούθως τα διαλύματα αναδεύονται και μένουν σε σκιερό μέρος για 15 min. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης των δειγμάτων γίνεται στα 420 nm (A_{420}), στα 512 nm (A_{512}) και στα 700 nm (A_{700}). Για να είναι ακριβής η μέτρηση θα πρέπει να γίνει σε χρονικό διάστημα εντός 20 – 50 min από την προετοιμασία. Εάν παραταθεί ο χρόνος λαμβάνονται αυξημένες μετρήσεις απορρόφησης. Ως τυφλό δείγμα για τον μηδενισμό του οργάνου σε όλα τα μήκη κύματος χρησιμοποιείται απεσταγμένο H_2O .

Ο υπολογισμός της χρωματικής πυκνότητας (color density) στο δείγμα ελέγχου (control solution) στο οποίο έχει γίνει προσθήκη απεσταγμένου νερού γίνεται όπως φαίνεται στη συνέχεια:

$$\text{Color density} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{512\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{DF}$$

Ο υπολογισμός του χρώματος πολυμερισμού (polymeric color) στο διαυγασμένο δείγμα (bleached solution) γίνεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Polymeric color} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{512\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{DF}$$

Τέλος ο υπολογισμός του ποσοστού του χρώματος πολυμερισμού έγινε μέσα από την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{polymeric color} = (\text{polymeric color} / \text{color density}) \times 100$$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστά %polymeric color.

5.6.3. Προσδιορισμός του Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη δοκιμή Folin - Ciocalteu (TPC)

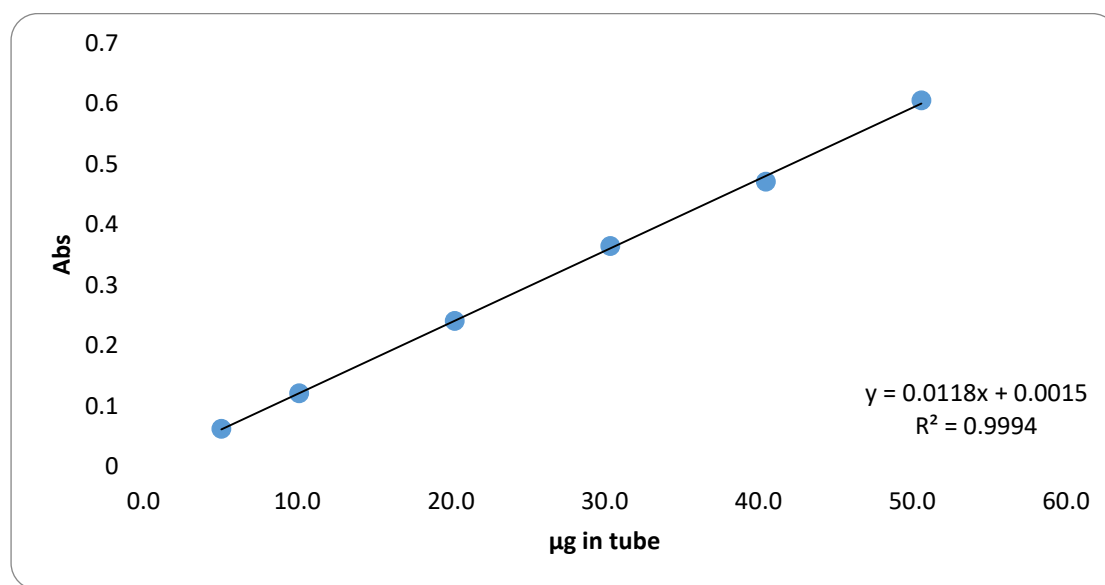
Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 1,00mL εκχυλίσματος και 5mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (αραιωμένο 1:10 v/v). Το περιεχόμενο αναδεύεται σε κυκλοαναμικτήρα για 1 min και μετά από 8min προστίθενται 4mL διαλύματος Na_2CO_3 (7.5% w/v). Το περιεχόμενο αναδεύεται σε κυκλοαναδευτήρα και αφήνεται στο σκοτάδι για 2 ώρες για την ανάπτυξη του χρώματος. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο UV/Vis διπλής δέσμης (Jasco V-530). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται τυφλό το οποίο παρασκευάζεται όπως περιγράφηκε ανωτέρω χρησιμοποιώντας μίγμα μεθανόλη : απιονισμένο Νερό (50/50 % v/v) αντί για δείγμα. Σε κάθε δείγμα, η αναλυτική πορεία ακολουθείται τρεις φορές και ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά χιλιοστόλιτρο χυμού ροδιού (mg GAE/mL). Για κάθε σημείο δειγματοληψίας (0, 18, 25, 35, 55, 69 και 82 ημέρα) παρασκευάστηκε νέα πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος: Για την συσχέτιση της απορρόφησης του φασματοφωτομέτρου με την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 1). Από διάλυμα εργασίας γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1 g/L σε μεθανόλη/νερό 50:50, παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας 500 mg/L σε μεθανόλη/νερό 60:40.

Στη συνέχεια, παρασκευάζεται πρότυπο πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος (stock) 500 mg/L ως εξής: Ζυγίζονται περίπου 0.0500 ± 0.001 g γαλλικού οξέος και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, η οποία περιέχει περίπου 30mL

μίγματος Μεθανόλη : Απιονισμένο Νερό (1/1). Αναδεύεται το περιεχόμενο προκειμένου να διαλυτοποιηθεί πλήρως το γαλλικό οξύ και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διαλύτη.

Από το μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος 500 mg/L, μεταφέρονται με μηχανικό σιφώνιο 100, 200, 400, 600, 800 και 1000 μ L σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα Μεθανόλη : Απιονισμένο Νερό. Αναδεύεται καλά το περιεχόμενο των φιαλών.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Γαλλικού Οξέος (για τη μέθοδο F-C)

5.6.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την χρήση της ελεύθερης ρίζας DPPH

2.00 mL του εκχυλίσματος (1/40) αραιώθηκαν με μίγμα μεθανόλης / νερού (1:1) σε ογκομετρική φιάλη των 10.00 mL. Έτσι η τελική αραιώση των εκχυλισμάτων είναι $1/40 \cdot 1/5 = 1:200$.

Η παρεμποδιστική δράση της ρίζας DPPH προσδιορίστηκε σύμφωνα Brand-Williams (1995). Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH σε μίγμα μεθανόλης / νερού (1:1) 1 mM και διάλυμα εργασίας 0,2mM. Στην συνέχεια, 2.00 mL εκχυλίσματος αναμειγνύονται με 2.00 mL του δ/τος εργασίας DPPH σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα και αναμειγνύονται με την χρήση vortex. Τα δείγματα αφήνονται στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Μετράται η απορρόφηση στα 517 nm σε πλαστικές κυψελίδες. Για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου χρησιμοποιείται μεθανόλη και ως δείγμα ελέγχου (control) χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 2.00 mL μίγματος μεθανόλης / νερού (1:1) και 2.00 mL του δ/τος εργασίας DPPH.

Το % ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

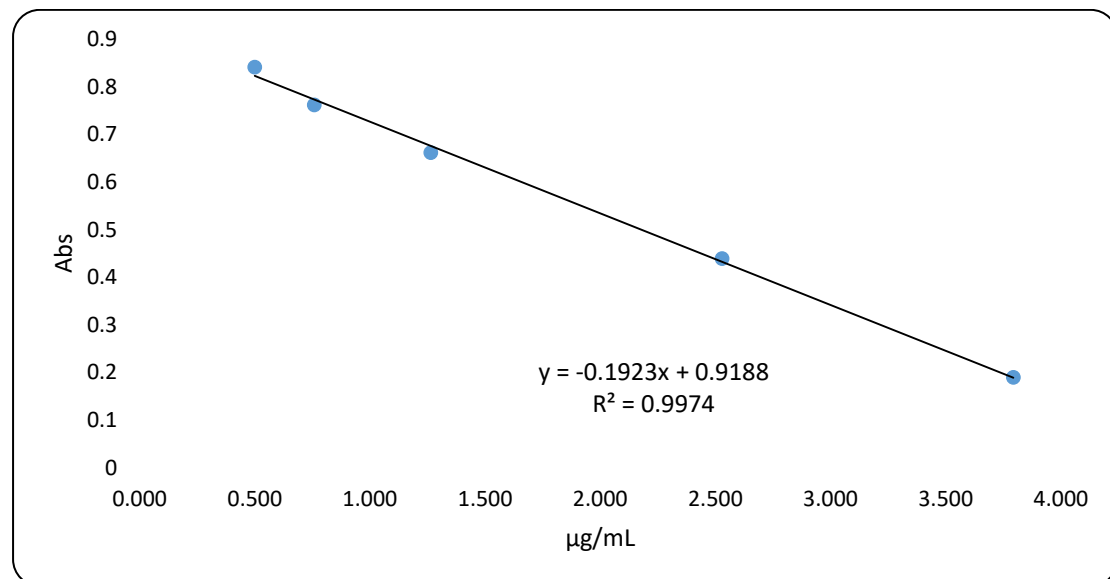
$$\% \text{Δέσμευση DPPH} = 100\% * \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}})}{A_{\text{Control}}}$$

Όπου:

A_{control} η απορρόφηση του διαλύματος ελέγχου στα 517 nm.

A_{sample} η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm.

Για την συσχέτιση του ποσοστού δέσμευσης της ρίζας DPPH με την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Από το διάλυμα εργασίας του γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1 g/L σε μίγμα μεθανόλης / νερού (1:1), παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης διαφορετικών συγκεντρώσεων (5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 και 50.0 $\mu\text{g/mL}$). Η μέτρηση της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων πραγματοποιείται όπως και στα δείγματα εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Ενδεικτικά παρατίθεται καμπύλη βαθμονόμησης με την αντίστοιχη εξίσωση στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη Καμπύλη Γαλλικού Οξέος (για την δοκιμή DPPH)

5.7. Σταθερότητα Χρώματος

Η αλλαγή στο χρώμα των ανθοκυανινών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης προσδιορίστηκε με χρωματόμετρο Lovibond LC100 (Tintometer, Germany) ακολουθώντας το χρωματικό μοντέλο της CIE Lab (1976). Το κάθε χρώμα περιγράφεται από τις συντεταγμένες L^* , a^* , b^* . Ο παράγοντας L^* (Lightness) αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα του δείγματος στο εύρος τιμών [0 (μαύρο) - 100 (λευκό)]. Οι παράγοντες a^* και b^* αντίθετα από τον παράγοντα L^* , δεν περιορίζονται σε αριθμητικά όρια. Ωστόσο θετικές τιμές του a^*

αντιπροσωπεύουν τις αποχρώσεις του κόκκινου, ενώ οι αντίστοιχες αρνητικές αντιπροσωπεύουν τις αποχρώσεις του πράσινου. Τέλος οι θετικές τιμές του b^* αντιπροσωπεύουν τις αποχρώσεις του κίτρινου και οι αντίστοιχες αρνητικές τις αποχρώσεις του μπλε.

Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες των 4 mL στην αρχή του πειράματος. Η μεταβολή του χρώματος ΔΕ υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Όπου τα ΔL^* , Δa^* και Δb^* , αντιπροσωπεύουν την αλλαγή των παραγόντων του χρώματος των πηκτών την ημέρα συγκριτικά με το χρώμα τους την ημέρα της ενσωμάτωσης του χυμού στις πηκτίνες.

5.8. Μέτρηση Ενεργότητας Ύδατος

Οι μετρήσεις της ενεργότητας ύδατος πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή Rotronic hygroLab. Για τη μέτρηση της ενεργότητας ύδατος οι πηκτές ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Μέρος της πηκτής τοποθετήθηκε στο ειδικό τρυβλίο του οργάνου για τη σωστή λήψη των μετρήσεων.

5.9. Προσδιορισμός Ανθοκυανινών με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Από το εκχύλισμα (βλέπε ενότητα 5.5.1) απομονώθηκε το κλάσμα των ανθοκυανινών με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) όπως περιγράφεται ακολούθως σε στήλη μικροστήλη Chromabond C₁₈ (500 mg, 6ml) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). (Rodriguez-Saona et al. 2004).

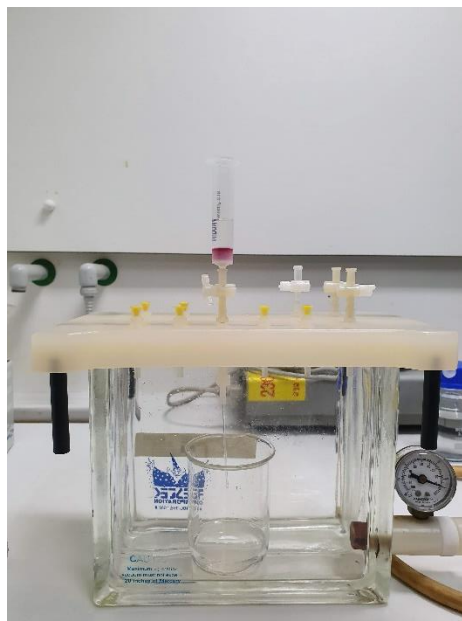
5.9.1. Διαδικασία Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

- Οξινισμένο απεσταγμένο νερό: 0,01 % (v/v) HCl
- Οξινισμένη μεθανόλη: 0,01 % (v/v) HCl

Η απομόνωση του κλάσματος των ανθοκυανινών έγινε ως ακολούθως:

1. Διαβροχή της μικροστήλης με 6 ml (one column volume) οξινισμένης μεθανόλης (conditioning)
2. Διαβροχή μικροστήλης με 6 ml (one column volume) οξινισμένου νερού για απομάκρυνση της μεθανόλης που έχει απομείνει
3. Φόρτωση/ Εισαγωγή 5 ml δείγματος (loading sample)

4. Διαβροχή της μικροστήλης με 12 ml οξινισμένου νερού για απομάκρυνση ενώσεων που δεν κατακρατήθηκαν στο προσροφητικό υλικό της μικροστήλης (π.χ. σάκχαρα, οξέα) (washing)
5. Διαβροχή με 12 ml οξικού αιθυλεστέρα για την έκλυση των φαινολικών συστατικών του δείγματος
6. Διαβροχή με οξινισμένη μεθανόλη και έκλυση των ανθοκυανινών. Η διαβροχή συνεχίζεται έως ότου το προσροφητικό υλικό χάσει τον κόκκινο χρωματισμό που είχε αποκτήσει (eluting). Το έκλουσμα παραλαμβάνεται σε σφαιρική φιάλη.
7. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους 40°C για την απομάκρυνση του διαλύτη.
8. Το εκχύλισμα των ανθοκυανινών επαναδιαλύεται σε 2 mL H_2O : MeOH (80:20 v/v) οξινισμένη με 5% v/v φορμικό οξύ και αποθηκεύεται στους -20°C σε ατμόσφαιρα αζώτου μέχρι την ανάλυση σε HPLC (Rodriguez – Saona et al. 2004).



Εικόνα 16: Διαδικασία SPE

5.9.2. Ανάλυση των Ανθοκυανινών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Perkin Elmer Flexar εξοπλισμένο με απαερωτή, αντλία τεσσάρων καναλιών, αυτόματο δειγματολήπτη, φούρνο και ανιχνευτή UV/Vis σειράς φωτοδιοδών (PDA). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη Kinetex EVO C₁₈ με 100 mm X 4.6 mm εσωτερική διάμετρο και μέγεθος σωματιδίου 2.6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) ρυθμισμένο στους 35°C.

5.9.2.1. Συνθήκες Ανάλυσης

Η ποσοτική ανάλυση των ανθοκυανινών στα δείγματα του πειράματος πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλυση που διήρκεσε 7.6 λεπτά και παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7: Συνθήκες Ανάλυσης HPLC

Συνθήκες HPLC			
Στήλη	Kinetex EVO C18 (100 mm X 4.6 mm id, df 2.6 μm)		
Θερμοκρασία στήλης	35°C		
Ροή	0.8 mL/min		
Όγκος έγχυσης	5 μL		
	Χρόνος (min)	Διαλύτης A %	Διαλύτης B %
Βαθμιδωτή έκλουση	0	80	20
	1	80	20
	5.5	70	30
	7.6	60	40
Διαλύτης A	H ₂ O οξινισμένο με 5% φορμικό οξύ		
Διαλύτης B	MeOH οξινισμένη με 5% φορμικό οξύ		

Ο όγκος του δείγματος που σε κάθε ανάλυση τροφοδότησε τη στήλη, μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, ήταν 5μL, ενώ η ροή ήταν σταθερή σε 0.8mL/min. Τα φάσματα καταγράφηκαν από τα 200 έως τα 600 nm. Ο καθαρός χρόνος ανάλυσης του κάθε δείγματος ήταν 7.6 λεπτά.

Πριν από την ανάλυση προηγήθηκε έκπλυση των καναλιών του οργάνου με διαλύτη, με ροή 5 mL/min για να απομακρυνθούν από το σύστημα υπολείμματα προηγούμενων διαλυτών και φυσαλίδων. Ακολούθησε εξισορρόπηση της στήλης με την διέλευση των διαλυτών στην αρχική τους αναλογία (80% A και 20% B) για μισή ώρα.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκε με ταυτοποίηση των κορυφών η οποία βασίστηκε στη σύγκριση φασμάτων των άγνωστων ενώσεων με αυτών πρότυπων ενώσεων από την. (Santiago et al. 2014) Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών, έγινε με τη χρήση εξωτερικής πρότυπης καμπύλης του χλωριδίου της κυανιδίνης (100, 50 και 10 ppm)

5.9.2.2. Διάλυμα παρακαταθήκης εξωτερικού προτύπου

Για την παρασκευή του διαλύματος παρακαταθήκης του χλωριδίου της κυανιδίνης (REF 0932S, Extrasynthese, Genay, France) 10.0 mg της ουσίας μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL που περιέχει 0,50 mg/mL tert-butylhydroquinone

(TBHQ). Ο όγκος συμπληρώνεται με μεθανόλη που περιέχει 2% HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA).

5.9.2.3. Διαλύματα βαθμονόμησης του χλωριδίου της κυανιδίνης

50 mg/L: σε φιαλίδιο του 1mL μεταφέρονται με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας 0.05mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του χλωριδίου της κυανιδίνης. Προστίθεται 0.95 mL από το διαλύτη A.

100 mg/L: σε φιαλίδιο του 1mL μεταφέρονται με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας 0.1mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του χλωριδίου της κυανιδίνης. Προστίθεται 0.9 mL από το διαλύτη A.

200 mg/L: σε φιαλίδιο του 1mL μεταφέρονται με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας 0.2mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του χλωριδίου της κυανιδίνης. Προστίθεται 0.8 mL από το διαλύτη A.

250 mg/L: σε φιαλίδιο του 1mL μεταφέρονται με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας 0.25mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του χλωριδίου της κυανιδίνης. Προστίθεται 0.75 mL από το διαλύτη A.

5.9. Στατιστική Ανάλυση

Σε όλα τα δείγματα έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, για να προσδιοριστεί αν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics Centurion XVI.I. Τα δείγματα εξετάσθηκαν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο διάστημα αυτό η κρίσιμη τιμή P-value, κάτω από την οποία τα δείγματα που εξετάζονται διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους είναι 0.05.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των ολικών μονομερών έγινε μέσω της πολυμεταβλητής ανάλυσης (multivariable analysis) ως προς δύο παράγοντες, τον τύπο της πηκτίνης που χρησιμοποιήθηκε (HM ή LM) και την θερμοκρασία αποθήκευσης ενώ εξετάστηκε και η επίδραση του καφεϊκού οξέος και της μαννιτόλης στην συγκέντρωση των ολικών μονομερών.

Για την συγκράτηση του χρώματος έγινε one way ANOVA ως προς τον παράγοντα της θερμοκρασίας αποθήκευσης και της παρουσίας ή μη καφεϊκού οξέος στις πηκτές HM, LM και LM-M.

Αποτελέσματα-Συζήτηση

6.1. Προσδιορισμός Ολικών Μονομερών Ανθοκυανινών

Τα ολικά μονομερή ανθοκυανινών (TAC%) των εκχυλισμάτων χυμού ροδιού που παραλήφθηκαν από τις πηκτές υψηλής (HM) και χαμηλής (LM) μεθυλίωσης με την προσθήκη ή μη καφεϊκού οξέος (C) και την παρουσία ή μη μαννιτόλης (M) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως προς την συγκράτηση των TAC % κατά την 20η και 60η ημέρα αποθήκευσης στο περιβάλλον και στο ψυγείο σύμφωνα με τον τύπο:

$$rel.TAC \% = \frac{TAC_t}{TAC_0} * 100$$

Όπου TAC_t το σύνολο των ανθοκυανινών την 20^η και 60^η ημέρα και TAC₀ το σύνολο των ανθοκυανινών την ημέρα ενσωμάτωσης του χυμού ροδιού στις πηκτίνες.

Πίνακας 8: Προσδιορισμός των Ολικών Μονομερών των Ανθοκυανινών μετά από αποθήκευση 20 και 60 ημερών

	rel. TAC ₂₀ %	rel. TAC ₆₀ %	
HM	44.5 ± 0.01a ¹	43.1 ± 0.02b	B ²
HM-4	87.4 ± 0.17a	59.5 ± 0.03b	B
HM-C	47.4 ± 0.06a	42.7 ± 0.03b	B
HM-C4	72.2 ± 0.01a	55.0 ± 0.02b	B
LM	75.9 ± 0.23a	74.5 ± 0.19a	C
LM-4	95.3 ± 0.26a	92.6 ± 0.26a	C
LM-C	90.9 ± 0.01a	58.5 ± 0.03b	C
LM-C4	88.0 ± 0.02a	67.9 ± 0.01b	C
LM-M	77.1 ± 0.18a	74.7 ± 0.02b	A
LM-M4	92.6 ± 0.02a	85.3 ± 0.05b	A
LM-CM	87.4 ± 0.18a	83.3 ± 0.14b	A
LM-CM4	90.4 ± 0.05a	81.0 ± 0.07b	A

¹:στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών αποθήκευσης επισημαίνονται με διαφορετικό μικρό γράμμα p<0.05

²: στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των HM LM και LM-M επισημαίνονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα p<0.05

Η προσθήκη καφεϊκού οξέος στις HM πηκτίνες είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των TAC% μετά από 20ημέρες αποθήκευση στο περιβάλλον (HM-C 47.4%).

Σε κάθε άλλη περίπτωση η παρουσία καφεϊκού οξέος επέφερε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των ολικών μονομερών και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης ενώ γενικά η χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης ευνόησε τη συγκέντρωση των ολικών μονομερών ανθοκυανινών. Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (multiple range test) στις LM και LMC πηκτές (με προσθήκη καφεϊκού οξέος), παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των TAC% δεν διέφερε σημαντικά στις LM πηκτίνες μετά από 20 και 60 ημέρες αποθήκευση και στις δύο θερμοκρασίες γεγονός που καταδεικνύει την σταθεροποίηση των ανθοκυανινών στις LM πηκτίνες. Οι Buchweitz et al. 2013a, οι οποίοι μελέτησαν την ενσωμάτωση χυμού φραγκοστάφυλου σε πηκτίνες HM και LM, συμπέραναν ότι η παρουσία μη εστεροποιημένων ομάδων GalA ευνοεί την συγκράτηση των ανθοκυανινών. Η παρουσία καφεϊκού οξέος στην LMC-20 απέδωσε την υψηλότερη τιμή rel. TAC20 % (90.9 ± 0.01) η οποία όμως δεν διέφερε σημαντικά από αυτήν της LM -20 (75.9 ± 0.23). Τέλος η μικρότερη τιμή της rel. TAC % παρατηρήθηκε στις LMC πηκτίνες μετά από 60 ημέρες είτε στο περιβάλλον (58.5 ± 0.03) είτε στο ψυγείο (67.9 ± 0.01) (με σημαντική διαφορά από τις αντίστοιχες στο περιβάλλον).

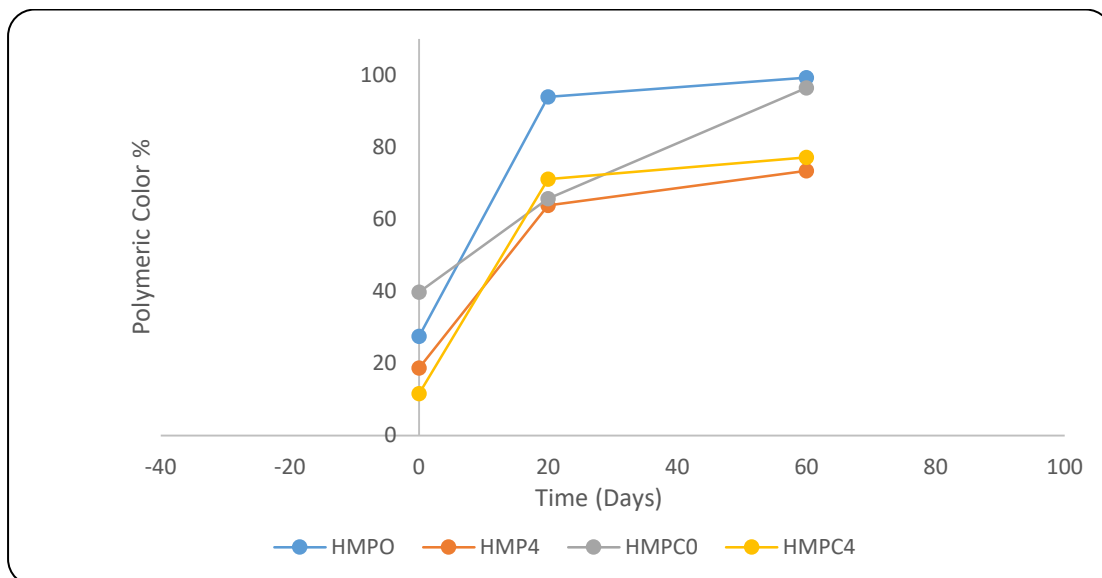
Η προσθήκη μαννιτόλης (LM-M) στην πηκτίνη LM δεν επέφερε σημαντική διαφορά στην τιμή rel. TAC60 % κατά την αποθήκευση στο περιβάλλον (**LM** 74.5 ± 0.19 και **LM-M** 74.7 ± 0.02) ενώ επέφερε σημαντική αύξηση στην τιμή της rel. TAC20 % στην ίδια θερμοκρασία (**LM** 75.9 ± 0.23 και **LM-M** 77.1 ± 0.18). Στην περίπτωση της αποθήκευσης σε θερμοκρασία ψυγείου, η παρουσία μαννιτόλης φαίνεται να μην ευνοεί την συγκράτηση ολικών μονομερών αφού σημειώθηκαν σημαντικά μικρότερες τιμές των rel. TAC20 % και rel. TAC60 %.

Η προσθήκη καφεϊκού οξέος και μαννιτόλης στην πηκτίνη LM οδήγησε σε σημαντική αύξηση των τιμών των rel. TAC20 % και rel. TAC60 % στις πηκτίνες που αποθηκεύτηκαν σε T περιβάλλοντος. Αντίθετα κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία ψυγείου η παρουσία καφεϊκού οξέος οδήγησε σε σημαντική μείωση των rel. TAC20 % και rel. TAC60 %.

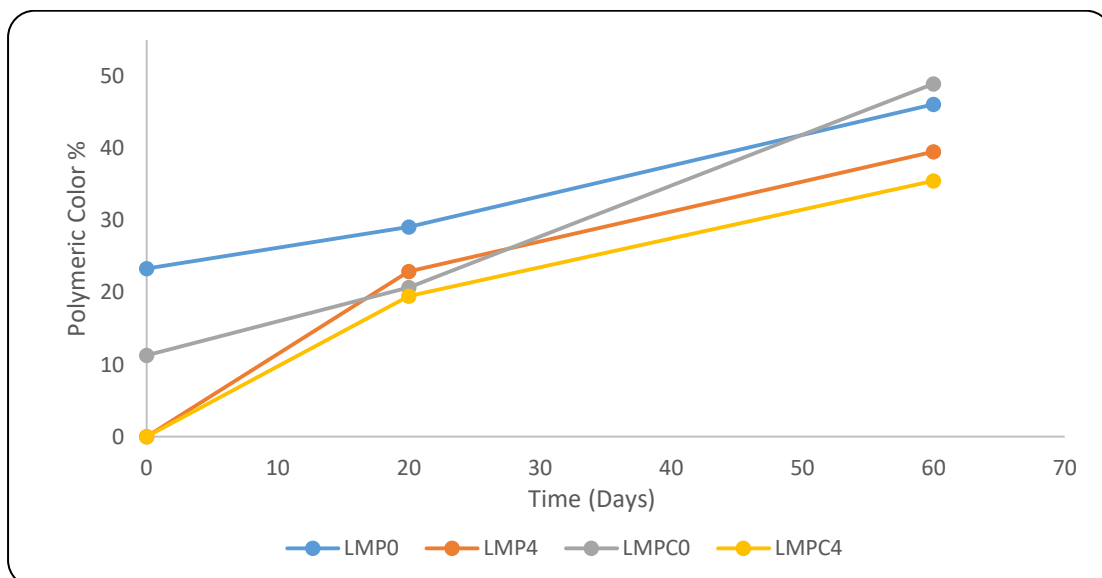
Όσον αφορά την θερμοκρασία αποθήκευσης είναι φανερό πως και στα δύο είδη πηκτινών HM και LM η αποθήκευση σε θερμοκρασία συντήρησης επιδρά θετικά στην συγκράτηση των μονομερών ανθοκυανινών.

Από τη στατιστική ανάλυση που έγινε με τη χρήση του προγράμματος Statgraphics Centurion και εφαρμογή two-way ANOVA φάνηκε ότι οι πηκτές HM, LM και LM-M διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς την συγκεντρωσή των ολικών μονομερών, ενώ η θερμοκρασία αποθήκευσης και η παρουσία καφεϊκού οξέος δεν φαίνεται να επηρεάζει.

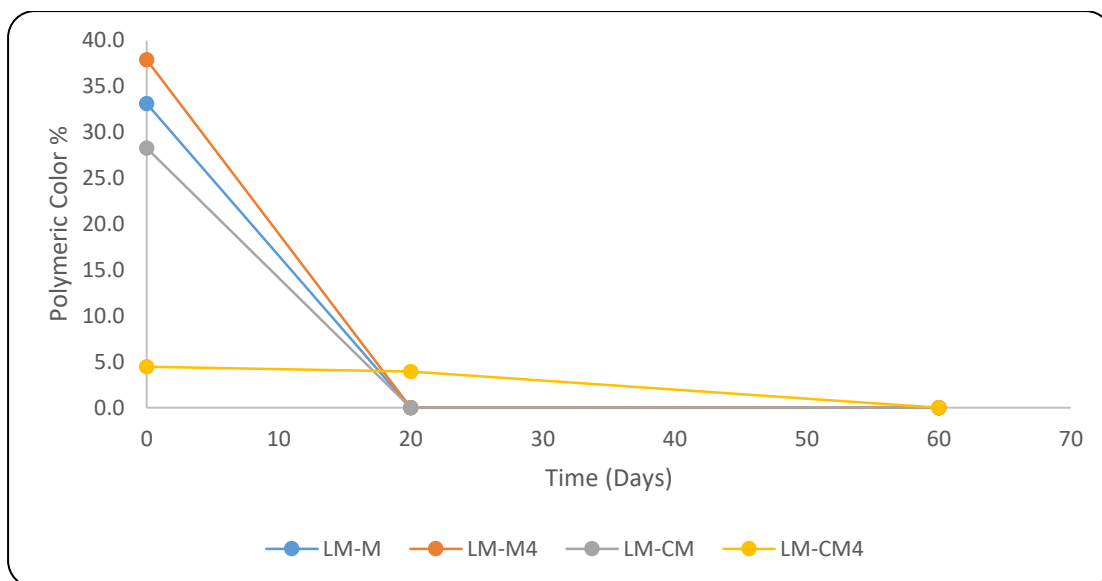
6.2. Χρώμα Πολυμερισμού Ανθοκυανινών



Διάγραμμα 3: Η εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού των HM πηκτών, παρουσία ή απουσία καφεϊκού οξέος, κατά την αποθήκευσή τους για 60 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου



Διάγραμμα 4: Η εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού των LM πηκτών, παρουσία ή απουσία καφεϊκού οξέος, κατά την αποθήκευσή τους για 60 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου



Διάγραμμα 5: Η εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού των LM πηκτών με προσθήκη μαννιτόλης, παρουσία ή απουσία καφεϊκού οξέος, κατά την αποθήκευσή τους για 60 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου

Στα Διαγράμματα 3 και 4 παρατηρείται μικρότερος σχηματισμός χρώματος πολυμερισμού κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των πηκτών σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) στα οποία το χρώμα πολυμερισμού λαμβάνει τιμή περίπου και 70% (Διάγραμμα 3) για τις HM πηκτές και 40% (Διάγραμμα 4) για τις LM πηκτές μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης. Η παρουσία της σακχαρόζης στις HM πηκτίνες φαίνεται να αυξάνει το χρώμα πολυμερισμού των ανθοκυανινών. Η παρουσία καφεϊκού οξέος καθυστερεί την εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στα δύο είδη πηκτινών ενώ δεν φαίνεται να επιδρά θετικά ή αρνητικά κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία ψυγείου. Όπως προκύπτει και από το Διάγραμμα 3 στα δείγματα HM και HM-C το χρώμα πολυμερισμού υπερβαίνει το 90% μετά το πέρας των 60 ημερών αποθήκευσης στο περιβάλλον, ενώ για τα δείγματα LM και LM-C το χρώμα πολυμερισμού είναι χαμηλότερο του 50% στον ίδιο χρόνο (Διάγραμμα 4).

Στον αντίποδα στις LM πηκτές στις οποίες ενσωματώθηκε μαννιτόλη (Διάγραμμα 5), παρατηρήθηκε μείωση του χρώματος πολυμερισμού το οποίο στην πορεία της αποθήκευσης μηδενίστηκε. Επειδή λίγα είναι γνωστά στη διεθνή βιβλιογραφία για το ρόλο της μαννιτόλης και γενικότερα των πολυολών στη σταθερότητα των ανθοκυανινών το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλή υγροσκοπικότητα της μαννιτόλης η οποία φαίνεται να προστατεύει το χρωμοφόρο C δακτύλιο των ανθοκυανινών από την πυρηνόφιλη προσθήκη μορίων νερού που συχνά οδηγεί σε απώλεια του χρώματος. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε κρυστάλλωση της μαννιτόλης.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια των ανθοκυανινών συνοδεύεται με μία αύξηση της τιμής του χρώματος πολυμερισμού (Sinela et al. 2017). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τα συμπεράσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Πράγματι, στις πηκτές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης η συγκέντρωση ολικών των

μονομερών ανθοκυανινών (TAC%) ελαττώνεται (Πίνακας 8), ενώ όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 3, Διάγραμμα 4) το χρώμα πολυμερισμού αυξάνεται σε πολύ υψηλά ποσοστά (μέχρι και 99% , HM). Από τα παραπάνω διαγράμματα επίσης φαίνεται ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των ανθοκυανινών, γεγονός που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Maier et al. 2009).

Τέλος από τα Διαγράμματα 3 και 4 φαίνεται ότι η παρουσία του καφεϊκού οξέος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού.

6.3. Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU

Για όλα δείγματα μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο τους κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους για 60 ημέρες.

Πίνακας 9: Φαινολικό περιεχόμενο των πηκτών HM και LM με ενσωματωμένο χυμό ροδιού, παρουσία ή απουσία καφεϊκού οξέος και μαννιτόλης, κατά την αποθήκευσή τους για 60 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου

Total Phenolic Content (GAE mg/L) ^{1,2}			
	Ημέρα 0	Ημέρα 20	Ημέρα 60
HM	1461.1 ± 39.6 ^{aA}	1599.6 ± 14.2 ^{bB}	1784.6 ± 13.0 ^{cD}
HM-4	1631.0 ± 15.5 ^{aB}	1709.9 ± 14.2 ^{bC}	1863.3 ± 18.5 ^{cEF}
HM-C	1829.7 ± 9.4 ^{aDE}	1866.3 ± 11.4 ^{aEF}	2363.5 ± 30.7 ^{bG}
HM-C4	1845.9 ± 7.7 ^{aDE}	1920.6 ± 30.4 ^{aF}	2384.8 ± 28.7 ^{bG}
LM	1467.5 ± 0.8 ^{aAB}	1511.2 ± 7.8 ^{aBC}	1611.7 ± 42.1 ^{bD}
LM-4	1424.7 ± 16.0 ^{aA}	1539.5 ± 16.0 ^{bC}	1660.6 ± 45.2 ^{cD}
LM-C	2068.6 ± 6.3 ^{aE}	2069.1 ± 8.0 ^{aE}	2574.5 ± 12.4 ^{bF}
LM-C4	2093.5 ± 14.5 ^{aE}	2133.3 ± 4.8 ^{aE}	2639.3 ± 44.1 ^{bF}
LM-M	1336.6 ± 8.2 ^{aB}	1389.1 ± 4.4 ^{bC}	1408.7 ± 16.4 ^{bC}
LM-M4	1313.3 ± 9.0 ^{aB}	1369.0 ± 30.2 ^{bA}	1445.8 ± 3.3 ^{cC}
LM-CM	1832.1 ± 3.1 ^{aF}	1970.1 ± 5.5 ^{bD}	2045.8 ± 12.1 ^{cG}
LM-CM4	1834.6 ± 13.1 ^{aF}	1967.7 ± 4.3 ^{bE}	2048.9 ± 16.6 ^{cG}

¹:στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών αποθήκευσης επισημαίνονται με διαφορετικό μικρό γράμμα (p<0.05)

²: στατιστικώς σημαντικές διαφορές των HM, LM και LM-M πηκτινών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και στις δύο θερμοκρασίες επισημαίνονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα (p<0.05)

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων (TPC) που παραλήφθηκαν από τις ΗΜ και LM πηκτές και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Σε κάθε περίπτωση σημαντική διαφορά παρατηρείται στην τιμή της TPC των δειγμάτων όπου έχει γίνει προσθήκη διαλύματος καφεϊκού οξέος, έναντι αυτών χωρίς την προσθήκη του οξέος. Η τιμή της TPC δεν επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία αποθήκευσης εκτός από δύο περιπτώσεις. Αυτήν όπου ο χυμός ενσωματώθηκε σε πηκτίνη ΗΜ χωρίς την προσθήκη καφεϊκού οξέος κατά την οποία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τιμής κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία ψυγείου. Και στην περίπτωση όπου ο χυμός ενσωματώθηκε σε πηκτίνη LM παρουσία μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος, στις 20 ημέρες αποθήκευσης, κατά την οποία η τιμή της TPC παρουσίασε σημαντική μείωση όταν αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία ψυγείου.

Στην βιβλιογραφία η αύξηση στην τιμή της TPC αποδίδεται στο γεγονός ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αντιδρά εκτός από τις μονομερείς ανθοκυανίνες και με τα προϊόντα αποικοδόμησης αυτών (αλδεΐδες, οξέα) καθώς και με τα προϊόντα πολυμερισμού τους (Buchweitz et al. 2013b). Οι Liu et al. 2018 διαπίστωσαν ότι οι ανθοκυανίνες αποικοδομούνται σε φαινολικά οξέα με το γαλλικό οξύ να είναι ένα από τα κύρια προϊόντα αποικοδόμησης τους.

Από τα προηγούμενα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μαννιτόλη παρεμποδίζει έως ένα βαθμό τις αντιδράσεις αποικοδόμησης και πολυμερισμού των ανθοκυανινών γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μετρήσεων του χρώματος πολυμερισμού (Κεφ. 6.2) αλλά και με αυτά της συγκέντρωσης ολικών μονομερών ανθοκυανινών (Κεφ. 6.1). Επιπλέον διαπιστώσαμε ότι η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία δεν φαίνεται να είχε σημαντική επίδραση στην τιμή της TPC.

6.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με τη δοκιμή DPPH

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε με υπολογισμό της παρεμποδιστικής δράσης των εκχυλισμάτων του χυμού ροδιού που παραλήφθηκαν από τις πηκτίνες, με χρήση της δοκιμής DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE mg/L) και παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε GAE (mg/L) των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν από πηκτές ΗΜ και LM, παρουσία ή απουσία καφεϊκού οξέος και μαννιτόλης, κατά την αποθήκευσή τους για 60 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου

	Ημέρα 0	Ημέρα 20	Ημέρα 60

HM	363.7 ^{A1}	380.2 ^B	396.9 ^C
HM4	368.6 ^A	434.4 ^D	462.6 ^F
HM-C	399.2 ^C	450.0 ^E	504.1 ^G
HM-C4	396.9 ^C	463.6 ^F	547.5 ^H
LM	404.4 ^A	427.5 ^B	545.6 ^F
LM4	407.6 ^A	438.3 ^C	563.3 ^G
LM-C	489.2 ^D	567.6 ^G	629.0 ^H
LM-C4	485.7 ^D	570.9 ^G	640.2 ^E
LM-M	380.9 ^A	387.0 ^A	433.4 ^{B^C}
LM-M4	381.2 ^A	422.1 ^B	480.3 ^D
LM-CM	435.9 ^{BC}	550.3 ^E	597.6 ^F
LM-CM4	442.4 ^C	539.6 ^E	609.5 ^F

¹: στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των HM LM και LM-M κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και στις δύο θερμοκρασίες επισημαίνονται με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα $p < 0.05$

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων κατά την 1^η, 20^η και 60^η ημέρα αποθήκευσης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αυξάνει σημαντικά με το χρόνο αποθήκευσης. Η αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία επιδρά σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αυξάνοντας την τιμή της. Εξαίρεση στην προηγούμενη παρατήρηση αποτελεί η περίπτωση που ενσωματώνεται καφεϊκό οξύ στις LM πηκτές παρουσία ή μη μαννιτόλης. Στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν από LM πηκτές οι οποίες είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου (LM-CM :550,3 mg/L GAE και LM-CM4: 539,6 mg/L GAE κατά 20^η ημέρα, LM-CM :597,6 mg/L GAE και LM-CM4: 609,5 mg/L GAE κατά 60^η ημέρα, LM-C :567,6 mg/L GAE και LM-C4: 570,9 mg/L GAE κατά 20^η ημέρα).

Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από τις LM πηκτές παρουσίασαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση τόσο κατά την 20^η όσο και την 60^η ημέρα αποθήκευσης και στις δύο θερμοκρασίες. Η παρουσία μαννιτόλης μείωσε τις τιμές της μέτρησης κατά τη χρονική περίοδο και τις θερμοκρασίες αποθήκευσης που μελετήθηκαν. Η υψηλότερη τιμή της αντιοξειδωτικής δράσης σημειώθηκε στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από LM πηκτές παρουσία καφεϊκού οξέος μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης (640,2 mg/L GAE) στο ψυγείο ενώ χωρίς την παρουσία καφεϊκού οξέος υψηλότερη τιμή σημειώθηκε στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από LM πηκτές μετά από 60 ημέρες αποθήκευσης στο ψυγείο (563,3 mg/L GAE).

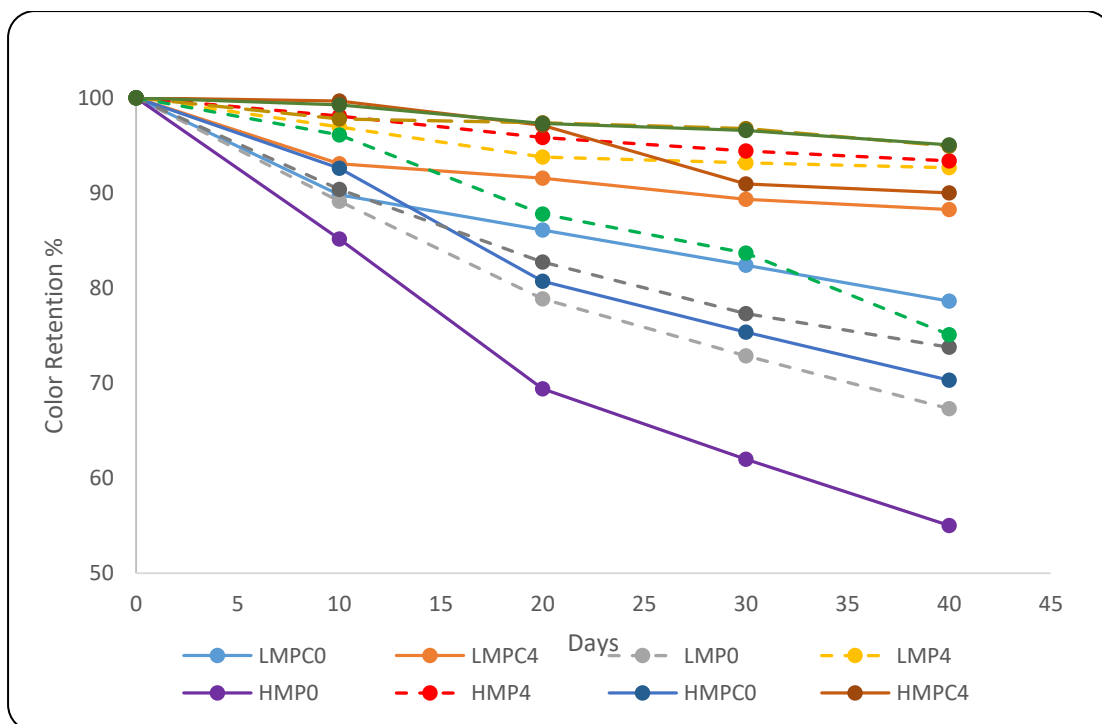
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι στη δοκιμή της ελεύθερης ρίζας DPPH , όπως και στη μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU επιδρούν θετικά εκτός από τις μονομερείς ανθοκυανίνες και τα προϊόντα αποικοδόμησης αυτών (αλδεΐδες, οξέα) καθώς και τα προϊόντα πολυμερισμού τους (Buchweitz et al. 2013b). Είναι γεγονός όμως ότι η δραστηριότητα και ο μηχανισμός δράσης των ενώσεων με αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη σύνθεση των αντιδραστηρίων και των συνθηκών των μεθόδων που εφαρμόζονται. Επομένως απαιτούνται περισσότερες από μία δοκιμές μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας για να αξιολογηθεί σωστά η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (Çam et al., 2009).

6.5. Χρώμα

Η αποικοδόμηση του χρώματος των ΗΜ και LM πηκτών εκφράστηκε ως ποσοστό συγκράτησης του χρώματος, **Color Retention (CR)**, χρησιμοποιώντας την παράμετρο a^* value κατά την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης. Η τιμή του CR υπολογίζεται ως το πηλίκο της τιμής a^*_t στο χρόνο αποθήκευσης προς την αρχική τιμή a^*_0 πολλαπλασιασμένη επί 100, και χρησιμοποιείται ως μέτρο της σταθερότητας του κόκκινου χρώματος. Η αρχική τιμή (CR₀%) προσδιορίστηκε μετά την εξισορρόπηση των πηκτών για 2 ώρες και το ποσοστό συγκράτησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης εκφράστηκε σε σχέση με την ημέρα 0 (Hubbermann et al., 2006).

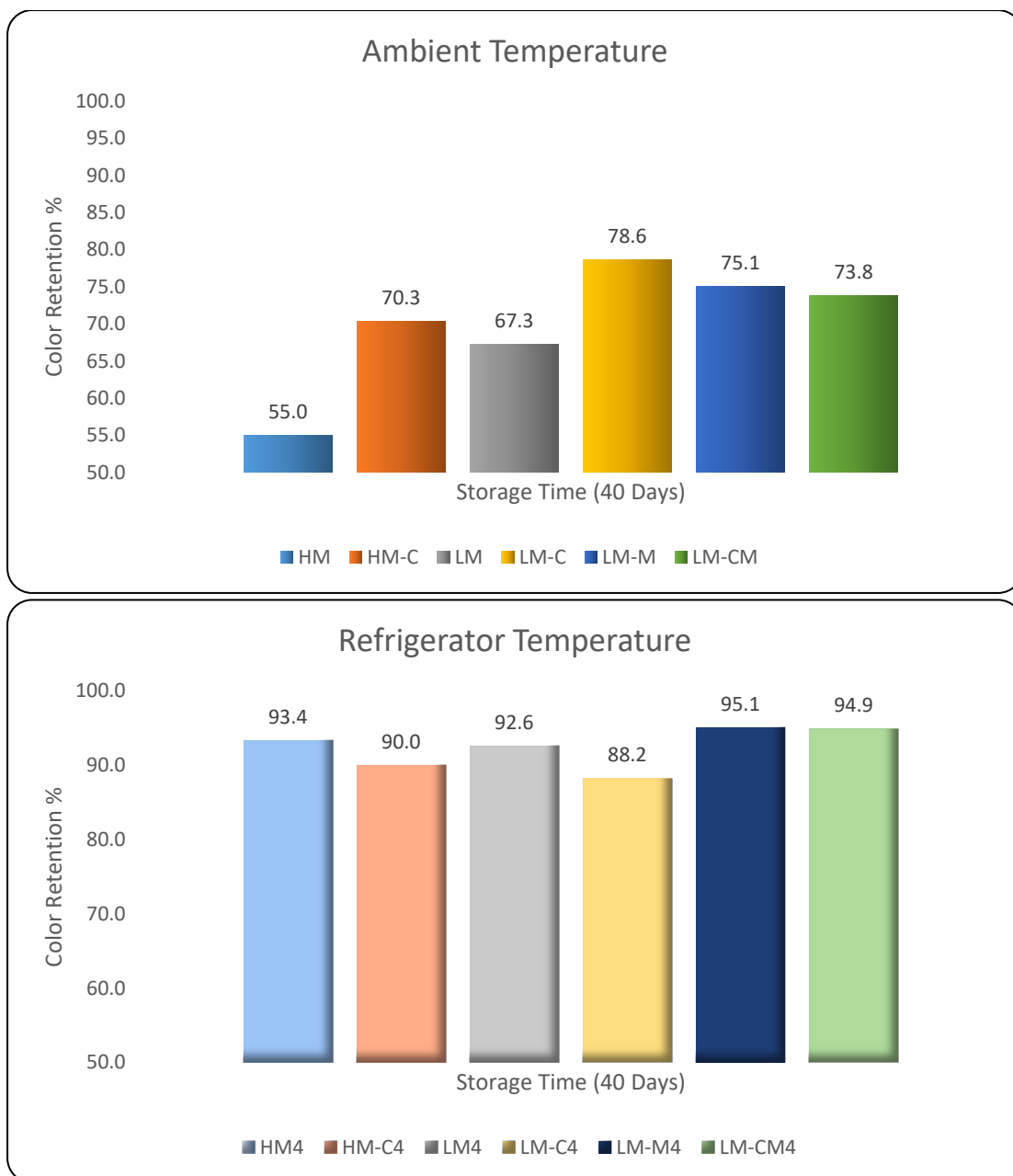
$$CR\% = \frac{a_t^*}{a_0^*} \times 100$$

Όπου a_t^* η τιμή της a^* τη δεδομένη στιγμή t και a_0^* η αρχική τιμή της a^* .



Διάγραμμα 6: Η μεταβολή της τιμής «συγκράτηση του χρώματος» (CR%) στις πηκτές με ενσωματωμένο χυμό ροδιού, κατά την αποθήκευσή τους για 40 ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψυγείου

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως οι HM και LM πηκτές που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης συγκράτησαν το κόκκινο χρώμα των ανθοκυανινών του χυμού ροδιού σε ποσοστό μεγαλύτερο από 88%. Τη χαμηλότερη συγκράτηση χρώματος εμφάνισε η πηκτή HM που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($CR\%_{HMO}=55.0\%$) ακολουθούμενη από την πηκτή LM στην ίδια θερμοκρασία ($CR\%_{LMO}=67.3\%$). Η παρουσία μαννιτόλης 15%w/w, καθώς και μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος φαίνεται να επηρέασε θετικά τη συγκράτηση του χρώματος αφού παρουσίασαν την μεγαλύτερη τιμή CR% μετά από 40 ημέρες αποθήκευση σε θερμοκρασία ψυγείου.



Διάγραμμα 7: Σύγκριση της Συγκράτησης του Χρώματος (CR%) των πηκτών σε Θερμοκρασία Περιβάλλοντος και Θερμοκρασία Ψύξης μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης

Πιο αναλυτικά όπως απεικονίζεται και στο **Διάγραμμα 7**, η αποθήκευση των πηκτών σε θερμοκρασία ψύξης είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη συγκράτηση του κόκκινου χρώματος μετά από αποθήκευση 40 ημερών. Η τιμή CR% για τα δείγματα HM και HM-C σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρέθηκε ίση με 55% και 70.3% αντίστοιχα κατά την 40η ημέρα αποθήκευσης ενώ σε θερμοκρασία ψυγείου υπολογίσθηκε στα 93.4% και 90,0% αντίστοιχα (**Διάγραμμα 7**). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στις LM πηκτές. Από το Διάγραμμα επίσης φαίνεται ότι η παρουσία 15% w/w μαννιτόλης είχε ευνοϊκή επίδραση στη συγκράτηση του χρώματος κατά την αποθήκευση και στις δύο θερμοκρασίες. Αρκετά μεγάλη φαίνεται να είναι η επίδραση του καφεϊκού οξέος, στην συγκράτηση του χρώματος, στις HM (CR%

HM=55% και CR% HM-C=70.3) και LM πηκτές (χωρίς παρουσία μαννιτόλης) (CR% LM 67.3 και LM-C=78.6) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (**Διάγραμμα 7**). Αντίθετα σε όλα τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης φαίνεται ότι η προσθήκη καφεϊκού οξέος δεν είχε την ίδια θετική επίδραση στην συγκράτηση του χρώματος όπως παρατηρήθηκε προηγούμενα. Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σταθερότητα των ανθοκυανινών, και συνεπώς τη σταθερότητα του χρώματος των συστημάτων στα οποία ενσωματώνονται.

Η αποικοδόμηση του κόκκινου χρώματος ακολουθεί 1^ης τάξης κινητική και ο φυσικός λογάριθμος της αναλογίας CRt: CR0 απεικονίστηκε γραφικά έναντι της περιόδου αποθήκευσης (t [ημέρες]). Η κλίση του γραφήματος ισοδυναμεί με k, από την οποία εξάγεται η ενέργεια ενεργοποίησης.

$$\ln \frac{CR_t}{CR_0} = -k * t$$

Υπολογισμός **Ενέργειας Ενεργοποίησης**: Όταν η σταθερά ταχύτητας για την αντίδραση σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες είναι γνωστή, η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω σχέση:

$$\ln \left(\frac{k_2}{k_1} \right) = \frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

Όπου E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης (kJ mol⁻¹); R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.3145 J mol⁻¹K⁻¹); T: η θερμοκρασία (K), T₂ = 273.15+20°K και T₁=273.15+4°K και k₁ είναι η σταθερά αντίδρασης στην θερμοκρασία T₁ και K₂ είναι η σταθερά αντίδρασης στην θερμοκρασία T₂.

Ο χρόνος ημιζωής (shelf-life) και ο χρόνος αποικοδόμησης D (destruction time) είναι οι χρόνοι για την κατά 50% και 90% αποικοδόμηση των ανθοκυανινών, αντίστοιχα (Buchweitz et al., 2013a).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

$$D = \frac{\ln(10)}{k}$$

Πίνακας 11: Συγκράτηση του χρώματος (CR%) και παράμετροι κινητικής της αποικοδόμησης του χρώματος των HM και LM πηκτών παρουσία ή απουσία μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος, μετά από αποθήκευση 40 ημερών

Συγκράτηση του Χρώματος (CR %)				
Day 20	Day 40	t _{1/2} (weeks)	D (weeks)	E _a (kJ/mol)

HM	69.38 ± 0.09	a ¹	55 ± 0.03	a	6.5	21.8	89.8
HM-4	95.81 ± 0.07	c	93.36 ± 0.16	d	55.0	182.7	
HM-C	80.7 ± 0.08	b	70.3 ± 0.12	b	10.9	36.1	38.0
HM-C4	97.1 ± 0.22	d	90 ± 0.30	c	26.8	88.9	
LM	78.9 ± 0.22	a	67.3 ± 0.14	a	10.0	33.2	69.7
LM-4	93.8 ± 0.11	d	92.6 ± 0.15	d	52.1	173.1	
LM-C	86.08 ± 0.07	b	78.61 ± 0.12	b	22.5	74.7	37.7
LM-C4	91.53 ± 0.06	c	88.23 ± 0.21	c	55.0	182.7	
LM-M	87.8 ± 0.07	b	75.1 ± 0.07	b	12.5	41.6	76.2
LM-M4	97.3 ± 0.21	c	95.1 ± 0.07	c	76.2	253.0	
LM-MC	82.7 ± 0.00	a	73.8 ± 0.08	a	14.5	48.4	76.9
LM-MC4	97.4 ± 0.12	c	94.9 ± 0.14	c	90.0	299.1	

¹: στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις HM LM και LM-M από της θερμοκρασία αποθήκευσης και την παρουσία ή μη καφεϊκού οξέος επισημαίνονται με διαφορετικά μικρά γράμματα (p<0.05)

Η υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης (Ea) παρατηρείται στις πηκτές που παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη καφεϊκού οξέος (Ea: 89.8 για την HM και Ea: 69.7 για την LM) σε σύγκριση με εκείνες στις οποίες έχει ενσωματωθεί καφεϊκό οξύ (Ea: 38.0 για την HM και Ea: 37.7 για την LM). Η υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης (Ea) συνδέεται με αυξημένη εξάρτηση του ρυθμού αποικοδόμησης του χρώματος από τη θερμοκρασία. Συνεπώς η προσθήκη καφεϊκού οξέος τόσο στις HM όσο και στις LM πηκτές ενισχύει τη σταθερότητα του κόκκινου χρώματος των ανθοκυανινών του χυμού του ροδιού έναντι των μεταβολών στη θερμοκρασία αποθήκευσης. Παράλληλα οι LM πηκτές με προσθήκη 15% w/w μαννιτόλης με ή χωρίς την προσθήκη καφεϊκού οξέος δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στην Ea (Ea: 76.2 για την LM-M και Ea: 76.9 για την LM-MC).

Η χαμηλή σταθερότητα του χρώματος στις HM πηκτές όπως αποδίδεται από τον χρόνος ημιζωής $t_{1/2}=6.5\text{w}$ μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό σακχαρόζης αλλά και στο σχηματισμό προϊόντων αποικοδόμησης των σακχάρων (Koulani et al. 2016). Παρόλο που σε μελέτες (Hubbermann et al., 2006), έχει βρεθεί θετική επίδραση της σακχαρόζης στη συγκράτηση του χρώματος, δεν διαπιστώθηκε ανάλογη συμπεριφορά στην παρούσα μελέτη.

Οι τιμές $t_{1/2}$ και D επιβεβαιώνουν ότι η LM πηκτή παρουσία 15% w/w μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος σε θερμοκρασία ψύξης παρουσιάζει την υψηλότερη συγκράτηση κόκκινου χρώματος ($t_{1/2} = 90$ και $D = 299.1$ εβδομάδες αντίστοιχα), ενώ η HM πηκτή παρουσία 65% w/w σακχαρόζης και τρυγικού οξέος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος την μικρότερη ($t_{1/2} = 6.5$ και $D = 21.8$ εβδομάδες αντίστοιχα). Μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία επηρεάζει τη σταθερότητα των ανθοκυανινών. Οι ανθοκυανίνες είναι λιγότερο σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (Khoo et al., 2017). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Fossen et al. (1998) οι οποίοι μελέτησαν τη σταθερότητα του χρώματος των ανθοκυανινών κατά την αποθήκευσή τους 10°C και στους 23°C , ενώ επιπλέον διαπίστωσαν ότι όσο υψηλότερο είναι το pH (4-9) τόσο περισσότερο μειώνεται η σταθερότητά τους στις υψηλότερες θερμοκρασίες.

Οι Wang & Xu (2007) διαπίστωσαν ότι η αποικοδόμηση των ανθοκυανινών (ανθοκυάνες βατόμουρου) ακολουθεί κινητική αντίδρασης πρώτης τάξης, ενώ οι σταθερές του ρυθμού αποικοδόμησης με τη θερμοκρασία ακολουθεί τη σχέση Arrhenius. Διαπίστωσαν ότι μεγαλύτερη σταθερότητα των ανθοκυανινών επιτυγχάνεται όταν ο χυμός βατόμουρου ή το συμπύκνωμά του επεξεργάζονται θερμικά σε μικρούς χρόνους και όταν στην συνέχεια αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, ευνοείται η δημιουργία της ασταθούς δομής της χαλκόνης η οποία στη συνέχεια σχηματίζει συστατικά καφέ χρώματος.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Πίνακας 11) έδειξε ότι η τιμή CR% στις HM και LM αυξήθηκε σημαντικά από την προσθήκη καφεϊκού οξέος κυρίως κατά την αποθήκευση στο περιβάλλον. Η παρουσία μαννιτόλης ενισχύει την συγκράτηση του κόκκινου χρώματος σε LM πηκτές, ενώ όταν προστίθεται και καφεϊκό οξύ παρατηρείται μείωση το CR% και στις δύο θερμοκρασίες (CR% Day 40 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος : LM-M : 75.1 και LM-MC : 73.8) (CR% Day 40 σε θερμοκρασία ψυγείου : LM-M4 : 95.1 και LM-MC4 : 94.9)

Εναλλακτικά χρησιμοποιείται η τιμή ΔE για την έκφραση των αποτελεσμάτων του χρώματος. Η τιμή αυτή συνδυάζει τις παραμέτρους L^* , a^* , b^* και περιγράφει τη μεταβολή του χρώματος.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Όπου :

ΔL είναι η μεταβολή της φωτεινότητας του δείγματος σε σχέση με ένα τυφλό και ισούται με: $\Delta L = L_{\text{δείγματος}} - L_{\text{τυφλού}}$

Δa είναι η μεταβολή κόκκινου / πράσινου και ισούται με: $\Delta a = a_{\text{δείγματος}} - a_{\text{τυφλού}}$

Δb είναι η μεταβολή κίτρινου / μπλε και ισούται με: $\Delta b = b_{\text{δείγματος}} - b_{\text{τυφλού}}$

Πίνακας 12: Μεταβολή του χρώματος (ΔE) των HM και LM πηκτών παρουσία ή απουσία μαννιτόλης και καφεϊκού οξέος, μετά από αποθήκευση 40 ημερών πηκτών μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης

Μεταβολή του Χρώματος (ΔΕ) μετά από 40 ημέρες αποθήκευσης			
HM	16.7 ± 0.02	HM4	3.0 ± 0.02
HM-C	10.4 ± 1.18	HM-C4	7.8 ± 0.53
LM	7.8 ± 0.04	LM4	2.5 ± 0.04
LM-C	6.4 ± 0.04	LM-C4	4.1 ± 0.03
LM-M	7.1 ± 0.03	LM-M4	1.6 ± 0.02
LM-CM	8.0 ± 0.02	LM-CM4	2.3 ± 0.02

Όσο μεγαλύτερη η τιμή ΔΕ, τόσο μεγαλύτερη η μεταβολή του χρώματος και επομένως μικρότερη διατήρηση του κόκκινου χρώματος. Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 12), όλες οι πηκτές που είναι αποθηκευμένες σε θερμοκρασία ψύξης παρουσιάζουν μικρότερες τιμές ΔΕ (HM4: 3.0, HM-C4: 7.8, LM4: 2.5, LM-C: 4.1, LM-M4: 1.6 και LM-CM4: 2.3) σε σύγκριση με τις πηκτές που είναι αποθηκευμένες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (HM: 16.7, HM-C: 10.4, LM: 7.8, LM-C: 6.4, LM-M: 7.1 και LM-CM: 8.0). Στον Πίνακα 11 παρατηρούμε ότι πηκτές σε θερμοκρασία ψύξης παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές Color Retention σε σύγκριση με τις πηκτές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος καθώς και η θετική επίδραση του καφεϊκού οξέος.

Η προσθήκη καφεϊκού οξέος όπως διαπιστώθηκε και προηγούμενα μείωσε την τιμή ΔΕ κατά την αποθήκευση των HM και LM πηκτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ αυτή η θετική επίδραση δεν διαπιστώθηκε σε θερμοκρασία ψυγείου. Η παρουσία μαννιτόλης βελτίωσε την μεταβολή του χρώματος και στις δύο θερμοκρασίες (ΔΕ: LM=7.8, LM-M=7.1 στο περιβάλλον και LM=2.5, LM-M=1.6 στο ψυγείο) ενώ η προσθήκη καφεϊκού οξέος και στις δύο θερμοκρασίες επέφερε αύξηση στη μεταβολή του χρώματος (ΔΕ: LM-CM=8.0 στο περιβάλλον, LM-CM=2.3 στο ψυγείο). Η μικρότερη τιμή ΔΕ σημειώθηκε στις LM πηκτές παρουσία μαννιτόλης οι οποίες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου. Συνεπώς καλύτερη συγκράτηση του κόκκινου χρώματος παρατηρήθηκε στις LM πηκτές παρουσία καφεϊκού σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στις LM πηκτές παρουσία μαννιτόλης σε θερμοκρασία ψυγείου.

Η επίδραση της πηκτίνης στο χρώμα των ανθοκυανινών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Σε μερικές περιπτώσεις, η πηκτίνη δρα ως συγχρωστική ενισχύοντας το χρώμα τους. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι το είδος και η συγκέντρωση της πηκτίνης επιδρά καθοριστικά στη διατήρηση του χρώματος των ανθοκυανινών (Melgarejo et al., 2011). Στην παρούσα εργασία η συγκράτηση του χρώματος

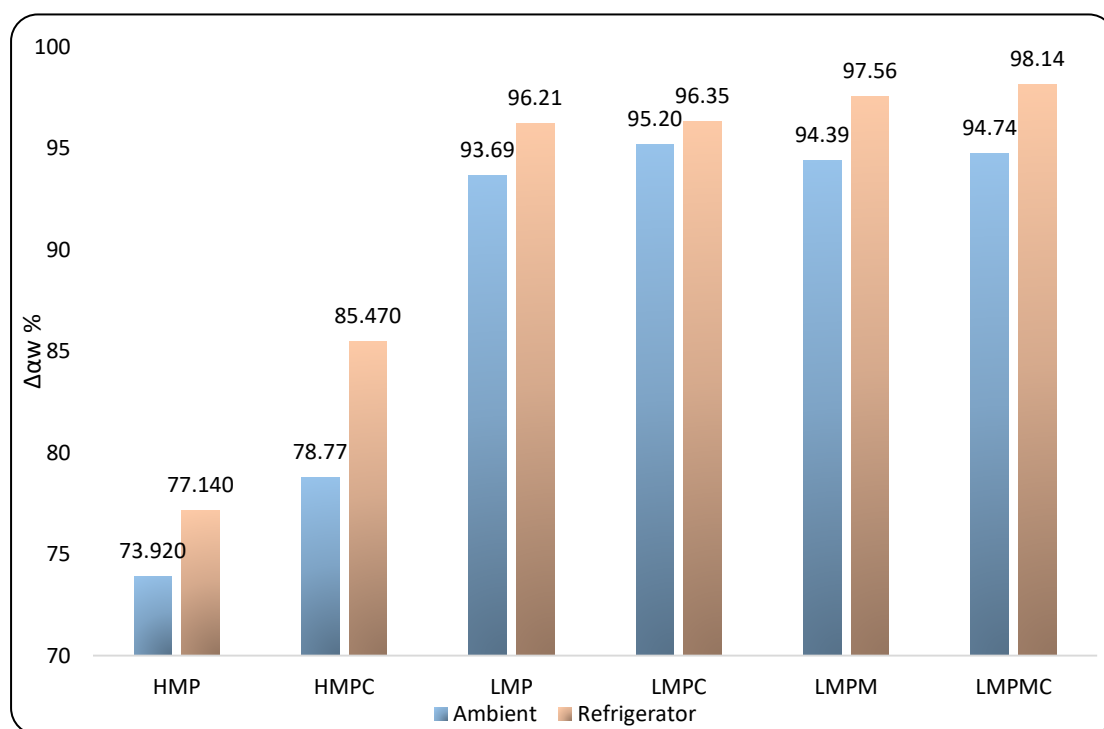
ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία LM πηκτικής καθώς και από την παρουσία συγχρωστικών παραγόντων όπως αυτών του καφεϊκού οξέος και της μαννιτόλης.

6.6. Ενεργότητα ύδατος

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας ύδατος των πηκτών εκφράστηκαν ως συγκράτηση της ενεργότητας ύδατος (Δaw %) η οποία υπολογίστηκε ως:

$$\text{Συγκράτηση } aw \text{ (\%)} = \frac{aw_t}{aw_o} \times 100$$

Όπου aw_t η ενεργότητα ύδατος στη συγκεκριμένη χρονική περίοδος, και aw_o η ενεργότητα ύδατος την πρώτη ημέρα.



Διάγραμμα 8: Παρουσίαση της συγκράτησης της Ενεργότητας Ύδατος στις Πηκτές σε σχέση με την θερμοκρασία αποθήκευσης

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα είναι φανερό πως τα δείγματα πηκτών που βρίσκονται σε θερμοκρασία ψύξης εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας ύδατος μετά από χρονικό διάστημα αποθήκευσης 40 ημερών σε σχέση με τα αντίστοιχα που βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα παρατηρούμε ότι οι πηκτές HM με προσθήκη 65% σακχαρόζης παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό συγκράτησης aw %. Προκειμένου να συσχετιστεί η συγκράτηση aw % με την μεταβολή στο χρώμα των πηκτών (ΔΕ) εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή ανάλυση (multivariable analysis) με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος

Statgraphics Centurion XVI.I. Τα δείγματα εξετάσθηκαν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο διάστημα αυτό η κρίσιμη τιμή P-value, κάτω από την οποία τα δείγματα που εξετάζονται διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους είναι 0.05. Ο μέσος όρος του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης των τιμών ΔΕ και ΔAw ισούται με $r=-0.85$, και εξηγεί την ισχυρά αρνητική συσχέτιση των τιμών. Συνεπώς όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της ενεργότητας ύδατος τόσο μικρότερη η μεταβολή στο χρώμα των πηκτών στις οποίες ενσωματώθηκε χυμός ροδιού. Πίνακας 13: Η μεταβολή του χρώματος (ΔΕ) και η μεταβολή της ενεργότητας ύδατος (ΔAw) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψύξης

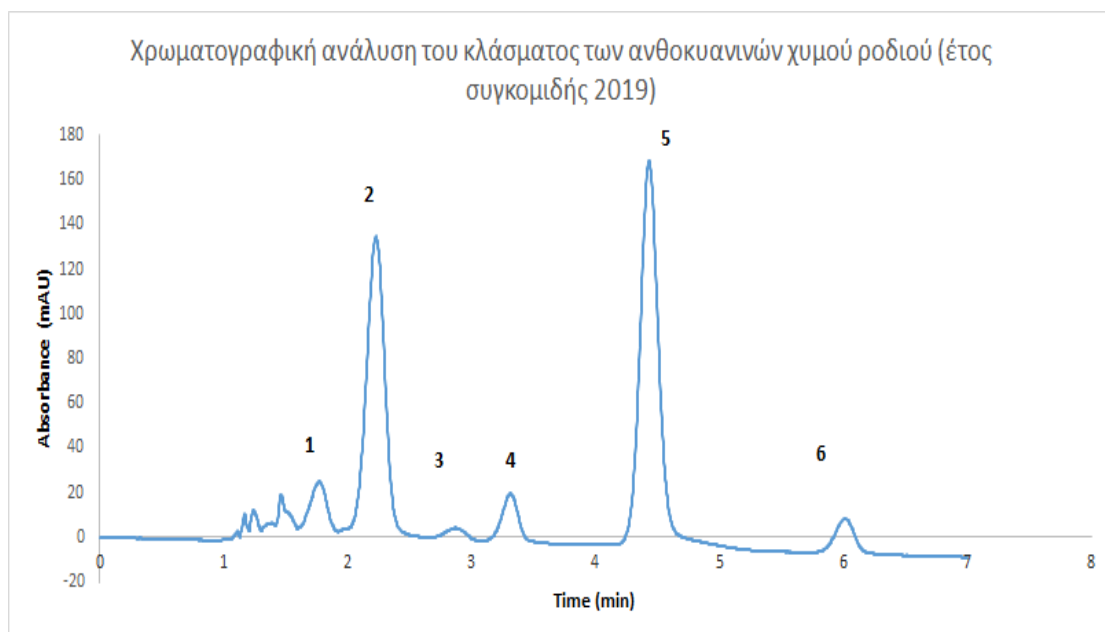
	HMPO		HMP4		HMPC0		HMPC4	
	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw
0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
10	5.5	98.6	1.4	98.8	3.1	97.4	2.9	98.5
20	11.1	93.6	2.1	94.6	7.1	93.7	3.1	94.4
30	14.0	82.0	2.5	83.5	8.8	83.8	7.8	89.4
40	16.7	73.9	3.0	77.1	10.4	78.8	7.8	85.5

	LMPO		LMP4		LMPC0		LMPC4	
	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw
0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
10	2.8	99.2	1.8	99.4	4.5	98.9	3.3	99.2
20	5.0	98.3	2.3	98.0	4.7	97.9	3.6	98.2
30	6.4	96.9	2.4	97.6	5.3	96.4	4.0	97.6
40	7.8	93.7	2.5	96.2	6.4	95.2	4.1	96.4

	LMPMO		LMPM4		LMPMC0		LMPMC4	
	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw	ΔΕ	ΔAw
0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
10	1.9	99.8	1.1	99.7	2.9	99.5	1.9	99.9
20	3.4	99.4	1.4	99.3	5.2	99.3	1.8	99.6
30	4.7	98.9	1.5	98.3	6.8	97.1	2.0	99.0
40	7.1	94.4	1.6	97.6	8.0	94.7	2.3	98.1

6.7. Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών του χυμού ροδιού με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC)

Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται η σύσταση του κλάσματος των ανθοκυανινών χυμού ροδιού (έτος συγκομιδής 2019) από την ποικιλία Ερμιόνη. Η χρωματογραφική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση έξι μονομερών δομών οι οποίες καταγράφονται με τη σειρά που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα (Εικ 15) στον Πίνακα 14



Εικόνα 15: : Χρωματογραφική ανάλυση του κλάσματος των ανθοκυανινών χυμού ροδιού (520nm)

Πίνακας 14: Ολικό Περιεχόμενο Ανθοκυανινών του χυμού ροδιού (mg/L)

	Συστατικό	Περιεχόμενο Ανθοκυανινών (mg/L)	Ποσοστό (%)
1	Delphinidin-3,5-diglucoside	42.6	12.8
2	Cyanidin-3,5-diglucoside	82.6	24.7
3	Pelargonidin-3,5-diglucoside	35.5	10.6
4	Delphinidin-3-glucoside	39.7	11.9
5	Cyanidin-3-glucoside	94.7	28.3
6	Pelargonidin-3-glucoside	38.9	11.6
Σύνολο		333.9	

Από το χρωματογράφημα και από τον Πίνακα 14 διαπιστώνουμε ότι ο χυμός ροδιού ποικιλίας Ερμιόνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών άγλυκων δομών, αυτών της κυανιδίνης (Cy-), της δελφινιδίνης (Dp) και της πελαργονιδίνης (Pg). Ο 3-μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης (Cy-3-glc) περιέχεται σε υψηλότερο ποσοστό της τάξης του 28,3%, ακολουθούμενος από τον 3,5- διγλυκοζίτη της κυανιδίνης (Cy-3,5-digl) με ποσοστό 24,7%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο 3-μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης είναι η πιο διαδεδομένη ανθοκυάνη στα φρούτα (Kong et al. 2003). Η συγκέντρωση των μονογλυκοζιτών των ανθοκυανινών (173.2 mg / L) αντιπροσωπεύει

το 51,9% της συνολικής περιεκτικότητας σε ανθοκυάνες του χυμού, υπερβαίνοντας την περιεκτικότητα των διγλυκοζιτών (160.7 mg / L). Όπως αναφέρθηκε από τους Todaro et al. (2016), το προφίλ των ανθοκυανινών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία του ροδιού, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις, η Cy είναι το κυρίαρχο άγλυκο είτε ως μονογλυκοζίτης είτε ως διγλυκοζίτης.

6.8. Ποσοτικός Προσδιορισμός Ανθοκυανινών που συγκρατήθηκαν στις Πηκτές

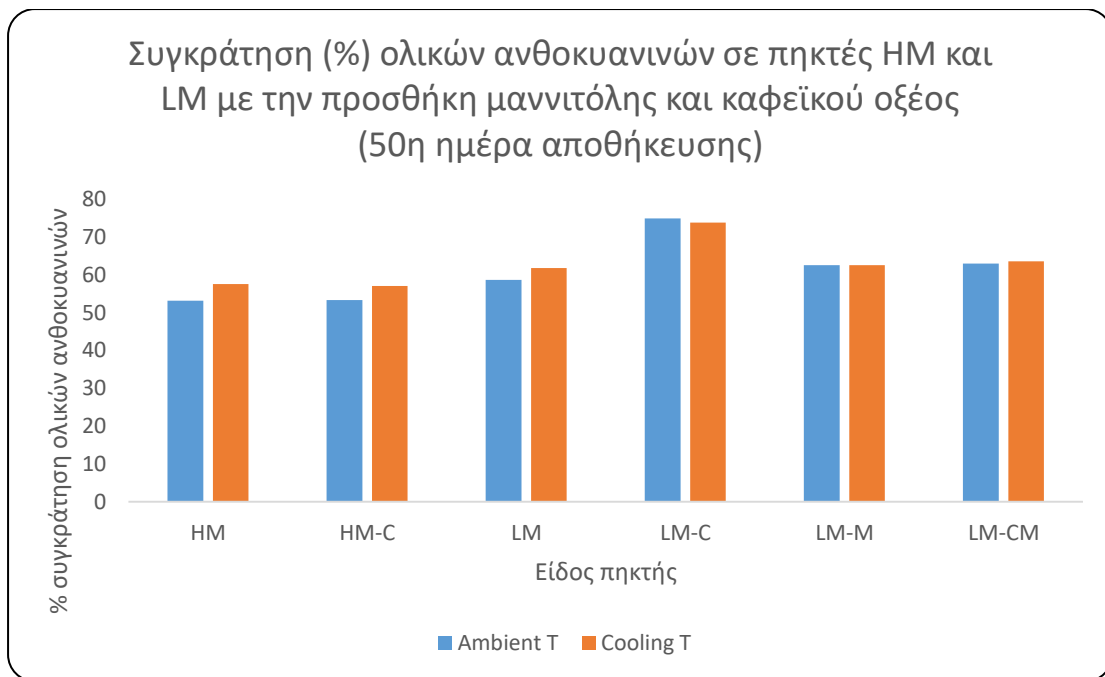
6.8.1. Συγκράτηση ανθοκυανινών από τις πηκτές

Στα Διαγράμματα 9, 10 και 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύστασης των εκχυλισμάτων ανθοκυανινών (ACN) που παραλήφθηκαν από πηκτές HM που παρασκευάστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού οξέος και πηκτές LM, στις οποίες προστέθηκε καφεϊκό οξύ και μαννιτόλη κατά περίπτωση, κατά την 50^η ημέρα αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (ambient T) και ψύξης (cooling T) εκφρασμένα ως ποσοστό συγκράτησης.

Το ποσοστό συγκράτησης των ανθοκυανινών (ACN) από τις πηκτές υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Συγκράτηση (\%)} = \frac{C_{ACN-P}}{C_{ACN-J}} * 100$$

Όπου C_{ACN-P} είναι η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανινών που παραλήφθηκαν από τις πηκτές κατά την 50^η ημέρα αποθήκευσης και C_{ACN-J} είναι η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανινών του χυμού.



Διάγραμμα 9: Συγκράτηση (%) των ολικών ανθοκυανινών σε πηκτές υψηλής μεθυλίωσης (HM) με προσθήκη καφεϊκού οξέος (HM-C), πηκτές χαμηλής μεθυλίωσης (LM), πηκτές χαμηλής μεθυλίωσης με προσθήκη καφεϊκού οξέος (LM-C), πηκτές χαμηλής μεθυλίωσης με προσθήκη μαννιτόλης (LM-M) και πηκτές χαμηλής μεθυλίωσης με προσθήκη καφεϊκού οξέος και μαννιτόλης (LM-CM), κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ψύξης (50η ημέρα αποθήκευσης)

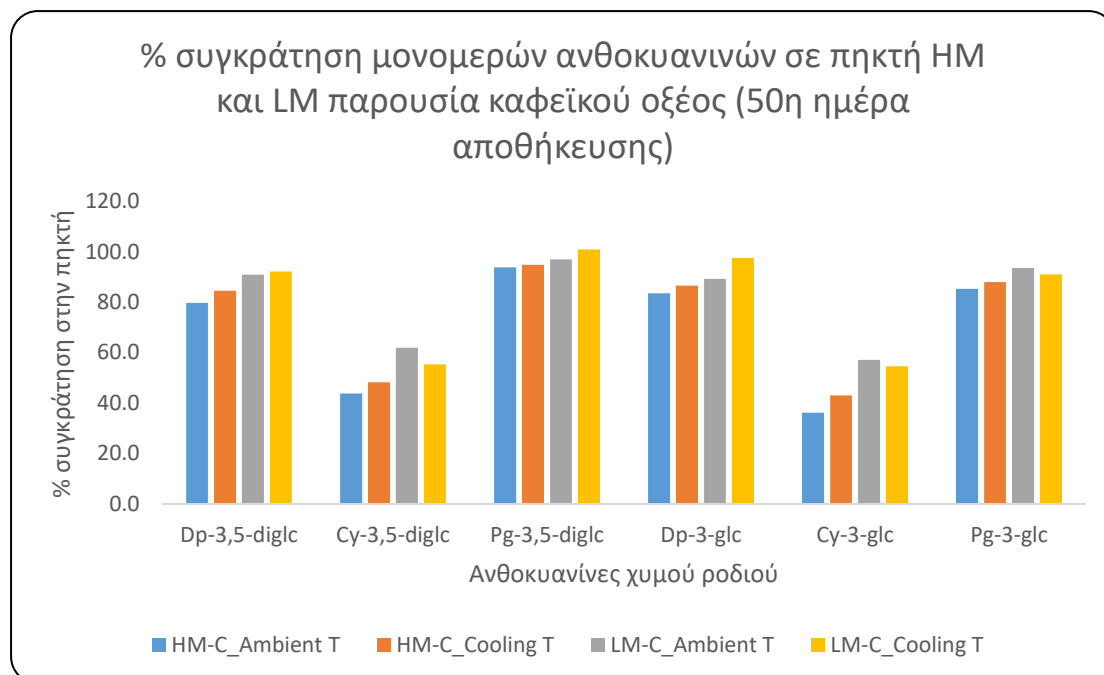
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9 η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες είχε μικρή θετική επίδραση στη συγκέντρωση των ACN κυρίως στις πηκτές HM-C και LM. Σε κάθε άλλη περίπτωση η συγκράτηση των ACN ήταν παρόμοια και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Ποσοστό συγκράτησης μεγαλύτερο από 70% υπολογίστηκε στις LM-C-Ambient T (74,9%) και LM-C- cooling T (73,8%) ενώ σε κάθε άλλη περίπτωση το ποσοστό αυτό ήταν μικρότερο του 64%. Το χαμηλότερο ποσοστό συγκράτησης παρουσίασε η HM-Ambient T και ήταν της τάξης του 53,2%.

Η συγκράτηση των ACN σε πηκτίνες HM (53,2% και 57,6% στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα), ήταν μικρότερη από αυτή στις LM (58,7% και 61,8% στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα) και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Η παρουσία καφεϊκού οξέος στις HM-C δεν είχε καμία επίδραση στη συγκράτηση των ACN (53,3% και 57,1% στο περιβάλλον και στην ψύξη). Η προσθήκη καφεϊκού οξέος ενίσχυσε το χρώμα των πηκτινών LM στο περιβάλλον από 67,3% σε 74,9% (LM και LM-C αντίστοιχα) και στην ψύξη από 70,9% σε 73,8% (LM και LM-C αντίστοιχα).

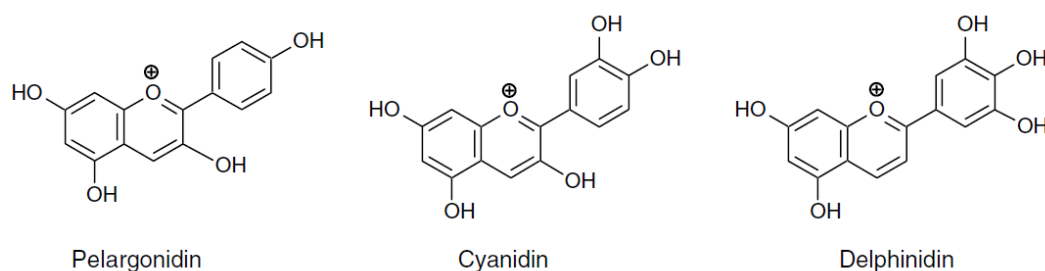
Η βελτιωμένη σταθεροποίηση των ACN με τη μείωση του DE δείχνει τον σημαντικό ρόλο του μη εστεροποιημένου γαλακτουρονικού οξέος (GalA). Τη θετικότερη επίδραση του καφεϊκού οξέος σε σύγκριση με το δεσφικό, βενζοϊκό και κουμαρικό οξύ, στην συγχρωμάτωση χυμού βατόμουρου (blueberry) σε χαμηλά pH (1 και 2) παρατήρησαν και οι Jamei & Babaloo, (2017). Η προσθήκη μαννιτόλης

επέδρασε θετικά στην συγκράτηση των ACN στις πηκτίνες LM κυρίως κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αυξάνοντας το ποσοστό συγκράτησης από 58,7% σε 62,6% (LM και LM-M αντίστοιχα). Μικρές διαφορές μεταξύ των προηγούμενων πηκτών παρατηρήθηκαν κατά την αποθήκευσή τους σε χαμηλή θερμοκρασία (από 61,8% σε 62,6% στην ψύξη για LM και LM-M αντίστοιχα). Ενώ στην περίπτωση των LM-CM η προσθήκη καφεϊκού οξέος επέφερε μικρή μόνο αύξηση της τάξης του 1% περίπου στην συγκράτηση των ACN.

6.8.2. Η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στις ανθοκυάνες



Διάγραμμα 10: Ποσοστό συγκράτησης ανθοκυανινών σε πηκτές ΗΜ και LM παρουσία καφεϊκού οξέος



Εικόνα 16: Χημική Δομή της Πελαργονιδίνης, της Κυανιδίνης και της Δελφινιδίνης

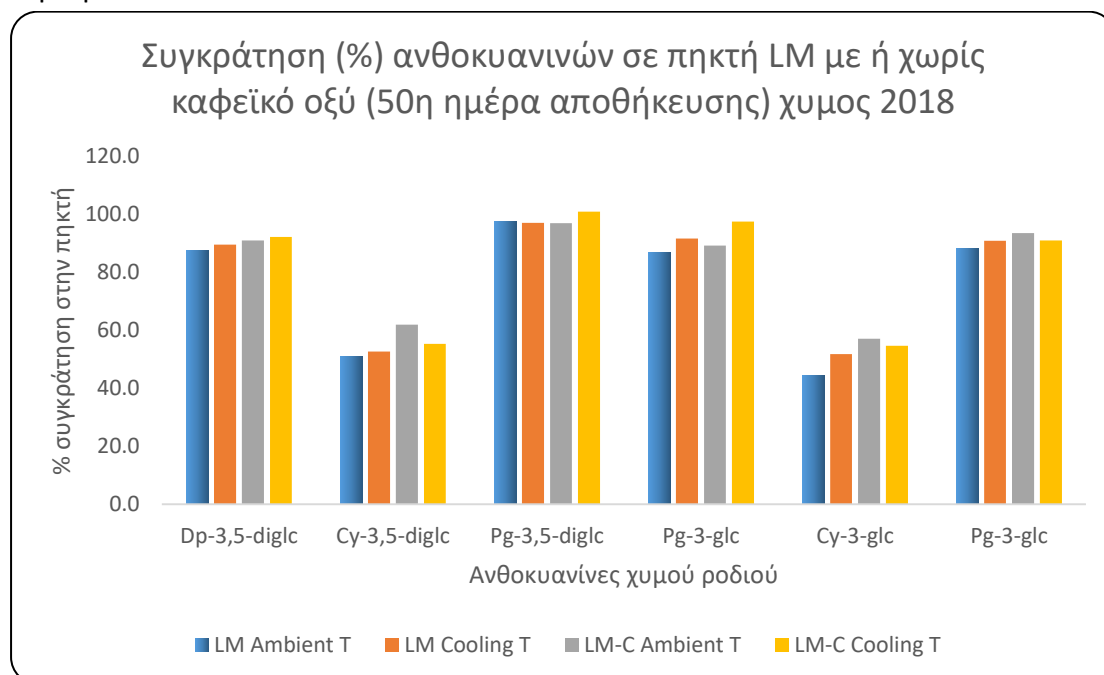
Από το Διάγραμμα 10 φαίνεται ότι η συγκράτηση της Pg- στις ΗΜ και στις LM τόσο του μονογλυκοζίτη (85.3% και 87.9% στις ΗΜ-C και 93.4% και 90.9% για τις LM-C στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα) όσο και του διγλυκοζίτη (93.8% και 94.8% στις

HM-C και 96.9% και 99.9% για τις LM-C στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα) είναι καλύτερη από αυτήν των λοιπών μονομερών ανθοκυανινών.

Αντίθετα την μικρότερη συγκράτηση φαίνεται να έχει η Cy- τόσο ο μονογλυκοζίτης (36.1% και 43.0% στις HM-C, 57.1% και 54.6% στις LM-C στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα) όσο και του διγλυκοζίτη (43.8% και 48.2% στις HM-C και 61.9% και 55.3% για τις LM-C στο περιβάλλον και στην ψύξη αντίστοιχα).

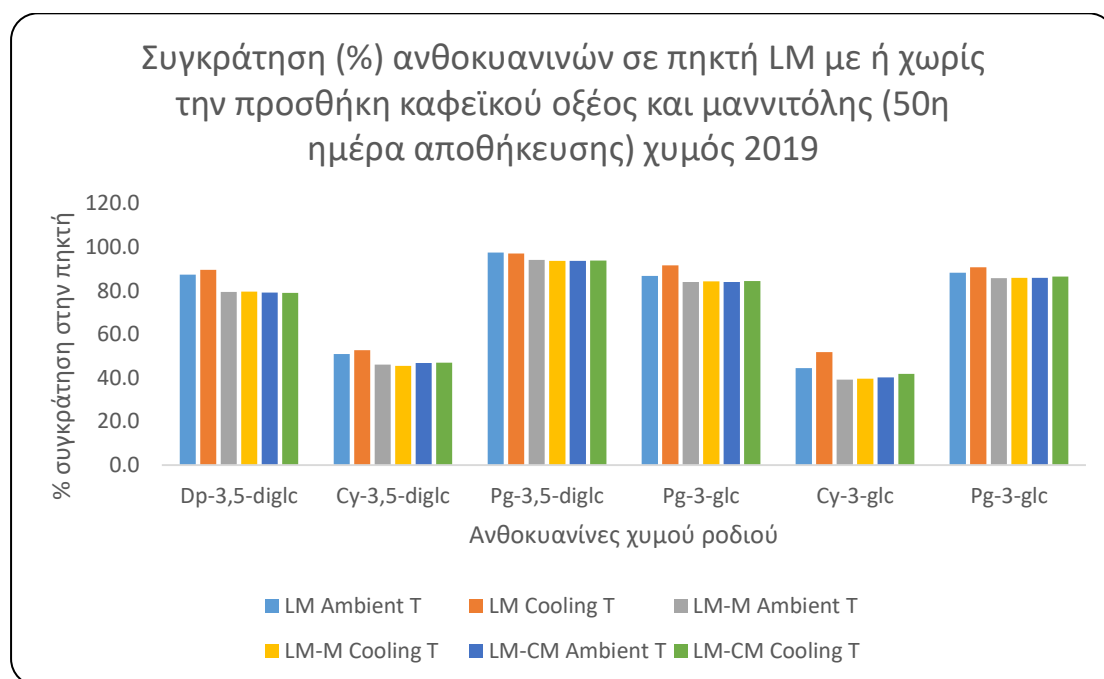
Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανής η θετική επίδραση της LM πηκτίνης στη συγκράτηση των μονομερών ανθοκυανινών σε σχέση με την HM. Οι Buchweitz et al. (2013 a;2013b) συμπέραναν ότι ο αριθμός των υδροξυλομάδων στο δακτύλιο B των ανθοκυανινών καθώς και τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών πηκτινών καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις ανθοκυανίνης-πηκτίνης και κατά συνέπεια τη σταθεροποίηση του χρώματος. Σχηματισμός ενός μόνο δεσμού υδρογόνου μεταξύ των μορίων της πηκτίνης και των γλυκοζιτών της Pg- επισημαίνουν ότι, γενικά οδηγεί σε αδύναμες αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα οι γλυκοζίτες της Cy- και της Dp- μπορούν να σχηματίσουν δύο και τρεις δεσμούς υδρογόνου, αντίστοιχα, ενισχύοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις ανθοκυανίνης-πηκτίνης. Επομένως, η σταθεροποίηση της ανθοκυανίνης θα είναι πιο έντονη.

Τα συμπεράσματα των προηγούμενων ερευνητών προέκυψαν από πειράματα σε χυμό φραγκοστάφυλου ο οποίος χαρακτηρίζεται από μικρές συγκεντρώσεις σε γλυκοζίτες της Cy- της τάξης του 2,9%, ενώ περιέχει κυρίως Cy-3-rut 31.6%mol. Σε αντίθεση στο χυμό ροδιού επικρατεί ο μονογλυκοζίτης και ο διγλυκοζίτης της Cy- με αποτέλεσμα να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση στο ποσοστό της συγκράτησης ενώ ποσοτικά και οι δύο μορφές ανευρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στην κάθε πηκτή.



Διάγραμμα 11: Ποσοστό συγκράτησης ανθοκυανινών σε πηκτές LM με ή χωρίς την παρουσία καφεϊκού οξέος

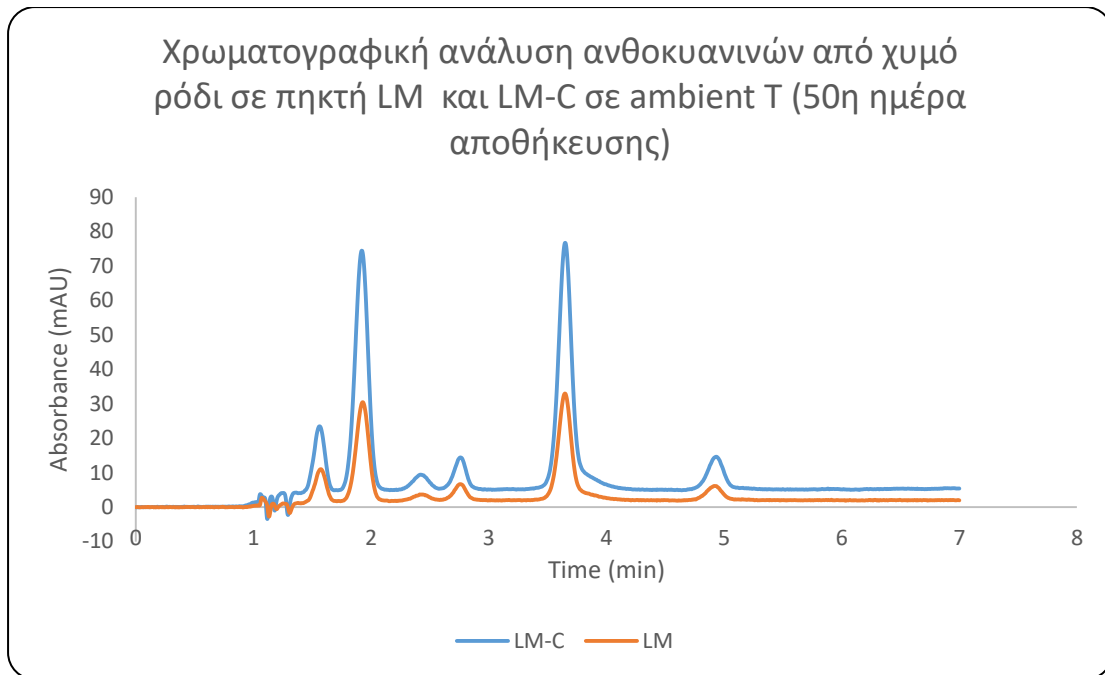
Από το Διάγραμμα 11 φαίνεται ότι η προσθήκη καφεϊκού οξέος και χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης ευνοεί την συγκράτηση κυρίως του μονογλυκοζίτη και διγλυκοζίτη της Cy-.



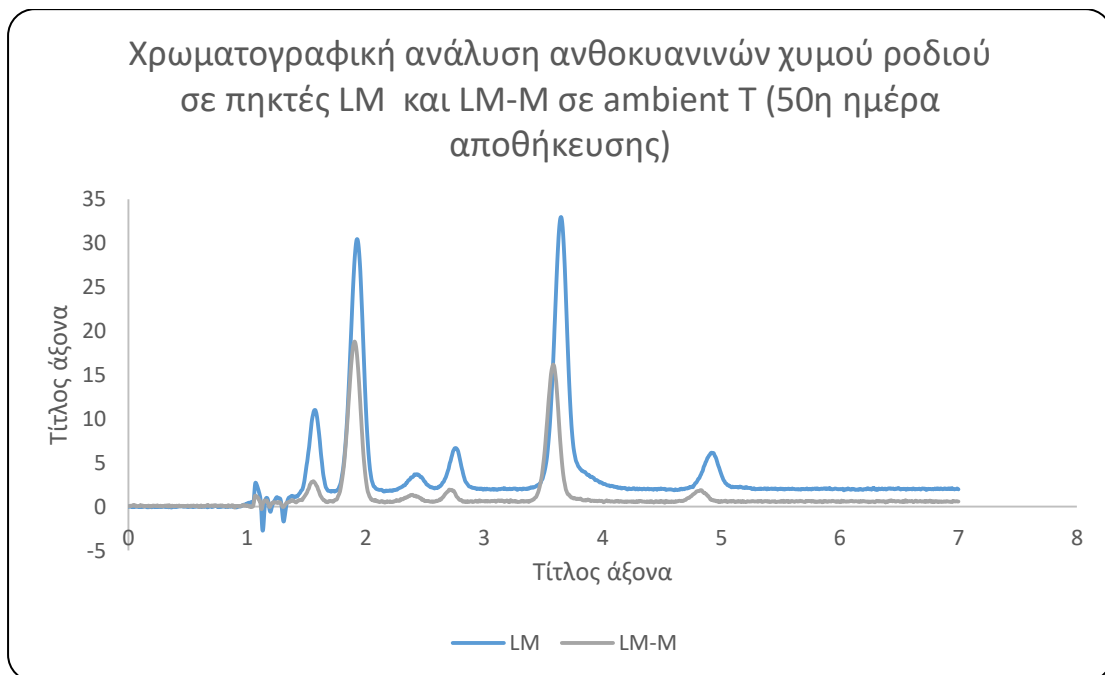
Διάγραμμα 12: Ποσοστό συγκράτησης μονομερών ανθοκυανινών σε πηκτές LM με ή χωρίς την παρουσία καφεϊκού οξέος

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 12 η προσθήκη μαννιτόλης στις LM πηκτές δεν ενίσχυσε τη συγκράτηση των ανθοκυανινών. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των ανθοκυανινών δεν επιβεβαιώνουν αυτά της φασματοφωτομετρικής μεθόδου προσδιορισμού των ολικών μονομερών (TAC%). Παρόμοιες αποκλίσεις στα αποτελέσματα των δύο μεθόδων έχουν αναφερθεί και στη βιβλιογραφία (Turfan et al., 2011) και αποδίδονται στους διαφορετικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται από τις δύο μεθόδους και οι οποίοι επηρεάζουν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών.

Στα διαγράμματα 13 και 14 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα των ανθοκυανινών που παραλήφθηκαν από εκχυλίσματα από πηκτές LM, LM-C και LM-M.



Διάγραμμα 13: Χρωματογραφική ανάλυση ανθοκυανινών από χυμό ρόδι σε πηκτή LM και LM-C σε ambient T (50η ημέρα αποθήκευσης)



Διάγραμμα 14: Χρωματογραφική ανάλυση ανθοκυανινών χυμού ροδιού σε πηκτές LM και LM-M σε ambient T (50η ημέρα αποθήκευσης)

Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σταθερότητας του χρώματος χυμού ροδιού κατά την ενσωμάτωσή του σε πηκτές πηκτικής υψηλής και χαμηλής μεθυλίωσης παρουσία ή μη καφεϊκού οξέος ως συγχρωστικός παράγοντας. Στις πηκτίνες χαμηλής μεθυλίωσης ενσωματώθηκε και μαννιτόλη (15%) προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση στη σταθερότητα του χρώματος των πηκτών μιας γλυκαντικής ουσίας χαμηλής θερμιδικής αξίας.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε η θετική επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης (4°C) στη σταθερότητα των ανθοκυανινών του χυμού από τα επισπέρμια του ροδιού, καθώς και στην σταθερότητα του κόκκινου χρώματος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των περισσότερων εκχυλισμάτων αυξάνεται με το χρόνο και τη χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης. Παρόλα αυτά χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης δεν φαίνεται να επηρεάζει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων στο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όλων των πηκτών αυξάνεται με το χρόνο αποθήκευσης γεγονός που συνδέθηκε με την αύξηση των προϊόντων αποικοδόμησης των μονομερών ανθοκυανινών και την αύξηση των προϊόντων πολυμερισμού τους.

Η προσθήκη καφεϊκού οξέος ενίσχυσε τη σταθερότητα του κόκκινου χρώματος και στα δύο είδη πηκτινών που εξετάστηκαν ενώ δεν επιδρά το ίδιο ενισχυτικά όταν συνυπάρχει με μαννιτόλη στις LM πηκτίνες. Επιπλέον η παρουσία του καφεϊκού οξέος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του χρώματος πολυμερισμού. Από τη μέτρηση της μεταβολής του χρώματος (ΔE) φάνηκε ότι το καφεϊκό οξύ δρα ως συγχρωστικός παράγοντας κυρίως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ACN φάνηκε ότι η παρουσία του ευνοεί την συγκράτηση κυρίως του μονογλυκοζίτη και διγλυκοζίτη της Cy- που είναι και η κύρια ανθοκυανιδίνη στο χυμό ροδιού. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του κόκκινου χρώματος επηρεάζεται από τις μεταβολές της θερμοκρασίας και για τα δύο είδη πηκτινών ενώ βελτιώνεται και για τα δύο είδη από την παρουσία καφεϊκού οξέος.

Η προσθήκη μαννιτόλης δεν ενίσχυσε την συγκράτηση των μονομερών ανθοκυανινών (rel. TAC%) στις LM πηκτίνες ενώ μείωσε το χρώμα πολυμερισμού κατά την διάρκεια αποθήκευσης 60 ημερών και στις δυο θερμοκρασίες που εξετάστηκαν. Συμπεραίνουμε ότι η μαννιτόλη παρεμποδίζει έως ένα βαθμό τις αντιδράσεις αποικοδόμησης και πολυμερισμού των ανθοκυανινών γεγονός το οποίο εξηγεί και τις χαμηλότερες τιμές της TPC. Η παρουσία μαννιτόλης ενισχύσε την συγκράτηση του κόκκινου χρώματος στις LM πηκτές κυρίως σε θερμοκρασία ψυγείου.

Από τον ποσοτικό προσδιορισμό προέκυψε ότι οι πηκτίνες HM παρουσιάζουν μικρότερη συγκράτηση των ACN σε σχέση με τις LM και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Επιπλέον διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση της μεταβολής του χρώματος (ΔE) με την μεταβολή της ενεργότητας ύδατος (Δa_w) $r=-0.85$, που σημαίνει

ότι όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της ενεργότητας ύδατος τόσο μικρότερη η μεταβολή στο χρώμα των πηκτών ροδιού. Μεγαλύτερη Δaw παρουσίασαν οι πηκτές με προσθήκη μαννιτόλης γεγονός που πιθανώς εξηγεί και την μεγαλύτερη συγκράτηση το κόκκινου χρώματος από αυτές.

Στην βιβλιογραφία είναι περιορισμένες οι μελέτες που αφορούν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών και του χρώματος χυμού ροδιού. Έχει μελετηθεί κυρίως η σταθερότητα των ανθοκυανινών σε χυμό ή εκχύλισμα φραγκοστάφυλου, σαμπούκο και φράουλας.

Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

- Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. Chromatog. A*, 896, 87–93.
- Andress, E. (1999). *Preserving Food: Processing Jams and Jellies*. Athens, GA: University of Georgia, Cooperative Extension Service.
- AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method First Action 2005. (2006). In *J. AOAC Int.*
- Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., Hayek T., Presser D. and Fuhrman B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062–1076.
- Bagal-Kestwal, D. R., Pan, M. H., & Chiang, B.-H. (2019). Properties and Applications of Gelatin, Pectin, and Carrageenan Gels. *Bio Monomers for Green Polymeric Composite Materials*, 117–140.
- BeMiller, J. N. (2019). Pectins. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 303–312
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2015), *Food Chemistry* 4th Edition, Springer Pub.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity (Vol. 28).
- Brejnholt, S. M. (2009). Pectin. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*, 237–265 Wiley – Blakwell
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971–1979.
- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2013a). Impact of pectin type on the storage stability of black currant (*Ribes nigrum* L.) anthocyanins in pectic model solutions. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1168–1178.

- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2013). Stabilisation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) anthocyanins by different pectins. *Food Chemistry*, 141, 2998-3006.
- Çam, M., Hişil, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3), 721–726.
- Einhorn-Stoll, U. (2018). Pectin-water interactions in foods – From powder to gel. *Food Hydrocolloids*, 78, 109–119.
- Espinoza C. L., Carvajal-Millán E., Balandrán-Quintana R., López-Franco Y., and Agustín Rascón-Chu A. (2018) Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture, *Molecules*. Apr; 23(4): 942
- Fadavi A, Barzegar M, Azizi HM. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:676–80.
- Faria Ana, Calhau Conceicao, 2011: The Bioactivity of Pomegranate: Impact on Health and Disease DOI: 10.1080/10408391003748100
- Flutto, L. (2003). PECTIN | Properties and Determination. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4440–4449.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region *Food Chemistry*, 63 (4), 435-440.
- Gawkowska D., Cybulska J. and Zdunek A., Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review
- Gil M, Tomás-Barberán FA Hess-Pierce B , Holcroft DM and Kader AA.(2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10):4581-9
- Greiling H. & Ruediger R. (1991) HPLC in clinical chemistry: Selected topics and clinical applications *Microchimica Acta*, 104, p. 135-43.
- Harborne J. B. (1993). The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman and Hall, London.
- Holland D., Hatib K., and I. B.-Y. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture and Breeding. *Horticultural Reviews*, 35.
- Hubbermann, E. M., Heins, A., Stöckmann, H., & Schwarz, K. (2006). Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology*, 223(1), 83–90.

- Ishii S., Kiho K., Sugiyama S. & Sugimoto H. (1979) Low Methoxy Pectin prepared by Pectinesterase from *Aspergillus Japonicus*. *Journal of Food Science* Vol. 44 No.2 p. 611 - 614
- Jahfar M, Vijayan KK, Azadi P. (2003) Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Research Journal of Chemistry and Environment* 7:43–50.
- Jamei, R. & Babaloo, F. Stability of blueberry (*Cornus mas* – Yulyush) anthocyanin pigment under pH and co-pigment treatments. *Int. J. Food Prop.* 2017, 20 (9), 2128-2133
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. In *Food and Nutrition Research* (Vol. 61). Swedish Nutrition Foundation.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. In *Phytochemistry*. 64, 5, 923–933. Elsevier Ltd.
- Koulani, M. K, Jamei, R., Marjani, A. P. (2016). Influence of sucrose and high temperature on grape anthocyanin stability and furfural formation. *Journal of Food Safety & Hygiene*; 2, 3-4, 54-62
- Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. and Cheng S. (2006). Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260
- Lohachoompol V., Mulholland M., Szrednicki G. & Craske J. (2008). Determination of Anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry* Vol. 111, Issue 1, pp 249 - 254
- Longtin R. 2003. The pomegranate: nature's power fruit? *J Natl Cancer Inst* 95:346–348.
- Maier T., Fromm M., Schieber A., Kammerer D. R., & Carle R. (2009). Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 229(6), 949–960.
- May, C. D., & Pectin, H. P. B. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 12).
- Markovic' Dimitric'J. M., Petranovic' A. N., Baranac M. J. The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: a spectroscopic investigation on colour enhancement. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005, 78, 223–228

- Mars M. (2000). Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review. In Melgarejo P., Martínez-Nicolás J. J. and Martínez-Tomé J. (ed.). Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology. CIHEAM.
- McMurry J., Ballantine D.S., Hoeger C.A., Peterson V.E., Castellion M., (2010) Fundamentals of general, organic, and biological chemistry, Pearson Education
- Medjakovic S. and Jungbauer A. (2013). Pomegranate: A fruit that ameliorates metabolic syndrome, Food and Function, 4, 19-39.
- Melgarejo, P., Martínez, R., Hernández, F., Martínez, J. J., & Legua, P. (2011). Anthocyanin content and colour development of pomegranate jam. Food and Bioproducts Processing, 89(4), 477–481.
- Mirdehghan S.H. and Rahemi M., (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Sci. Hort., 111(2), 120–7.
- Ozgul-Yucel S. (2005). Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. J. Am. Oil. Chem. Soc., 82(12), 893–7.
- Porter LW. (1989) Tannins. In: Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics. London: Academic Press, 389-419 .
- Poyrazoglu E, Gökmen V, Artık N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis 15: 567–575.
- Rajni A. Padival S. Ranganna & Manjirekar S. P. (1979) Mechanism of gel formation by low methoxyl pectins Journal of Food Technology 14, 277-287
- Rodriguez-Saona, L.E., Wrolstad R.E. (2004) Anthocyanins. In Handbook of Food Analytical Chemistry, Volume 2: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2004; pp. 6–69 ISBN 978-0-471-70908-4.
- Santiago M.C.P., Gouvêa A.C.M.S., Godoy R.L., Borguini R.G., Pacheco S., Nogueira R.I., Nascimento L.D., Freitas S.P. (2014) Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. Braz. J. Food Technology, 17, 51–57
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nut., 45, 287–306.
- Seeram N. P., Lee R., Hardy M. and Heber D. (2005). Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Sep. Purif. Technol. 41, 49–55.

- Sinela A., Rawat N., Mertz C., Achir N., Fulcrand H., Dornier M. (2017) Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. Food Chemistry Jan 1;214:234-241
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.
- Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R., (2017) Principles of instrumental analysis, Cengage learning
- Stover E., & Mercure E. W. (2007). The pomegranate: A new look at the fruit of par-adise. HortScience, 42(5), 1088–1092.
- Tezcan F., Gültekin-Özguven M., Diken T., Özcelik B. and Erim, F.B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid, and sugar content in commercial pomegranate juices. Food Chem., 115, 873-877.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin — A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37(1), 47–73.
- Timberlake C.F (1980). Anthocyanins – Occurrence Extraction and Chemistry. Food Chemistry. Volume 5, Issue 1, pp 69 - 80
- Todaro, A.; Cavallaro, R.; Malfa, S.L.; Continella, A.; Gentile, A.; Fischer, U.; Carle, R.; Spagna, G. Anthocyanin profile and antioxidant activity of freshly squeezed pomegranate (*Punica granatum* L.) juices of Sicilian and Spanish provenances. Ital. J. Food Sci. 2016, 28, 464–479
- Turfan, Ö., Türkyilmaz, M., Yemi, O., & Özkan, M. (2011). Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punica granatum* L.; Cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. Food Chemistry, 129(4), 1644–1651.
- Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM. 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. J Ethnopharmacol 89:295–300.
- Wang, W. D., & Xu, S. Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. Journal of Food Engineering, 82(3), 271–275.
- Wrolstad R. E., Acree T. E., Decker E. A., Penner M. H., Reid D. S., Schwartz S. J., Shoemaker C. F., Smith D., P. S. (2005). Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. Anthocyanins. In Handbook of Food Analytical Chemistry (Vols. 2–2, pp. 7–17). John Wiley and Sons Ltd
- Zumbé A., Lee A., & Storey D. (2001). Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. British Journal of Nutrition, 85(S1), S31–S45.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αναγνωστοπούλου Α., και Ταλέλλη Α. 2008. Τεχνολογία και Ποιότητα φρούτων και λαχανικών, εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών σελ.309-320
- Βαχαμίδης Π., Βέμμος Σ. (2009). Η ροδιά και η καλλιέργεια της. Γεωργία-Κτηνοτροφία 2: 30-39
- Βλάμης Α. (2018) Σημειώσεις Μαθήματος Βιοχημείας Τροφίμων, , Πανεπιστήμιο Πατρών
- Γάτσιος Κάσσανδρος (2010) Η Ροδιά, Εκδόσεις Αγρότυπος Α.Ε, Αθήνα σελ. 20 – 85
- Γιαννακούρου Μ., (2017) «Τεχνολογία και ποιότητα φρούτων και λαχανικών- Προϊόντα με προσθήκη ζάχαρης » , ΤΕΙ Αθήνας, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής
- Δρογούδη Π., Τσιπουρίδης Κ. και Πανταζής Σ. (2007). Η καλλιέργεια της ροδιάς. Γεωργία - Κτηνοτροφία, 1, 24-29.
- Δρογούδη Π. (2009). Ροδιά (*Punica granatum* L): Ο 'κόκκινος χρυσός' της διατροφικής αξίας - μια εναλλακτική καλλιέργεια για την ελληνική ύπαιθρο. ΕΘΙΑΓΕ, 38, 4-6.
- Δρογούδη Π., Βασιλακάκης Μ., Θωμίδης Θ., Ναβροζίδης Ε. και Παντελίδης Γ. (2012). Εγχειρίδιο για την καλλιέργεια της ροδιάς.
- Ευαγγελίου Β., (2018) Σημειώσεις Μαθήματος Βιοπολυμερή (ή Υδροκολλοειδή) Τροφίμων
- Λάζος, Ε.Σ. (2002). Επεξεργασία τροφίμων ΙΙ. 3η Έκδοση. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθηνών
- Λάμπρου Ν., (2017) Σημειώσεις Μαθήματος Αναλυτικής Βιοτεχνολογίας
- Μαλλούχος Α., (2018) Σημειώσεις Μαθήματος Μεθόδων Ανάλυσης Τροφίμων
- Παππάς Χ., (2018) Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας, Σημειώσεις Μαθήματος Φυσικά Προϊόντα – Βιοδραστικότητα
- Ποντίκης Α.Κ (1996) Ειδική Δενδροκομία Τόμος Δεύτερος, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα σελ. 433 – 438
- Σακελλάρης Γ. (1986). Πηκτίνες και πηκτινικά ένζυμα. Χημ. Χρονικά 51: 355-357

Ιστοσελίδες

- <http://www.gaiapedia.gr/>
- <http://www.food-info.net/uk/colour/anthocyanin.htm3>
- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3145>
- <https://www.pomwonderful.com/history/contemporary-modern/?date=1944+AD>