



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι : ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

# ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΚΑΚΑΟ ΣΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΟΜΙΚΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΘΗΝΑ ΠΑΠΠΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ



ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2017



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΚΑΚΑΟ  
ΣΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΜΕ  
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

της

**ΝΟΜΙΚΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑΣ**

**Επιβλέπουσα :** **Αθηνά Παππά**  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούνιος 2017



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία με τίτλο «Παρακολούθηση της αλλοίωσης σκόνης κακάο σε προσομοιωμένες συνθήκες αποθήκευσης με αναλυτικές μεθόδους» εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Πιο συγκεκριμένα, η διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας και στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2016-2017.

Επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η Καθηγήτρια Αθηνά Παππά και συνεπιβλέπουσα η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην περάτωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Αθηνά Παππά για την ανάθεση της εργασίας, τον χρόνο, το ενδιαφέρον και τη στήριξή της καθώς και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε. Ευχαριστώ επίσης την συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Μαγδαληνή Κροκίδα για την καθοδήγησή της και την συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη τα μέλη της επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν και τις συμβουλές τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στις Διδάκτορες και μέλη του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού του τομέα Χημικών Επιστημών κυρία Κατερίνα Μικέδη και κυρία Σοφία Κάρμα, όπως επίσης στην Υποψήφια Διδάκτορα κυρία Χριστίνα Δρόσου και την Διδάκτορα κυρία Σοφία Παπαδάκη του Εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών. Η συνεχή συμπαράσταση και η πρακτική βοήθειά τους σε όλα τα ζητήματα συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας.

Τέλος, με την ολοκλήρωση των σπουδών μου οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υλική και πνευματική υποστήριξη καθώς και την προσπάθειά τους να αποκτήσω παιδεία.

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2017

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη της αλλοίωσης και της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων είναι ένα πεδίο έρευνας της βιομηχανίας τροφίμων στην προσπάθειά της να προσφέρει ποιοτικά και με μεγάλη διάρκεια ζωής προϊόντα. Η σκόνη κακάο είναι ένα προϊόν με διάρκεια ζωής η οποία υπερβαίνει το ένα έτος με αποτέλεσμα περιορισμένος αριθμός ερευνών να είναι διαθέσιμος για τις μεταβολές που υφίσταται με την πάροδο του χρόνου.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της αλλοίωσης δειγμάτων σκόνης κακάο υπό ρεαλιστικές και υπό επιταχυνόμενες συνθήκες αποθήκευσης. Η αποθήκευση στις εν λόγω συνθήκες στόχευε στην διερεύνηση των αλλαγών που πραγματοποιούνται σε μικροβιολογικό και χημικό επίπεδο. Για αυτόν τον λόγο εξετάστηκε η μικροβιακή ανάπτυξη, η οξείδωση των περιεχόμενων λιπαρών και η απώλεια των αντιοξειδωτικών ουσιών σε δείγματα σκονών κακάο.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο προϊόντα σκόνης κακάο, το ένα με περιεκτικότητα 10-12% σε λιπαρά και το δεύτερο με περιεκτικότητα 20-22% σε λιπαρά. Ποσότητα από το κάθε προϊόν αποθηκεύτηκε με ασηπτική διαδικασία σε έξι διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας: i) 20°C και 90% RH, ii) 20°C και 30% RH, iii) 35°C και 80% RH, iv) 35°C και 30% RH, v) 45°C και 80% RH και vi) 45°C και 30% RH. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν 12 δείγματα σκονών κακάο από τα οποία γινόταν η δειγματοληψία στις προκαθορισμένες ημερομηνίες αποθήκευσης των 0,7,15,30,60 και 90 ημερών. Ο μικροβιολογικός έλεγχος των δειγμάτων στις προκαθορισμένες ημερομηνίες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση έτοιμων αφυδατωμένων φιλμ θρεπτικού υλικού σε πλαστικά τρυβλία.

Επιπλέον, στις ημερομηνίες που αναφέρθηκαν προσδιορίστηκε η οξειδωτική κατάσταση των περιεχόμενων λιπαρών, δηλαδή του βουτύρου κακάο, των δειγμάτων. Για να γίνει έλεγχος την οξειδωτικής κατάστασης του βουτύρου κακάο αναπτύχθηκε πρώτα πειραματικό πρωτόκολλο απομόνωσης των περιεχόμενων λιπαρών με εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα. Η οξειδωτική κατάσταση του βουτύρου κακάο παρακολούθηθηκε, κατά το διάστημα των τριών μηνών, με τον προσδιορισμό του αριθμού των υπεροξειδίων ιωδομετρικά. Για την μελέτη της οξείδωσης των λιπαρών, εξετάστηκαν επίσης η φασματομετρία Raman και η φασματοφωτομετρική μέθοδος του θειοκυανικού σιδήρου.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του συνολικού πολυφαινολικού φορτίου σε επιλεγμένα δείγματα. Αυτό έγινε αφού πρώτα αναπτύχθηκε πειραματικό πρωτόκολλο απομόνωσης των αντιοξειδωτικών ουσιών με εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Έτσι, ελέγχθηκε η

αντιοξειδωτική ικανότητα και το πολυφαινολικό φορτίο δειγμάτων σκονών κακάο στην έναρξη και την ολοκλήρωση της μελέτης, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 45°C. Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλίου (DPPH). Ο ποσοτικός προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Από την μελέτη αυτή προέκυψε ότι η σκόνη κακάο είναι ένα πολύ σταθερό τρόφιμο. Ανεξαρτήτως των συνθηκών αποθήκευσης, στο χρονικό διάστημα των τριών μηνών είναι μικροβιολογικά ασφαλές και το περιεχόμενο βούτυρο κακάο των σκονών δεν οξειδώνεται. Αυτό οφείλεται στην υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των σκονών κακάο. Υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει η σκόνη κακάο με περιεκτικότητα 20-22% σε λιπαρά. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της σκόνης αυτής μειώνεται έντονα κατά την αποθήκευση της στους 45°C για τρεις μήνες εξαιτίας της μείωσης του πολυφαινολικού φορτίου της κατά 37%.

## ABSTRACT

The aim of the thesis was to study cocoa powders' degradation under normal and accelerated storage conditions. Two cocoa powder products were used: one containing 10-12% lipids and the other containing 20-22% lipids. A preset quantity of each product was stored aseptically in six different humidity and temperature conditions: i) 20°C and 90% RH, ii) 20°C and 30% RH, iii) 35°C and 80% RH, iv) 35°C and 30% RH, v) 45°C and 80% RH and vi) 45°C and 30% RH. In this way, 12 samples were examined at predetermined times of storage and particularly at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days from the beginning of the experiment. At each sampling time microbial analysis was conducted using Compact Dry, a ready to use dehydrated film media in rigid plastic.

In addition, at the aforementioned sampling times the oxidation status of cocoa butter of each sample was determined. Cocoa butter is the fat contained in cocoa butter. To study the oxidation of contained cocoa butter of the samples, an experimental protocol for lipids recovery using Microwave- assisted extraction was developed. The oxidation of cocoa butter was examined during the three months period by measuring the peroxide value with iodometric titration. The oxidation change of cocoa butter was also investigated via Raman spectroscopy and colometric ferric thiocyanate method.

Furthermore, the antioxidant potential and the total phenolic content of cocoa powder were investigated in selected samples. Firstly an experimental protocol for the recovery of antioxidant compounds using Ultrasound assisted extraction was developed. Then the antioxidant potential of samples at the beginning and at the end of the study was determined by evaluating the free-radical scavenging capacity with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•). Finally, the total phenolic content in the cocoa powder extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method.

This study showed that cocoa powder is a very stable food. Irrespective of storage conditions, over the three-month period it is microbiologically safe and the cocoa butter content of the powders is not oxidized. This is due to the high antioxidant capacity of cocoa powders. A higher antioxidant capacity is found in cocoa powder with a 20-22% fat content. The antioxidant capacity of this powder is greatly reduced when stored at 45°C for three months due to a 37% reduction in its polyphenolic content.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>vii</b>
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Στόχος διπλωματικής εργασίας και μεθοδολογική προσέγγιση .....	1
1.2 Οργάνωση κειμένου .....	2
<b>II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΤΟ ΚΑΚΑΟ</b> .....	<b>4</b>
2.1 Γενικά στοιχεία για το Κακάο .....	4
2.2 Πληροφορίες για το κακαόδεντρο.....	5
2.3 Παραγωγή του κακάο.....	6
2.3.1 Ζύμωση .....	6
2.3.2 Ξήρανση.....	7
2.3.3 Καβούρδισμα .....	7
2.3.4 Λίχνισμα.....	7
2.3.5 Άλεση.....	7
2.3.6 Αλκαλίωση.....	8
2.3.7 Συμπίεση .....	8
2.3.8 Θρυμματισμός και άλεση.....	8
2.4 Σύσταση κόκκων κακάο.....	10
2.4.1 Πρωτεΐνες.....	10
2.4.2 Λιπίδια.....	10
2.4.3 Υδατάνθρακες .....	11
2.4.4 Φαινολικές ενώσεις.....	11
2.4.5 Αλκαλοειδή .....	13
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ</b> .....	<b>14</b>



3.1	Μικροβιολογία τροφίμων.....	14
3.2	Αλλαγές στη φυσική κατάσταση.....	16
3.3	Χημικές αντιδράσεις .....	16
3.3.1	Ενζυμικές δράσεις.....	17
3.3.2	Μη ενζυμικό μαύρισμα τροφίμων .....	17
3.3.3	Οξείδωση λιπαρών .....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ.....		18
4.1	Φάσεις Αυτοοξείδωσης.....	19
4.1.1	Έναρξη .....	19
4.1.2	Διάδοση.....	19
4.1.3	Τερματισμός.....	20
4.2	Κινητική και προϊόντα .....	20
4.3	Αντιοξειδωτικά.....	21
4.3.1	Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών .....	22
4.3.2	Πολυφαινόλες .....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> : ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΚΑΚΑΟ .....		24
5.1	Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου .....	24
5.2	Προσδιορισμός οξειδωτικής κατάστασης.....	24
5.2.1	Ιωδομετρικός προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων.....	25
5.2.2	Φασματοφωτομετρική μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου .....	25
5.2.3	Φασματοσκοπία Raman .....	26
5.3	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών .....	26
5.3.1	Μέτρηση της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH•).....	27
5.3.2	Μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> : ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ – ΥΓΡΟΥ .....		29
6.1	Γενικά στοιχεία εκχύλισης στερεού- υγρού.....	29
6.2	Επιλογή διαλύτη.....	30
6.3	Τεχνικές εκχύλισης .....	30
6.3.1	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα .....	31

6.3.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους.....	32
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>: ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>33</b>
7.1	Φασματομετρία Raman.....	33
7.2	Υπεριώδης και Ορατή φασματομετρία.....	34
	<b>III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>37</b>
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>: ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΚΟΝΩΝ ΚΑΚΑΟ.....</b>	<b>39</b>
8.1	Υλικά.....	39
8.2	Εξοπλισμός.....	39
8.3	Διαδικασία.....	39
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9<sup>ο</sup>: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....</b>	<b>42</b>
9.1	Υλικά.....	42
9.2	Εξοπλισμός.....	42
9.3	Διαδικασία.....	42
9.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων .....	42
9.3.2	Μικροβιακή ανάλυση.....	44
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10<sup>ο</sup>: ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ.....</b>	<b>46</b>
10.1	Απομόνωση λιπαρών .....	46
10.1.1	Υλικά.....	46
10.1.2	Εξοπλισμός.....	46
10.1.3	Διαδικασία.....	46
10.2	Ιωδομετρικός προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων.....	48
10.2.1	Αντιδραστήρια .....	48
10.2.2	Όργανα- Συσκευές .....	48
10.2.3	Διαδικασία.....	49
10.3	Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο του θειοκυανικού σιδήρου .....	53
10.3.1	Αντιδραστήρια- Διαλύματα .....	53
10.3.2	Όργανα- Συσκευές .....	53
10.3.3	Διαδικασία.....	53
10.4	Φασματομετρία Raman στο βούτυρο κακάο.....	54
10.4.1	Εξοπλισμός.....	54

10.4.2	Διαδικασία.....	54
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11<sup>ο</sup>: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ .....</b>	<b>56</b>
11.1	Απομόνωση αντιοξειδωτικών.....	56
11.1.1	Υλικά.....	56
11.1.2	Εξοπλισμός.....	56
11.1.3	Διαδικασία.....	56
11.2	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH•.....	57
11.2.1	Υλικά.....	58
11.2.2	Εξοπλισμός.....	58
11.2.3	Διαδικασία.....	58
11.3	Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού φορτίου .....	59
11.3.1	Υλικά.....	59
11.3.2	Όργανα- Συσκευές .....	59
11.3.3	Διαδικασία.....	59
	<b>IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>62</b>
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12<sup>ο</sup>: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>62</b>
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13<sup>ο</sup>: ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ.....</b>	<b>64</b>
13.1	Απομόνωση λιπαρών με εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα 64	
13.2	Παρακολούθηση αριθμού υπεροξειδίων .....	64
13.2.1	Δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά .....	65
13.2.2	Δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά .....	69
13.3	Φασματοσκοπία Raman .....	71
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14<sup>ο</sup> : ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ .....</b>	<b>73</b>
14.1	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	73
14.2	Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου .....	76
	<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....</b>	<b>78</b>
	<b>VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>80</b>
	<b>VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>84</b>
	<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>88</b>

<b>EYPETHPIO EIKONΩN .....</b>	<b>90</b>
<b>EYPETHPIO ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>92</b>



## **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Οι προσδοκίες των καταναλωτών για τρόφιμα ασφαλή, ανώτερης ποιότητας, φρέσκα, προσιτά στην τιμή και διαθέσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου είναι πολύ υψηλές. Για να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών η βιομηχανία τροφίμων επιδιώκει την επίτευξη δύο φαινομενικά αντίθετων στόχων: την επέκταση του χρόνου ζωής και την ελαχιστοποίηση της επεξεργασίας των τροφίμων. Προϋπόθεση της προσπάθειας αυτής είναι η κατανόηση των φυσικοχημικών, μικροβιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στο κάθε τρόφιμο και η αναγνώριση των υπεύθυνων μηχανισμών για την αλλοίωση ή την απώλεια των επιθυμητών χαρακτηριστικών του.

Το κακάο είναι ένα τρόφιμο το οποίο αξιοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή σοκολατένιων γλυκισμάτων και ροφημάτων τόσο σε βιομηχανικό όσο και σε καταναλωτικό επίπεδο. Στις ανεπτυγμένες χώρες η ζήτηση του κακάο παρουσιάζει αύξηση με ετήσιο ρυθμό 2,2% (FAOSTAT). Ο ρυθμός αυτός εκτιμάται ότι θα αυξηθεί εξαιτίας της ύπαρξης βιοδραστικών συστατικών στο κακάο με επωφελή επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Το κακάο είναι ένα τρόφιμο με μεγάλη διάρκεια ζωής με αποτέλεσμα να διατίθενται περιορισμένα στοιχεία για τις φυσικοχημικές και βιοχημικές αλλαγές που υφίσταται. Οι αλλαγές αυτές είναι το αντικείμενο διερεύνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

#### **1.1 Στόχος διπλωματικής εργασίας και μεθοδολογική προσέγγιση**

Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι να προσδιοριστούν οι βιοχημικές και φυσικοχημικές μεταβολές που πραγματοποιούνται στις σκόνες κακάο κατά την πάροδο του χρόνου αποθήκευσής τους. Για τον σκοπό αυτό δύο σκόνες κακάο με περιεκτικότητα 10-12% σε λιπαρά και 20-22% σε λιπαρά αποθηκεύονται σε έξι διαφορετικές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας για το χρονικό διάστημα των τριών μηνών. Έτσι δημιουργούνται 12 διαφορετικά δείγματα τα οποία ελέγχονται στις προκαθορισμένες ημερομηνίες αποθήκευσης των 0,7,15,30,60 και 90 ημερών. Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης που εξετάζονται είναι η θερμοκρασία των 20°C που αποτελεί την πραγματική θερμοκρασία αποθήκευσης ενός τέτοιου προϊόντος, και οι

θερμοκρασίες των 35° και 45°C, οι οποίες αποτελούν ακραίες θερμοκρασίες αποθήκευσης ώστε να επιταχυνθούν οι μηχανισμοί αλλοίωσης των συστατικών του κακάο. Στις προκαθορισμένες ημερομηνίες αποθήκευσης διεξάγονται μικροβιακοί έλεγχοι στα δώδεκα αυτά δείγματα. Αντίστοιχα τα δείγματα ελέγχονται ως προς την οξειδωτική κατάσταση των λιπαρών τους, διότι τα λιπαρά είναι συστατικά ευαίσθητα στις αλλαγές. Για τους ελέγχους αυτούς αναπτύσσεται πρώτα πειραματικό πρωτόκολλο για την απομόνωση των λιπαρών από τις σκόνες κακάο. Επιπλέον, εξετάζεται η μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά την έναρξη και την ολοκλήρωση της μελέτης για τα δείγματα κακάο αποθηκευμένα στους 45°C καθώς και η διαφορά της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δειγμάτων με περιεκτικότητα 10-12% σε λιπαρά και 20-22% σε λιπαρά. Τέλος προσδιορίζεται η μεταβολή των συνολικών πολυφαινολικών συστατικών στα δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20-22% σε λιπαρά και θερμοκρασία αποθήκευσης τους 45°C. Για τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής δράσης και του πολυφαινολικού περιεχομένου αναπτύσσεται πρωτόκολλο παραλαβής των αντιοξειδωτικών.

## **1.2 Οργάνωση κειμένου**

### **ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το πρώτο κεφάλαιο το οποίο είναι η εισαγωγή της εργασίας παρουσιάζει το κίνητρο της μελέτης και τον στόχο της καθώς και την διάρθρωση της εργασίας.

### **ο ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Τα κεφάλαια 2 έως 7 αποτελούν το θεωρητικό μέρος της εργασίας. Στο κεφάλαιο 2 δίνονται πληροφορίες για το εξεταζόμενο προϊόν, για την παραγωγική του διαδικασία και τη σύστασή του. Στο κεφάλαιο 3 ορίζεται η διατηρησιμότητα των τροφίμων και περιγράφονται οι βασικές αλλοιώσεις που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Η οξείδωση των λιπαρών, η οποία αποτελεί μια συνηθισμένη αλλαγή στα τρόφιμα αναλύεται περισσότερο στο κεφάλαιο 4. Το κεφάλαιο 5 παρουσιάζει τις μεθόδους που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ώστε να μελετηθεί η αλλοίωση που υφίστανται οι σκόνες κακάο. Τέλος στα κεφάλαια 6 και 7 παρατίθενται συνοπτικά στοιχεία θεωρίας σχετικά με τις τεχνικές διαχωρισμού και ανάλυσης που αξιοποιούνται στο πειραματικό μέρος

### **ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Τα κεφάλαια 8 έως 11 ανήκουν στο πειραματικό μέρος της εργασίας και παρουσιάζουν τον πειραματικό σχεδιασμό και τη μεθοδολογία των πειραμάτων. Στο κεφάλαιο 7 περιγράφεται η μεθοδολογία αποθήκευσης των σκονών υπό ασηπτικές συνθήκες. Στο κεφάλαιο 8 δίνεται το πρωτόκολλο των μικροβιακών αναλύσεων. Στο κεφάλαιο 9 παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των

λιπαρών από τις σκόρες κακάο και στη συνέχεια η πειραματική διαδικασία για την παρακολούθηση της οξειδωτικής του κατάστασης. Όμοια στο κεφάλαιο 10 περιγράφεται η διαδικασία απομόνωσης των αντιοξειδωτικών ουσιών και έπειτα τα πειραματικά πρωτόκολλα προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης και του συνολικού πολυφαινολικού φορτίου.

#### ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων δίνονται με μορφή πινάκων και διαγραμμάτων στα κεφάλαια 12 έως 14 και σχολιάζονται. Το κεφάλαιο 12 ασχολείται με την μικροβιακή ανάλυση, το 13 με την παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπαρών και το 14 με την μεταβολή των αντιοξειδωτικών συστατικών.

#### ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα της εργασίας παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 15 και στο τέλος του κεφαλαίου γίνονται προτάσεις για περαιτέρω μελέτη.

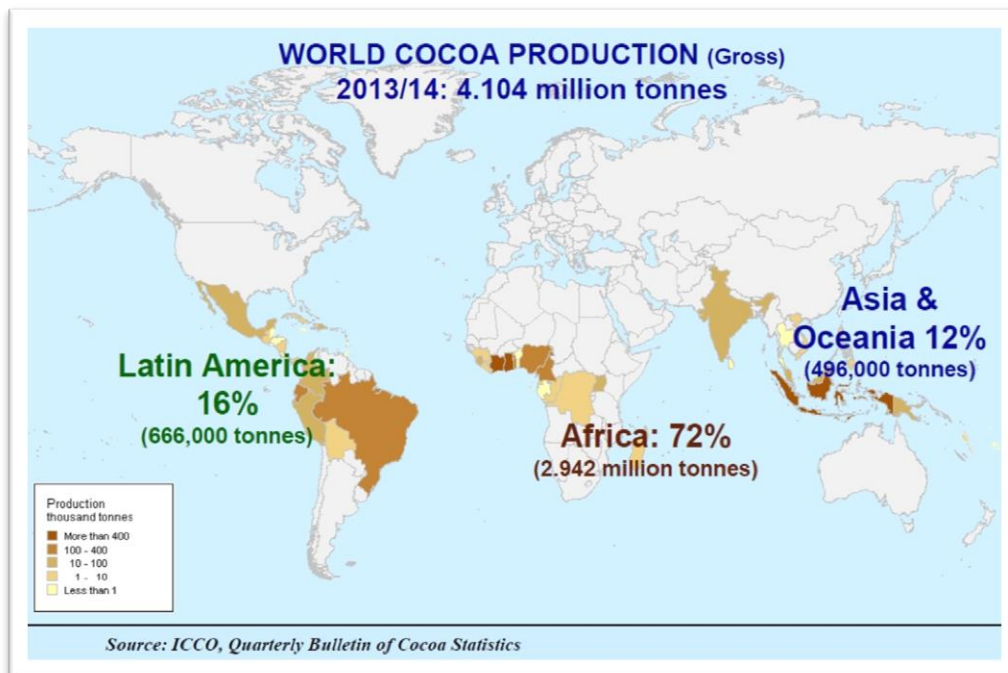


## II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΤΟ ΚΑΚΑΟ

#### 2.1 Γενικά στοιχεία για το Κακάο

Το κακάο είναι ο ξηρός και μερικώς ζυμωμένος λιπαρός σπόρος του κακαόδεντρου από τον οποίον παρασκευάζεται η σοκολάτα. Παγκοσμίως, η συνολική παραγωγή των κόκκων του κακάο υπερέβη τους 4 εκατομμύρια τόνους κατά το 2013-2014, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1 (International Cocoa Organization (ICCO), 2015). Η μεγαλύτερη ποσότητα των κόκκων του κακάο παράγεται στην Δυτική Αφρική ( $\approx 70\%$ ) ακολουθούμενη από την Ασία και την Ωκεανία ( $\approx 16\%$ ) και τελευταία κατά σειρά την Λατινική Αμερική ( $\approx 14\%$ ). Ηγετική θέση στην παραγωγή κατέχουν η Ακτή Ελεφαντοστού, η Γκάνα, η Ινδονησία, η Νιγηρία, το Καμερούν, η Βραζιλία, το Εκουαδόρ, η Δομινικανή Δημοκρατία και η Μαλαισία, παρέχοντας το 90% της παγκόσμιας συνολικής ποσότητας. (Belitz, Grosch & Schieberle, 2009), (Krähmer et al., 2015)



Εικόνα 1: Παγκόσμια παραγωγή κακάο κατά το 2013-2014

Η αυξητική τάση στην ζήτηση του κακάο και της σοκολάτας οφείλεται στις μοναδικές γευστικές και οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια, μάλιστα, φαίνεται ότι το κακάο έχει ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Σημαντικός αριθμός επιστημονικών μελετών παρουσιάζουν το κακάο να περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και προκυανιδινών, συστατικά που έχουν αντιοξειδωτική δράση, παρεμποδίζοντας την οξειδωτική δράση των ελεύθερων ριζών και προστατεύουν έτσι από τον καρκίνο, τις καρδιοπάθειες και τη γήρανση. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι επηρεάζει δυσμενώς τη λειτουργία του ήπατος.

## 2.2 Πληροφορίες για το κακαόδεντρο

Οι σπόροι κακάο είναι καρποί του τροπικού δέντρου *Theobroma cacao*. Η επιστημονική ονομασία του δέντρου προέρχεται από τις λέξεις θεός και βρώση, δηλαδή το "φαγητό των θεών". Το συγκεκριμένο δέντρο είναι αιθαλές και καλλιεργείται εμπορικά σε τροπικές περιοχές με γεωγραφικό πλάτος εντός των 20° από τον Ισημερινό. Ευδοκίμει δηλαδή σε ζεστά και υγρά κλίματα με μέση ετήσια θερμοκρασία 24-28 °C. Διατηρείται με κλάδεμα στα 2-4 m και φυτεύεται κάτω από σκιερά δέντρα του δάσους όπως κοκοφοίνικες και μπανανόδεντρα.



**Εικόνα 2: Οι καρποί του δέντρου *Theobroma cacao***



**Εικόνα 3: Εσωτερικό καρπού όπου διακρίνονται οι σπόροι και η πούλπα**

Το δέντρο ανθοφορεί όλον τον χρόνο. Οι καρποί του (cocoa pods) είναι μεγάλοι, ωοειδείς, κιτρινοκάστανοι έως μωβ (Εικόνα 2) και ωριμάζουν σε 4-6 μήνες. Οι ώριμοι καρποί έχουν μήκος 15-25 cm και πλάτος 7-10 cm. Κάθε καρπός περιέχει 20-50 σπόρους (cocoa beans), ελλειψοειδούς σχήματος, οι οποίοι περιβάλλονται από

έναν γλυκόπικρο, άσπρο γλοιώδη πολτό (Εικόνα 3) . Οι σπόροι έχουν μήκος περίπου 2 cm και πλάτος 1cm. Ο εσωτερικός πολτός καλείται πούλπα και περιέχει γλυκόζη και φρουκτόζη σε ποσοστό 10%. Η συγκομιδή των καρπών γίνεται κατά προτίμηση δύο φορές το χρόνο.

Το δέντρο του είδους *Theobroma cacao* διακρίνεται σε δύο κύριες ομάδες, το δέντρο «Criollo» και το δέντρο «Forastero». Το δέντρο Criollo είναι ευαίσθητο στις κλιματολογικές αλλαγές και στις προσβολές από έντομα και ασθένειες. Ωστόσο είναι ιδιαίτερα αρωματικό. Το δέντρο Forastero είναι πιο ανθεκτικό, οι σπόροι του έχουν μεγαλύτερη απόδοση αλλά μειωμένο άρωμα και γεύση σε σύγκριση με την πρώτη ομάδα. Το κακάο που προέρχεται από το δέντρο Forastero είναι γνωστό και ως «κακάο του καταναλωτή» καθώς συναντάται σε πιο φθηνά σοκολατένια προϊόντα. Μια ακόμη σημαντική κατηγορία είναι το δέντρο Trinitario, το οποίο αποτελεί διασταύρωση των δύο προηγούμενων. (Belitz et al., 2009)

## 2.3 Παραγωγή του κακάο

Αφού πραγματοποιηθεί η συγκομιδή, οι καρποί του κακαόδεντρου υποβάλλονται σε μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία μεταβάλλει τις αρχικές χημικές και φυσικές ιδιότητες του σπόρου. Κατά την επεξεργασία αυτή αυξάνεται η γευστικότητα του και αποκτά τη γνωστή σοκολατένια γεύση. Η πρωτεύουσα επεξεργασία περιλαμβάνει τα στάδια της ζύμωσης και της ξήρανσης. Η δευτερεύουσα επεξεργασία μετατρέπει τους σπόρους κακάο σε τελικά προϊόντα και περιλαμβάνει τα εξής στάδια: καβούρδισμα, λίχνισμα, άλεση, αλκαλίωση και συμπίεση. Η δευτερογενής επεξεργασία πραγματοποιείται στο εργοστάσιο. Ακολούθως περιγράφονται εν συντομία τα κύρια στάδια και δίνονται σχηματικά στην Εικόνα 4.

### 2.3.1 Ζύμωση

Κατά την συγκομιδή οι πλήρως ώριμοι λοβοί κόβονται προσεκτικά, ανοίγονται και συλλέγονται οι σπόροι με τον πολτό που τους περιβάλλει. Συσσωρεύονται σε στοίβες εντός καλάθιών ή διάτρητων βαρελιών, καλύπτονται με μπανανόφυλλα και αφήνονται να ζυμωθούν για 2-8 μέρες, ανάλογα με την ποικιλία. Περιοδικά αναδεύονται. Σε αυτό το διάστημα η θερμοκρασία του υλικού αυξάνει γρήγορα στους 45-50°C. Αρχικά, παρατηρείται αλκοολική ζύμωση η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε παραγωγή οξικού οξέος. Ο προσκολλημένος πολτός αποσυντίθεται ενζυμικά και απομακρύνεται ως υγρό ζύμωσης. Επίσης, υπάρχουν αντιδράσεις μεταξύ του πολτού και των συστατικών του σπόρου. Στο στάδιο της ζύμωσης παρατηρείται η ανάπτυξη της γεύσης, του αρώματος και του χρώματος. Με το πέρας

της ζύμωσης οι σπόροι έχουν μετατραπεί στους κόκκους κακάο. Οι κόκκοι πλένονται και διακρίνονται από τους μειονεκτικούς και ανώριμα ζυμωμένους κόκκους.

### **2.3.2 Ξήρανση**

Κατά το στάδιο αυτό οι κόκκοι κακάο απλώνονται σε στεγνό πάτωμα ή πάνω σε δέρματα ζώων και ξηραίνονται είτε υπό την ηλιακή ακτινοβολία ή υπό τεχνητή θέρμανση για 7-10 μέρες. Στο τέλος της ξήρανσης η υγρασία είναι περίπου 6-8%.

### **2.3.3 Καβούρδισμα**

Το καβούρδισμα πραγματοποιείται σε ειδικούς φούρνους αφού προηγηθούν διαχωρισμοί με κόσκινα ώστε να εξασφαλιστεί το ομοιόμορφο μέγεθος των κόκκων. Οι καβουρδιστήρες μεταδίδουν θερμότητα στους κόκκους κακάο απευθείας μέσω θερμών επιφανειών ή μέσω ρεύματος ζεστού αέρα. Διαρκεί για 10-15 λεπτά, σε θερμοκρασία συνήθως κοντά στους 130°C και δεν καίει το κέλυφος των κόκκων. Κατά το καβούρδισμα η υγρασία μειώνεται στο 3%, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται περαιτέρω και απομακρύνεται το οξικό οξύ και άλλοι ανεπιθύμητοι πτητικοί εστέρες. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας καταστρέφονται τα αβγά και οι νύμφες των εντόμων. Το άρωμα των κόκκων ενισχύεται, το χρώμα σκουραίνει και γίνεται το γνωστό σκούρο καφέ χρώμα, ο σπόρος σκληραίνει και γίνεται πιο εύθρυπτος ενώ το κέλυφος χαλαρώνει και απομακρύνεται πιο εύκολα. Οι καβουρδισμένοι κόκκοι ψύχονται αμέσως μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας ώστε να μην καούν.

### **2.3.4 Λίχνισμα**

Μετά την ψύξη, οι κόκκοι μεταφέρονται σε μηχανές λιχνίσματος όπου απομακρύνεται το κέλυφος και τα βλαστικά ριζίδια, τα οποία προσδίδουν δυσάρεστη γεύση και άρωμα στο κακάο αν δεν αφαιρεθούν. Κατά τη διάρκεια του λιχνίσματος ο κόκκοι συνθλίβονται σε σχετικά μεγάλα μεγέθη, αποφεύγοντας τον σχηματισμό σκόνης. Το προϊόν της διεργασίας περιέχει περίπου 2,5% κέλυφος, φλοιό σπόρων και φύτρα. Η νοθεία ανιχνεύεται με δύο θρυπταμίδια τα οποία υπάρχουν σε μεγαλύτερη αναλογία στο κέλυφος. Το κέλυφος του κακάο είναι ένα απόβλητο το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάκτηση της θεοβρωμίνης ή ως ζωοτροφή και άλλες χρήσεις.

### **2.3.5 Άλεση**

Σε αυτό το στάδιο τα θραύσματα που έχουν δημιουργηθεί αλέθονται ώστε να γίνει θραύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και να αποκαλυφθεί το βούτυρο κακάο, το λίπος των κόκκων. Το προϊόν που παραλαμβάνεται είναι μια ομοιόμορφη ρευστή πάστα, μια μάζα κακάο που ονομάζεται λικέρ κακάο. Η άλεση πραγματοποιείται σε

περιστρεφόμενους σφαιρόμυλους, ή σε μύλους με περιστρεφόμενους χαλύβδινους δίσκους.

### **2.3.6 Αλκαλίωση**

Στη διεργασία της αλκαλίωσης, η μάζα του κακάο επεξεργάζεται με αραιό διάλυμα αλκάλειως 2-2,5% στους 75-100°C. Έτσι, επιτυγχάνεται να γίνει πιο ήπια η γεύση και το άρωμα του κακάο εξουδετερώνοντας τα ελεύθερα οξέα, να βελτιωθεί το χρώμα και να αυξηθεί η σταθερότητα του αιωρήματος. Ακολουθεί εξουδετέρωση της πλεονάζουσας ποσότητας του βασικού διαλύματος με τρυγικό οξύ. Τέλος, η μάζα ξηραίνεται έως η υγρασία γίνει περίπου 2%.

### **2.3.7 Συμπίεση**

Για να παραχθεί η σκόνη κακάο είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί το λίπος του κακάο, το οποίο στο λικέρ κακάο υπάρχει κατά μέσο όρο σε ποσοστό 54%. Η απομάκρυνση αυτή γίνεται συνήθως σε κοχλιοπρέσσα οριζόντιας λειτουργίας με πίεση 400-500 bar στους 90-100°C. Το θερμό βούτυρο κακάο διηθείται και ψύχεται σε καλούπια.

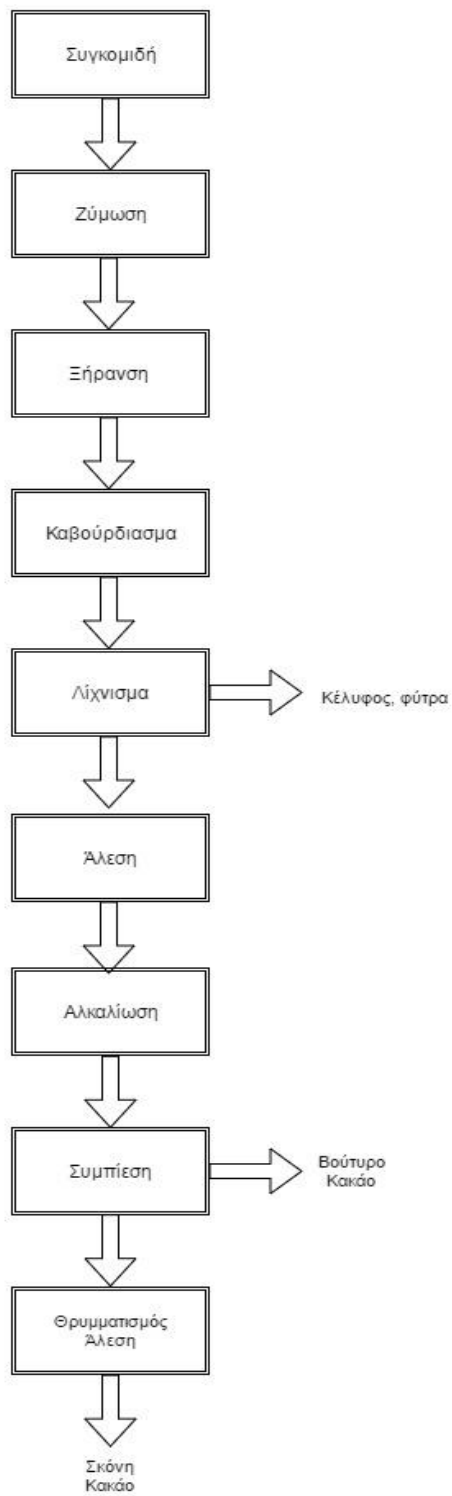
### **2.3.8 Θρυμματισμός και άλεση**

Με την απομάκρυνση του λίπους σχηματίζεται μια σκληρή πίτα κακάο με λιποπεριεκτικότητα 10-24%. Η πίτα αυτή θρυμματίζεται σε θραυστήρα με οδοντωτούς κυλίνδρους. Έπειτα αλέθεται σε μύλο με καρφιά και με τη βοήθεια αεροδιαχωριστή διαχωρίζεται σε κλάσματα λεπτόκοκκης και χονδρόκοκκης σκόνης.

Η χονδρόκοκκη σκόνη ανακυκλώνεται. Η σκόνη ταξινομείται ανάλογα με το ποσοστό του υπολειπόμενου λίπους σε:

- Σκόνη με μικρή απομάκρυνση λίπους, υπολειπόμενο βούτυρο κακάο 20-22%.
- Σκόνη με εκτεταμένη απομάκρυνση λίπους, υπολειπόμενο βούτυρο κακάο 10-12%.

Η σκόνη στην οποία έχει γίνει μικρή απομάκρυνση λίπους είναι πιο σκούρα και πιο ήπια στη γεύση. (Belitz et al., 2009), (Aprotosoie et al., 2016)



**Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής παραγωγής σκόνης κακάο**

## 2.4 Σύσταση κόκκων κακάο

Οι κόκκοι του κακάο οι οποίοι έχουν ζυμωθεί και ξηρανθεί στον αέρα, όχι με κάποια τεχνική πηγή, έχουν την τυπική σύσταση που παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 (Belitz et al., 2009):

**Πίνακας 1: Επί τοις εκατό σύσταση κόκκων κακάο**

Συστατικό	% περιεκτικότητα
Βούτυρο κακάο	54
Πρωτεΐνες	11,5
Καφεΐνη	0,2
Θεοβρωμίνη	1,2
Νερό	5
Πολυφαινόλες	6
Τέφρα	2,6
Καρβοξυλικά οξέα	1,5
Μόνο- και ολιγοζαχαρίτες	1
Άμυλο	6
Πεντοζάνες	1,5
Κυτταρίνη	9
Άλλες ενώσεις	0,5

### 2.4.1 Πρωτεΐνες

Διάφορα ένζυμα εντοπίζονται στους νωπούς κόκκους κακάο όπως αμυλάσες, φρουκτοζιδάσες, γαλακτοζιδάσες, λιπάσες, πολυφαινολοξειδάσες και άλλα. Τα ένζυμα αδρανοποιούνται σχεδόν πλήρως κατά την παραγωγική διαδικασία.

### 2.4.2 Λιπίδια

Το βούτυρο κακάο, εξαιτίας της αφθονίας του και της τιμής του είναι το πιο σημαντικό συστατικό των κόκκων του κακάο. Τα λιπαρά οξέα που απαντώνται στο βούτυρο κακάο φαίνονται στον Πίνακα 2:

**Πίνακας 2: Επί τοις εκατό σύσταση σε λιπαρά οξέα του βουτύρου κακάο**

Λιπαρά οξέα	Μέση σύσταση (% w/w)
Παλμιτικό	25
Στεατικό	37
Ελαϊκό	34
Λινελαϊκό	3



Το παλμιτικό και το στεατικό οξύ είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο βούτυρο κακάο βρίσκονται και μικρές ποσότητες από στερόλες και μεθυλοστερόλες κυρίως τη β-σιτοστερόλη, τη στιγμαστερόλη και καμπεστερόλη. Το βούτυρο κακάο τήκεται μεταξύ των θερμοκρασιών 30-40°C, με αποτέλεσμα στο στόμα να λιώνει απορροφώντας θερμότητα και αφήνοντας μια ευχάριστη αίσθηση δροσιάς. Το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο και έχει την ευχάριστη, ήπια μυρωδιά του κακάο. Είναι, επίσης, σχετικά σκληρό και έχει αρκετές κρυσταλλικές μορφές. Είναι, δηλαδή, πολυμορφικό. Βιβλιογραφικά αναφέρονται έξι κρυσταλλικές μορφές. Η πολυμορφική δομή V είναι αυτή που συναντάται στην εμπορική σοκολάτα. Όλες οι άλλες δομές οδηγούν σε προϊόντα με μη ικανοποιητικές οργανοληπτικές ιδιότητες και μικρότερη διάρκεια ζωής. Παλιές σοκολάτες οι οποίες δεν αποθηκεύτηκαν σωστά παρουσιάζουν τη πολυμορφική δομή VI.

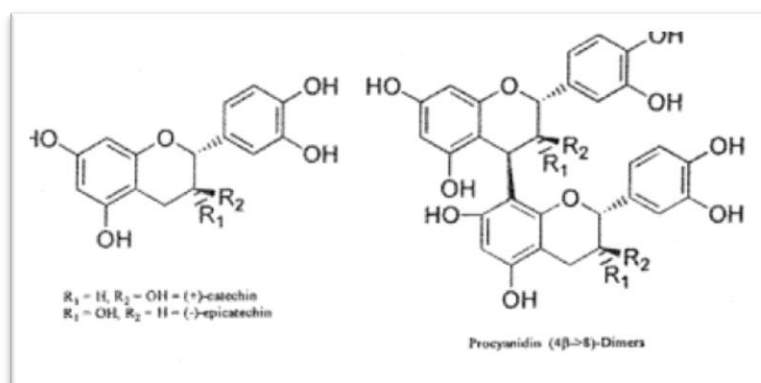
### **2.4.3 Υδατάνθρακες**

Το άμυλο είναι ο κύριος υδατάνθρακας. Μεταξύ άλλων ακόμη συναντώνται πεντοζάνες, γαλακτάνες και η κυτταρίνη. Άλλοι υδατάνθρακες που υπάρχουν είναι η σταχυόζη, η ραφινόζη, ζαχαρόζη, η γλυκόζη και φρουκτόζη.

### **2.4.4 Φαινολικές ενώσεις**

Οι κόκκοι του κακάο είναι ιδιαίτερα πλούσιοι σε πολυφαινόλες. Το περιεχόμενο του κακάο σε πολυφαινόλες είναι συγκρίσιμο με το περιεχόμενο που συναντάται στα φρούτα, τον καφέ και το τσάι. Τα πολυφαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο κακάο είναι φλαβανόλες (37%), ανθοκυανίνες (4%) και προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες (58%). Η κυριότερη φλαβανόλη είναι η (-)-επικατεχίνη (35% στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο) και σε μικρότερα ποσοστά η (+)-κατεχίνη και σε ίχνη (+)-γαλλοκατεχίνη και (-)-επιγαλλοκατεχίνη (Zumbe & Albert 1998). Η δομή των μορίων αυτών φαίνεται στην Εικόνα 5.





**Εικόνα 5: Δομή φαινολικών ενώσεων του κακάο**

Το πολυφαινολικό περιεχόμενο των σπόρων κακάο ποικίλει και επηρεάζεται από την ποικιλία, την περιοχή προέλευσης, την καλλιέργεια και τις κλιματικές συνθήκες ανάπτυξης. Τα συστατικά αυτά κατά τη διαδικασία παραγωγής της σκόνης κακάο παρουσιάζουν σημαντική μείωση. Η μείωση αυτή οφείλεται αρχικά στη δράση της πολυφαινολοξειδάσης αλλά και στην μη ενζυμική οξείδωση των φαινολών όπως επίσης και σε άλλες αντιδράσεις που υφίστανται (Miller et al., 2006) (Gu et al., 006). Δύο ημερών ξήρανση έχει βρεθεί ότι μειώνει την επικατεχίνη κατά 50%. Το καβούρδισμα και η επεξεργασία με αλκαλικά διαλύματα είναι διεργασίες που μειώνουν σημαντικό το πολυφαινολικό περιεχόμενο. Στον πίνακα 3 δίνεται το αρχικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των σπόρων ενώ στον πίνακα 4 δίνεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο των τελικών προϊόντων.

**Πίνακας 3: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σπόρων κακάο ως προς την ποικιλία και την γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας**

Geographical origin	Variety	Total polyphenol content
Ivory Coast	Forastero	81.5 mgGAE/g
Columbia	Amazon	81.4 mgGAE/g
Guinea Ecuatorial	Amazon Forastero	72.4 mgGAE/g
Ecuador	Amazon hybrid	84.2 mgGAE/g
Venezuala	Trinitario	64.3 mgGAE/g
Peru	Criollo	50.0 mgGAE/g
Dominican Republic	Criollo	40.0 mgGAE/g
Malaysia	Unknown	71.42-82.68 mgGAE/g
Cameroon	Unknown	86.6-143.6 mg epicatechin equivalent/g

**Πίνακας 4: Πολυφαινολικό περιεχόμενο τελικών προϊόντων (Waterhouse et al., 2006)**

Προϊόν	Πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/ g)
Σκόνη κακάο	20
Κουβερτούρα	8,4
Σοκολάτα γάλακτος	5

### 2.4.5 Αλκαλοειδή

Το κακάο περιέχει διάφορα αλκαλοειδή τα οποία έχουν την ιδιότητα να διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα πιο σημαντικά είναι η θεοβρωμίνη (3,7-διμέθυλοξανθίνη), η καφεΐνη (1,3,7-τριμέθυλοξανθίνη) και η θεοφιλίνη (Εικόνα 6). Είναι συστατικά τα οποία συμβάλλουν στην πικρή γεύση του κακάο. Ανάλογα με την προέλευση και τις συνθήκες καβουρδίσματος αλλάζει η περιεκτικότητά τους στο τελικό προϊόν. Τυπικές τιμές στο τελικό προϊόν είναι 3-4% θεοβρωμίνη και 0,2% καφεΐνη. Οι ουσίες αυτές δημιουργούν αισθήματα ευεξίας στον οργανισμό και έχουν ψυχοδιεγερτικές ιδιότητες. (Belitz et al., 2009), (Aprotosoiaie et al., 2016)



**Εικόνα 6: Τα αλκαλοειδή του κακάο: Καφεΐνη, Θεοφιλίνη και Θεοβρωμίνη**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τα τρόφιμα μπορούν να χαρακτηρισθούν ως πολύπλοκα και ενεργά συστήματα στα οποία λαμβάνουν χώρα μικροβιολογικές και φυσικοχημικές δράσεις ταυτόχρονα. Οι δράσεις αυτές επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα θρεπτικά συστατικά και κατ' επέκταση τη διάρκεια ζωής του τροφίμου. Διάρκεια ζωής ή διατηρησιμότητα τροφίμου είναι ο χρόνος, μετά την επεξεργασία του προϊόντος, στον οποίο το τρόφιμο παραμένει ασφαλές και οργανοληπτικά αποδεκτό από τον καταναλωτή. Η διατηρησιμότητα ενός τροφίμου εξαρτάται από τους μηχανισμούς των αλλοιώσεων των ποικίλων συστατικών του. Η μείωση των ρυθμών αλλοίωσης και υποβάθμισης των συστατικών του επιτυγχάνεται με ειδικά στάδια επεξεργασίας κατά την παραγωγική διαδικασία, κατάλληλη συσκευασία και συνθήκες αποθήκευσης. Η μέθοδος που θα επιλεγεί για τον περιορισμό της αλλοίωσης του τροφίμου προϋποθέτει την γνώση των αλλοιώσεων που πραγματοποιούνται στο εξεταζόμενο τρόφιμο. Οι μεταβολές που πραγματοποιούνται σε ένα τρόφιμο οφείλονται σε:

- a) Μικροβιολογικές αλλαγές,
- b) Αλλαγές φυσικής κατάστασης
- c) Χημικές αντιδράσεις

Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην οργανοληπτική υποβάθμιση του τροφίμου και θέτουν και ζητήματα ασφάλειας του. Συχνά μια αλλοίωση δεν ανήκει μόνο σε μία κατηγορία. Πιθανόν είναι και η αλλοίωση μιας κατηγορίας να επιταχύνει την αλλοίωση κάποιας άλλης. (Singh et al., 2004)

### 3.1 Μικροβιολογία τροφίμων

Τα τρόφιμα είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Αυτό οφείλεται σε δύο λόγους. Πρώτον είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και δεύτερον είναι εύκολο να μολυνθούν κατά την παραγωγή ή την κατανάλωσή τους. Οι «μικροοργανισμοί» ή «μικρόβια» όπως αποκαλούνται είναι ένα σύνολο έμβιων όντων αόρατων με γυμνό οφθαλμό αλλά ορατών με μικροσκόπιο (0.16μ). Οι μικροοργανισμοί μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, αλλά η κατηγοριοποίηση που ενδιαφέρει τη μικροβιολογία τροφίμων για πρακτικούς λόγους είναι εξής:

- i. Βακτήρια,
- ii. Ζυμομύκητες,
- iii. Ευρωτομύκητες.

Παρακάτω παρουσιάζονται σύντομα κάποια χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών αυτών.

Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Αποτελούν την κυριότερη πηγή αλλοίωσης των τροφίμων σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς. Αυτό οφείλεται:

1. Υπάρχουν πολλά είδη βακτηρίων τα οποία απαιτούν ποικίλες συνθήκες ανάπτυξης pH, θερμοκρασίας, υγρασίας και θρεπτικών συστατικών. Διαθέτουν δηλαδή μεγάλη παραλλακτικότητα.
2. Έχουν δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων.
3. Μπορούν να αναπτυχθούν αναερόβια.
4. Εκκρίνουν τοξίνες. Επομένως, η μόλυνση ενός δέκτη από βακτήρια μπορεί να γίνει είτε με απευθείας προσβολή του από τα βακτήρια ή μέσω τοξίνης.

Ορισμένα βακτήρια αποτελούν παράγοντες παθογόνου μόλυνσης, διότι η πρόσληψή τους οδηγεί στην εκδήλωση παθογένειας, ή παράγοντες αλλοιώσεων καθώς συμβάλλουν σε ανεπιθύμητες οργανοληπτικές αλλαγές. Υπάρχουν ωστόσο βακτήρια τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων. Τα βακτήρια αυτά είναι παράγοντες ωφελιμιστικής χρήσης και παραδείγματα αποτελούν βακτήρια τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ ή οξικό οξύ ως προϊόντα του μεταβολισμού τους.

Όσον αφορά τους ζυμομύκητες, πρόκειται για ελλειψοειδείς, σφαιρικούς ή ραβδόμορφους μικροοργανισμούς. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 2-6μm και πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση, διχοτόμηση ή σπορογονία. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, ανθεκτικοί σε χαμηλό pH και χαμηλή ενεργότητα νερού αλλά ευαίσθητοι στην υψηλή θερμοκρασία.

Τέλος, οι ευρωτομύκητες (μούχλες) είναι πολυκύτταροι μικροοργανισμοί νηματοειδούς μορφής. Είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, ανθεκτικοί σε χαμηλές θερμοκρασίες και χαμηλό pH και ενεργότητα νερού αλλά συνήθως ευαίσθητοι σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι ευρωτομύκητες οι οποίοι αναπτύσσονται στα τρόφιμα δεν είναι παθογόνοι με εξαίρεση ορισμένους ευρωτομύκητες οι οποίοι μπορεί να αναπτυχθούν υπό ακραίες συνθήκες κακής πρακτικής και παράγουν ιδιαίτερα τοξικές μυκοτοξίνες (π.χ. αφλατοξίνες, οχρατοξίνες).

Οι μικροοργανισμοί των τροφίμων μπορεί να είναι είτε ανεπιθύμητοι, ως παθογόνοι ή αλλοιωγόνους, είτε χρήσιμοι καθώς συμμετέχουν σε ζυμώσεις. Με άλλα λόγια, ενδέχεται να προκαλούν ανεπιθύμητες, παθογόνες ή αλλοιογόνες μεταβολές στο τρόφιμο εξαιτίας της αύξησής τους ή των μεταβολικών τους προϊόντων. Ενδέχεται, όμως, ακόμη τα μεταβολικά τους προϊόντα να είναι χρήσιμα.

Η ύπαρξη μικροβίων σε ένα τρόφιμο, εγγενώς ή λόγω επιμόλυνσής του, δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και την αλλοίωσή του. Για να αλλοιώσουν το τρόφιμο θα πρέπει πρώτα να αυξηθούν σε αριθμό, δηλαδή να πολλαπλασιαστούν. Ο

πολλαπλασιασμός αυτός προϋποθέτει ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ενεργότητα του νερού, η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και οι παρεμποδιστές είναι μερικοί παράγοντες που μπορούν να ευνοήσουν ή να εμποδίσουν, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού, τη μεταβολική του δραστηριότητα και κατ' επέκταση τον πολλαπλασιασμό του. Η θερμοκρασία και η ενεργότητα νερού αποτελούν δύο από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Τα μικρόβια αναπτύσσονται σε μια θερμοκρασιακή κλίμακα από -8 έως 90°C. Το εύρος που λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός τους είναι περίπου 40°C. Πρακτικά, τα μικρόβια δεν αναπτύσσονται σε ενεργότητες νερού μικρότερες του 0,6 (Singh & Anderson, 2004) (Ταούκης, 2009).

### **3.2 Αλλαγές στη φυσική κατάσταση**

Τέτοιου είδους αλλαγές προκαλούνται λόγω κακής διαχείρισης των προϊόντων κατά την παραγωγή, την επεξεργασία ή την διανομή τους. Μερικά παραδείγματα είναι τα ακόλουθα (Singh & Cadwallader, 2004):

- Απώλεια ή απορρόφηση υγρασίας κατά την αποθήκευση σε περιβάλλοντα διαφορετικά από τα προκαθορισμένα.
- Ανάπτυξη κρυστάλλων πάγων εξαιτίας διακυμάνσεων θερμοκρασίας στην περίπτωση των κατεψυγμένων προϊόντων.
- Διαχωρισμός φάσεων.
- Αλλαγή στο ιξώδες των ρευστών τροφίμων.
- Τήξη, πήξη τμημάτων του τροφίμου.

### **3.3 Χημικές αντιδράσεις**

Κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση τροφίμων ποικίλες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα είτε μεταξύ των συστατικών του τροφίμου ή των συστατικών και του περιβάλλοντος. Αυτές οι αλλαγές υποβαθμίζουν το τρόφιμο καθώς η εμφάνισή τους ενδέχεται να επηρεάζει το χρώμα, το άρωμα, τη γεύση ή/ και την υφή του τροφίμου. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την κινητική αυτών των αντιδράσεων, όπως η ενεργότητα του νερού, η θερμοκρασία, το pH, η έκθεση σε φως και οξυγόνο. Οι πιο συνηθισμένες χημικές αντιδράσεις στα τρόφιμα σχετίζονται με την δράση των ενζύμων, με την οξείδωση των μακρομορίων του τροφίμου και κυρίως των λιπιδίων του και την μη ενζυματική καστανώση/ αμαύρωση (Singh & Cadwallader, 2004).

### ***3.3.1 Ενζυμικές δράσεις***

Σε ευνοϊκές θερμοκρασίες πολλές ενζυμικές δράσεις πραγματοποιούνται μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά των τροφίμων με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Για παράδειγμα κατά την κοπή των φρούτων απελευθερώνονται φαινολάσες οι οποίες αντιδρούν με τα συστατικά του τροφίμου και σκουραίνουν το χρώμα του. Πρωτεάσες και λιπάσες αποδομούν πρωτεΐνες και λιπαρά αντίστοιχα.

### ***3.3.2 Μη ενζυμικό μαύρισμα τροφίμων***

Το μη ενζυμικό μαύρισμα ή καστανώση των τροφίμων είναι μια ποιοτική υποβάθμιση η οποία προκαλεί και απώλεια των θρεπτικών τους συστατικών. Εμφανίζεται λόγω της αλληλεπίδρασης των αναγωγικών σακχάρων με τα αμινοξέα. Δεν είναι πάντα ανεπιθύμητο. Εκτός από την αλλαγή στο χρώμα του τροφίμου, αυτή η αντίδραση μειώνει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών και παράγει ενώσεις με πικρή γεύση.

### ***3.3.3 Οξείδωση λιπαρών***

Η οξείδωση των λιπαρών επειδή εξετάζεται σε αυτήν την εργασία αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ

Τα λιγότερο σταθερά μακροσυστατικά των τροφίμων είναι τα λιπίδια. Ανάλογα με τον βαθμό της ακορεστότητάς τους τα λιπίδια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση. Η οξείδωση των λιπιδίων προκαλεί την ανάπτυξη ανεπιθύμητων αλλαγών στη γεύση και την οσμή του τροφίμου. Οι αλλοιώσεις αυτές καλούνται ταγγισμός. Η ταγγή γεύση και οσμή καθιστά το τρόφιμο μη αποδεκτό από τον καταναλωτή. Εκτός αυτού, ο ταγγισμός προάγει κι άλλες αντιδράσεις όπως την απώλεια βιταμινών, την υποβάθμιση πρωτεϊνών και την αλλαγή του χρώματος. Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ταγγισμό θεωρούνται ανθυγιεινά (Eskin & Przybylski, 2000). Διακρίνονται δύο μηχανισμοί ταγγισμού: η υδρολυτική διάσπαση και ο οξειδωτικός ταγγισμός.

### a) Υδρολυτική διάσπαση

Παρουσία νερού τα λιπαρά υφίστανται υδρόλυση χημικής ή βιοχημικής προέλευσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, τα τριγλυκερίδια υπό κατάλληλες συνθήκες υδρολύονται προς γλυκερίνη και λιπαρά οξέα:



Σε συνήθη θερμοκρασία η αντίδραση αυτή προχωρεί βραδύτατα. Επιταχύνεται όμως σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση, παρουσία φωτός και ενζύμων. Για αυτό στα φυσικά λιπαρά σώματα είναι ενδεχόμενη η αύξηση της οξύτητάς τους. Στα μόρια των γλυκεριδίων οι εστερικοί δεσμοί είναι θέσεις αντιδράσεως. Τέλος, η υδρολυτική διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια νερού, αραιών οξέων, καυστικών αλκαλίων (Ca, Mg, Zn) και λιπολυτικών ενζύμων.

### b) Οξειδωτικός ταγγισμός

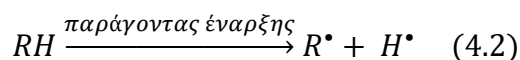
Ο οξειδωτικός ταγγισμός αποτελεί τη συνηθέστερη αιτία ταγγισμού. Η οξείδωση από το οξυγόνο του αέρα είναι μία αυτοκαταλύομενη αντίδραση. Η ύπαρξη περίσσειας οξυγόνου, φωτός, υγρασίας και ουσιών με καταλυτική προοξειδωτική δράση, επιταχύνουν την αλλοίωση. Η αρχή της οξείδωσης παρατηρείται πάντοτε στα ακόρεστα λιπαρά οξέα στο σημείο του διπλού δεσμού. Τα λιπαρά σώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση. Η οξείδωση των λιπιδίων παρέχει πολυάριθμες πτητικές και μη πτητικές ενώσεις. Δεδομένου ότι μερικές από τις πτητικές ουσίες είναι εξαιρετικά οσμηρές, η οξείδωση των λιπιδίων ανιχνεύεται ακόμη και στα τρόφιμα όπου τα ακόρεστα λιπίδια βρίσκονται ως δευτερεύοντα συστατικά. Η πορεία της αυτοοξείδωσης ακολουθεί τρεις σαφώς διακρινόμενες μεταξύ τους φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, η οξείδωση

προχωρεί με βραδύ ρυθμό, ενώ μετά από ένα σημείο επιταχύνεται κατά πολύ, εξαιτίας της καταλυτικής δράσης των ουσιών που σχηματίζονται.

## 4.1 Φάσεις Αυτοξειδωσης

### 4.1.1 Έναρξη

Κατά την φάση της έναρξης αφαιρείται ένα άτομο υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ το οποίο είναι είτε ελεύθερο ή σε τριγλυκερίδιο. Έτσι, σχηματίζεται μία αλκυλική ρίζα  $R^\bullet$ . Σταθεροποίηση της ρίζας μπορεί να γίνει με μετατόπιση του διπλού δεσμού. Αποτέλεσμα είναι να αλλάζει η διαμόρφωση του διπλού δεσμού με τις *trans* δομές να επικρατούν. Στην περίπτωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οι ελεύθερες ρίζες σταθεροποιούνται εξαιτίας φαινομένων συντονισμού τα οποία οδηγούν σε διαμορφώσεις με συζυγείς διπλούς δεσμούς. Η έναρξη μπορεί να περιγραφεί ως εξής:

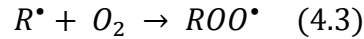


### 4.1.2 Διάδοση

Η οξειδωτική διαδικασία προχωρά στην φάση της διάδοσης στην οποία η ρίζα αλκυλίου αντιδρά με το οξυγόνο. Το μόριο του οξυγόνου μπορεί να βρίσκεται σε διάφορες καταστάσεις. Στην οξείδωση των λιπιδίων συμμετέχουν δύο καταστάσεις: το μονήρες οξυγόνο  $^1O_2$  ή οξυγόνο μονής κατάστασης και το οξυγόνο τριπλής κατάστασης  $^3O_2$ . Το οξυγόνο τριπλής κατάστασης είναι η συνηθισμένη κατάσταση που συναντάται. Το οξυγόνο μονής κατάστασης σχηματίζεται όταν τα δύο μονήρη ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Το μονήρες οξυγόνο διαθέτει ένα ελεύθερο εξωτερικό αντιδεσμικό τροχιακό και αυτό του προσδίδει έναν έντονα ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα. Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να αντιδράσει απευθείας με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Το μονήρες οξυγόνο επομένως είναι ένα υπόστρωμα που προωθεί τον σχηματισμό ριζών λιπαρών οξέων. Όσον αφορά το οξυγόνο τριπλής κατάστασης, αυτό διαθέτει στα εξωτερικά αντιδεσμικά τροχιακά του από ένα ηλεκτρόνιο με την ίδια φορά spin. Η κατάσταση αυτή είναι χαμηλή ενεργειακά και δεν μπορεί να γίνει απόσπαση ατόμου υδρογόνου. Ωστόσο, μπορεί να σχηματιστεί ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του οξυγόνου τριπλής κατάστασης και μιας ρίζας αλκυλίου. Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μιας νέας δραστικής ρίζας οξυγόνου, δηλαδή της ρίζας υπεροξειδίου ( $ROO^\bullet$ ). Η ρίζα αυτή είναι υψηλής ενέργειας και αποσπά εύκολα ένα άτομο υδρογόνου από ένα κοντινό λιπαρό οξύ. Επομένως σχηματίζεται ένα υδροϋπεροξειδίο λιπαρού οξέος ( $ROOH$ ) και μια νέα αλκυλική

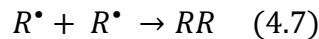
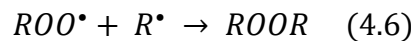
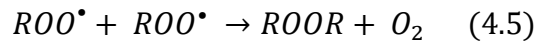


ρίζα. Η φάση της διάδοσης λοιπόν, προχωρά με επαναλαμβανόμενες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Τα βήματα δίνονται απλοποιημένα παρακάτω:



### 4.1.3 Τερματισμός

Στην φάση του τερματισμού οι δύο ρίζες ενώνονται για να σχηματίσουν μια μη δραστική ένωση. Στην περίπτωση περίσσειας οξυγόνου επικρατεί η ρίζα  $ROO^{\bullet}$  οπότε η αντίδραση τερματισμού δίνεται κυρίως από τις εξισώσεις (4.5), (4.6). Στην περίπτωση που τα επίπεδα του οξυγόνου είναι χαμηλά επικρατεί η ρίζα  $R^{\bullet}$  και η αντίδραση τερματισμού δίνεται από τις εξισώσεις (4.6) και (4.7) (Chaiyasit et al., 2007), (Fennema et al., 2007).

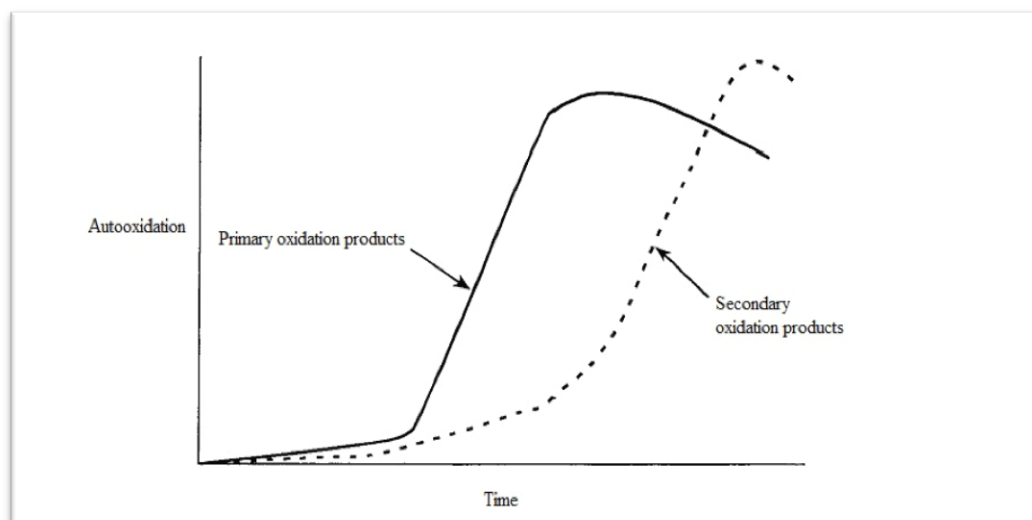


(Shahidi and Wanasundara, 2002).

## 4.2 Κινητική και προϊόντα

Η οξείδωση των λιπαρών εμφανίζει, αρχικά, μια φάση υστέρησης ακολουθούμενη από μια φάση εκθετικής αύξησης του ρυθμού της αντίδρασης. Στην φάση της υστέρησης η οξείδωση είναι αμελητέα και για αυτό επιδιώκεται η φάση αυτή να διαρκεί χρονικά όσο το δυνατόν περισσότερο. Αυτό επιτυγχάνεται με μείωση της θερμοκρασίας, με μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, μείωση της συγκέντρωσης των προοξειδωτικών και αύξηση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών. Μόλις ξεκινήσει η εκθετική φάση τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τα οποία οφείλονται για την ταγγή γεύση και οσμή, σχηματίζονται πολύ γρήγορα. Τα υδροϋπεροξειδία είναι τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης και παράγονται στη φάση της διάδοσης. Θεωρητικά, όταν τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων φτάσουν στη μέγιστη τιμή τους, αρχίζουν και διασπώνται σε δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης. Η πτώση των υδροϋπεροξειδίων παρατηρείται όταν ο ρυθμός σχηματισμού τους γίνει μικρότερος από τον ρυθμό της διάσπασής τους σε δευτερογενή προϊόντα. Επομένως, τα υδροϋπεροξειδία απαντώνται στα αρχικά στάδια της οξείδωσης και έπειτα κυριαρχούν τα προϊόντα διάσπασής τους. Η

κινητική των υδροϋπεροξειδίων και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης αναπαρίστανται στο Διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1: Θεωρητική ανάπτυξη πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης συναρτήσει του χρόνου (Frankel, 2005)**

Τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων διασπώνται προς μια ιδιαίτερα δραστική ρίζα αλκοξυλίου ( $RO\cdot$ ). Η ρίζα αυτή λόγω της υψηλής ενεργειακής της κατάστασης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μιας πολύ μεγάλης ποικιλίας προϊόντων όπως αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, υδρογονοάνθρακες και άλλα. Οι κατώτερες λιπαρές αλδεΐδες έχουν πολύ ισχυρή οσμή και γίνονται αντιληπτές σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Για αυτό συχνά τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί οξείδωση των λιπαρών τους σωμάτων αξιολογούνται από τους καταναλωτές ως απαράδεκτα, παραδείγματος χάρη, αποκαλούν κάποια μεταβολή στη γεύση ως ταγγίλα, ψαρίλα, μεταλλική γεύση ή γεύση χαρτιού ή μπαγιάτικη.

### 4.3 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα είναι ουσίες οι οποίες καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση των λιπαρών. Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε φυσικά και συνθετικά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον γιατί τα συνθετικά, αν και χρησιμοποιούνται ως μη τοξικά, έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση (Zheng & Wang 2001). Γνωστά φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες A,C και E, πολυφαινόλες, το λυκοπένιο το β-καροτένιο. Αντίστοιχα, ευρέως χρησιμοποιούμενα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι η βούτυλο-4-

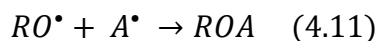
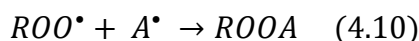
υδροξυανισόλη (BHA), το 2,6-Δι-βούτυλο-ρ-υδροξυτολουόλιο (BHT), εστέρες του γαλλικού οξέος και η τριτοταγής βουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ).

### 4.3.1 Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται στα πρωτεύοντα και τα δευτερεύοντα. Τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά διακόπτουν την οξειδωτική διαδικασία δεσμεύοντας τις σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες, ενώ τα δευτερεύοντα καθυστερούν την οξείδωση. Υπάρχουν όμως ουσίες οι οποίες εμφανίζουν και τους δύο μηχανισμούς δράσης για αυτό ονομάζονται αντιοξειδωτικά πολλαπλών λειτουργιών.

#### 4.3.1.1 Πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά

Τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά ή αντιοξειδωτικά- παρεμποδιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης, δεσμεύουν τις ρίζες που σχηματίζονται κατά τις φάσεις της έναρξης και της διάδοσης. Η δράση των αντιοξειδωτικών ως μέσα δέσμευσης ριζών φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:

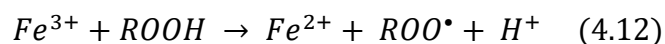


Τα αντιοξειδωτικά συνήθως περιέχουν μια φαινολική ομάδα. Στις αντιδράσεις 1 και 2 τα αντιοξειδωτικά δωρίζουν ένα κατιόν υδρογόνου στη ρίζα και μετατρέπονται τα ίδια σε ρίζες οι οποίες σταθεροποιούνται με δομές αρωματικού συντονισμού. Οι ρίζες αυτές πλέον, σε αντίθεση με τις υπερόξυ και αλκο-όξυ ελεύθερες ρίζες, είναι χαμηλότερης ενέργειας και δεν είναι ικανές να αφαιρέσουν ένα άτομο υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ και επομένως η οξείδωση των λιπαρών σωμάτων σταματά. Στην ιδανική περίπτωση ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να απενεργοποιήσει δύο ρίζες. Μία ρίζα αλκοξειδίου ή υπεροξειδίου δωρίζοντας ένα κατιόν υδρογόνου και μία ρίζα παρεμβαίνοντας το ίδιο όπως φαίνεται στις αντιδράσεις 3 και 4. Τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων 3 και 4 είναι σχετικά σταθερά και η οξείδωση σταματά σε μικρότερο μήκος αλυσίδας.

#### 4.3.1.2 Δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά

Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά ή προστατευτικά καθυστερούν την οξειδωτική διαδικασία αντιδρώντας με τα προ-οξειδωτικά ή με τα ενδιάμεσα προϊόντα οξείδωσης. Γνωστά προ-οξειδωτικά είναι τα στοιχεία μετάπτωσης σίδηρος και

χαλκός. Τα μέταλλα αυτά προωθούν την οξειδωση των λιπαρών λειτουργώντας ως εκκινητές, δηλαδή επισπεύδοντας τον σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου όπως φαίνεται στην αντίδραση (Fennema et al., 2007):

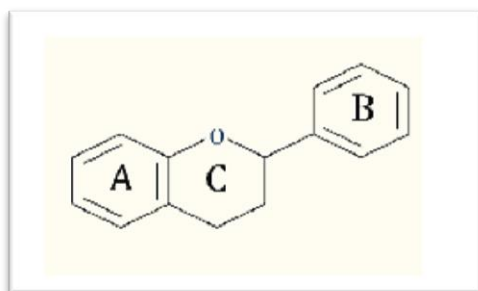


Η προ-οξειδωτική δράση εμποδίζεται από αντιοξειδωτικά τα οποία λειτουργούν ως χηλικοί παράγοντες. Χηλικοί παράγοντες είναι ενώσεις με δύο ή περισσότερα άτομα τα οποία μπορούν να σταθεροποιούν άτομα μετάλλων σχηματίζοντας δεσμούς με αυτά. Παραδείγματα χρησιμοποιούμενων χηλικών παραγόντων είναι το φωσφορικό, το τρυγικό, το ασκορβικό οξύ και το μηλικό.

### 4.3.2 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια κατηγορία πολύπλοκων οργανικών ενώσεων οι οποίες περιέχουν έναν ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους. Απαντώνται στους φυτικούς οργανισμούς ως μεταβολίτες και συμβάλλουν στην άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και της υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι πολυφαινολικές ενώσεις κατηγοριοποιούνται σε ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών τους δακτυλίων και τον τρόπο σύνδεσής τους (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια, λιγνάνες κλπ.)

Η πιο διαδεδομένη ομάδα πολυφαινολών στα τρόφιμα είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή διαθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους (A,B) οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο (C), όπως φαίνεται στην Εικόνα 7. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε έξι ομάδες ανάλογα με το είδος του ετεροκυκλικού δακτυλίου (φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και φλαβανόλες).



**Εικόνα 7: Δομή φλαβονοειδών** κόκκινο κρασί.

Πλούσιες πηγές πολυφαινολών είναι τα φρούτα, το τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές και το κακάο. Μάλιστα σε μια μελέτη του Lee et al. (2003), προέκυψε ότι το κακάο έχει περισσότερα πολυφαινολικά συστατικά και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από ότι το τσάι και το

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΚΑΚΑΟ**

Η σκόνη κακάο, όταν αποθηκεύεται σε ξηρές και δροσερές συνθήκες, χωρίς να ανοιχθεί έχει διάρκεια ζωής δύο έτη, ενώ με το άνοιγμα της συσκευασίας έχει διάρκεια ζωής ένα έτος. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ωστόσο η αποθήκευση σε μη κατάλληλες συνθήκες και κακή πρακτική χρήσης μπορούν να οδηγήσουν στην μικροβιακή ανάπτυξη ή επιμόλυνση. Επιπλέον, το κακάο περιέχει σε ποσοστό 20-22% ή 10-12% βούτυρο κακάο, το οποίο ως λίπος οξειδώνεται. Η οξείδωση αυτή αναμένεται στη σκόνη κακάο να είναι περιορισμένη λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε πολυφαινόλες, συστατικά όπως αναφέρθηκε με αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά και οι πολυφαινόλες σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης υπό υψηλές θερμοκρασίες μειώνονται σημαντικά (Wollgast et al. 2000). Ακολουθώς παρουσιάζονται οι μέθοδοι που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τη διερεύνηση των ενδεχόμενων αλλοιώσεων που υφίστανται τα δείγματα κακάο με την πάροδο του χρόνου.

### **5.1 Προσδιορισμός μικροβιακού φορτίου**

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μέθοδοι απαρίθμησης του μικροβιακού φορτίου. Στην παρούσα εργασία αξιοποιείται μία μέθοδος μέτρησης ζωντανών κυττάρων και συγκεκριμένα η αερόβια μέτρηση σε τρυβλία. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα μικροβιακά κύτταρα όταν βρεθούν σε άγαρ με τα απαραίτητα θρεπτικά υλικά σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αναφέρονται ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν Compact Dry έτοιμα αφυδατωμένα φιλμ σε τριβλία με καπάκι για την επιλεκτική ανάπτυξη των αποικιών των μικροοργανισμών.

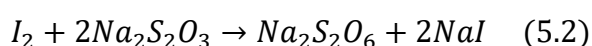
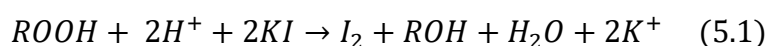
### **5.2 Προσδιορισμός οξειδωτικής κατάστασης**

Όπως αναφέρθηκε ήδη στην παράγραφο 3.2, όταν ξεκινήσει η οξείδωση αρχίζουν και συσσωρεύονται τα πρωτογενή προϊόντα, τα υδροϋπεροξειδία. Στην συνέχεια της οξειδωτικής διαδικασίας τα υδροϋπεροξειδία διασπώνται σε δευτερογενή προϊόντα π.χ. αλδεΐδες. Με τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτογενών και των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης μπορεί να προσδιοριστεί η οξειδωτική κατάσταση του λιπαρού σώματος. Στην συγκεκριμένη εργασία, η οξείδωση των λιπαρών παρακολουθείται με τον σχηματισμό πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης, των υδροϋπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου. Ο αριθμός υπεροξειδίων (peroxide value) ο οποίος εκφράζει την συγκέντρωση των υπεροξειδίων προσδιορίζεται με

ιωδομετρία και με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο θειοκυανικού σιδήρου. (Barriuso et al., 2013) (Shahidi et al., 2005)

### **5.2.1 Ιωδομετρικός προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων**

Ο ιωδομετρικός προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων βασίζεται στην ικανότητα των υδροϋπεροξειδίων να οξειδώνουν τα ιόντα ιωδίου. Η ιωδομετρική μέθοδος αποτελεί την πρότυπη μέθοδο για τον καθορισμό του αριθμού υπεροξειδίων. Πιο συγκεκριμένα, κορεσμένο διάλυμα ιωδιούχου καλίου προστίθεται στο δείγμα της λιπαρής ουσίας ώστε να αντιδράσει με τα υδροϋπεροξειδία. Έπειτα, το σχηματιζόμενο ιώδιο τιτλοδοτείται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου παρουσία δείκτη αμύλου. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:



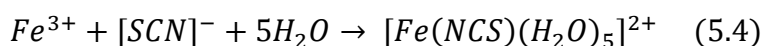
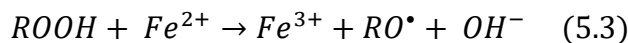
Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε χιλιοστοϊσοδύναμα οξυγόνου ανά κιλό δείγματος (milliequivalents/kg).

Παρόλο που η ιωδομετρία είναι η πρότυπη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των υπεροξειδίων, έχει αρκετά μειονεκτήματα. Απαιτεί αρκετό χρόνο και εντατική εργασία από το ανθρώπινο δυναμικό. Επίσης, καταναλώνει μεγάλες ποσότητες οργανικών αντιδραστηρίων, τα οποία ως απόβλητα χρήζουν ειδικής επεξεργασίας. Επιπρόσθετα των πρακτικών αυτών περιορισμών, στην μέθοδο αυτή εμφανίζονται δύο πιθανές παρεμβολές. Πρώτον, το σχηματιζόμενο ιώδιο  $I_2$  μπορεί να απορροφηθεί από τους ακόρεστους δεσμούς της λιπαρής ουσίας, προκαλώντας μείωση στον αριθμό υπεροξειδίων (PV). Δεύτερον, το ιόν ιωδίου ενδεχομένως να οξειδώνεται από το διαλυμένο οξυγόνο αυξάνοντας τον αριθμό υπεροξειδίων. Η ιωδομετρική μέθοδος, επίσης, έχει όριο ανίχνευσης 0.5 mEq peroxide/ kg δείγματος, από το οποίο η μέθοδος αυτή κρίνεται ότι έχει μικρή ευαισθησία. (Ruiz and Lendl, 2001, Dobarganes and Velasco, 2002) Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα και ότι η μέθοδος απαιτεί μεγάλη ποσότητα λιπαρής ουσίας, διαπιστώνεται η ανάγκη αξιοποίησης άλλων μεθόδων για τον προσδιορισμό του αριθμού των υπεροξειδίων. (Shahidi et al., 2005) (Sheb, 2012)

### **5.2.2 Φασματοφωτομετρική μέθοδος θειοκυανικού σιδήρου**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των υπεροξειδίων να οξειδώνουν τα δισθενή ιόντα σιδήρου σε τρισθενή ιόντα όταν το περιβάλλον είναι όξινο. Τα τρισθενή ιόντα σιδήρου συμπλοκοποιούνται με το θειοκυανικό ιόν και δίνουν μία έγχρωμη ένωση. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί αυτή η ένωση να προσδιοριστεί ποσοτικά

με φασματοφωτομετρία. Η απορρόφηση του συμπλόκου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων. Ο θειοκυανικός σίδηρος εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση ακτινοβολίας στα 500-510 nm. Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Ο προσδιορισμός του αριθμού των υπεροξειδίων με την μέθοδο του θειοκυανικού σιδήρου θεωρείται πιο απλός και πιο ευαίσθητος συγκριτικά με την πρότυπη ιωδομετρική μέθοδο. Οι παρεμβολές θεωρητικά είναι αμελητέες. Ειδικότερα, η παρεμβολή που οφείλεται στην οξείδωση του ιόντος ιωδίου από το διαλυμένο οξυγόνο στον διαλύτη είναι πολύ μικρής σημασίας στην περίπτωση της οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου. Βιβλιογραφικά, οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού υπεροξειδίων έχουν βρεθεί συσχετίσιμες. (Sheb, 2012)

### 5.2.3 Φασματοσκοπία Raman

Εξετάζεται, επίσης, αν το φάσμα Raman του βουτύρου κακάο μεταβάλλεται καθώς αλλοιώνονται τα λιπαρά του. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι εξαιτίας μεγάλου χρόνου αποθήκευσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας παρουσιάζονται μεταβολές στις χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζει το βούτυρο κακάο. Συγκεκριμένα στο εύρος των κυματάρθμων  $1800-1700 \text{ cm}^{-1}$  παρατηρείται μεταβολή στον σχηματισμό της κορυφής που αντιστοιχεί στην περιοχή του καρβονυλικού δεσμού (C=O). Συμπληρωματικά εξετάζονται οι δεσμοί C-C στο εύρος  $1200-1000 \text{ cm}^{-1}$ , C=C στα  $1660 \text{ cm}^{-1}$ , C-H στα  $3000-2700 \text{ cm}^{-1}$  και CH<sub>2</sub> στα  $1500-1250 \text{ cm}^{-1}$ . Οι βασικές αρχές τις φασματομετρίας Raman παρατίθενται στην παράγραφο 6.2. (Bresson et al., 2011)

## 5.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών

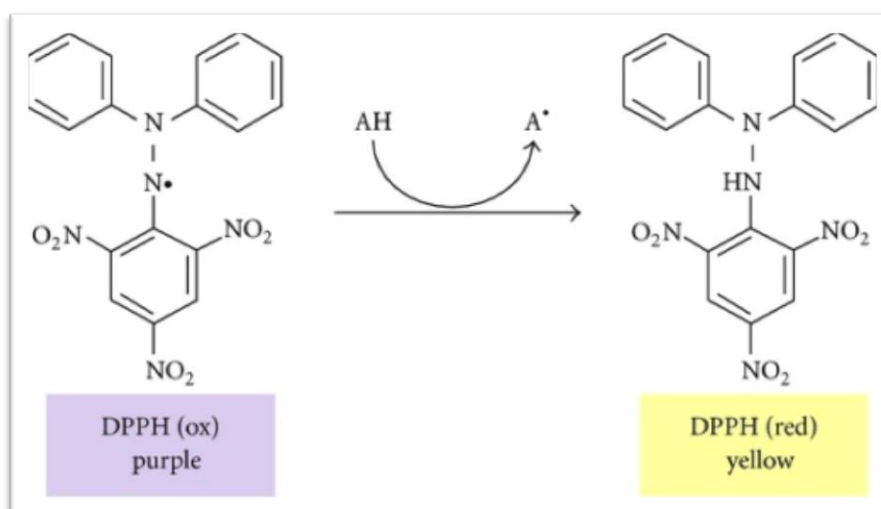
Πληθώρα μεθόδων προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπάρχει βιβλιογραφικά και αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα της σύστασης των εκχυλισμάτων. Ευρύτατα χρησιμοποιούνται φασματοφωτομετρικές μέθοδοι αλλά η ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών δεν είναι τόσο εύκολη γιατί η επιλογή ενός μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης δεν είναι εφικτή. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα έχουν προταθεί πολλές χρωματομετρικές αντιδράσεις στις οποίες η συγκέντρωση ενός χημικού στοιχείου ή ένωσης καθορίζεται με τη βοήθεια ενός χρωμοφόρου αντιδραστήριου. Ωστόσο, η έλλειψη μιας πρότυπης μεθόδου δημιουργεί πρόβλημα στην σύγκριση των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων. Οι μέθοδοι μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που



πραγματοποιείται. Υπάρχουν μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ατόμου του υδρογόνου και μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου.

### 5.3.1 Μέτρηση της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH•)

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH) αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για φυτικά δείγματα. Είναι μια ευαίσθητη, ακριβής και επαναλήψιμη μέθοδος η οποία προσδιορίζει την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μίγματος αντιοξειδωτικών. Βασίζεται στην ικανότητα που έχουν τα μίγματα αντιοξειδωτικών να αποχρωματίζουν το διάλυμα της ρίζας DPPH. Αναλυτικότερα, η ρίζα DPPH είναι μια σταθερή ρίζα η οποία αντιδρά με ενώσεις δότες ατόμου υδρογόνου και ανάγεται προς την αντίστοιχη υδραζίνη. Έτσι, όταν έρθει σε επαφή με αντιοξειδωτικά παίρνει ένα άτομο υδρογόνου και απενεργοποιείται. Το μεθανολικό διάλυμα της ρίζας αυτής έχει ένα έντονο μωβ χρώμα και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 515nm. Όταν όμως η ρίζα αυτή προσλάβει ένα άτομο υδρογόνου από κάποια αντιοξειδωτική ένωση το διάλυμά της αποχρωματίζεται και γίνεται κίτρινο και η απορρόφηση του στα 515nm μειώνεται (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης ρίζας DPPH με αντιοξειδωτική ένωση AH, απενεργοποίησής της και αποχρωματισμός του διαλύματός της**

Τα βασικά στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν την ανάμειξη διαλύματος αντιοξειδωτικού με το διάλυμα της ρίζας και καταγραφή της ελάττωσης της απορρόφησης περιοδικά ή μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα απενεργοποίησης των ελευθέρων ριζών (RSA) υπολογίζεται από τη σχέση:



$$\% RSA = 100 * \left(1 - \frac{A_E}{A_D}\right) \quad (5.5)$$

Όπου  $A_E$  η απορρόφηση του μίγματος της ρίζας με το εκχύλισμα του αντιοξειδωτικού και  $A_D$  η αντίστοιχη απορρόφηση του διαλύματος DPPH. Ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιείται το μέγεθος της δραστικής συγκέντρωσης, IC50, το οποίο περιγράφεται ως η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την μείωση στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης DPPH. Για να προσδιοριστεί κατασκευάζονται γραφήματα με το ποσοστό της εναπομένουσας ρίζας (REM%) ως προς την συγκέντρωση.

$$\%REM = 1 - \%RSA \quad (5.6)$$

### **5.3.2 Μέτρηση ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο**

#### ***Folin-Ciocalteu***

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου, χωρίς να το διαχωρίζει σε μονομερή, διμερή και μεγαλύτερα φαινολικά συστατικά. Είναι μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστήριου Folin- Ciocalteu με τις λειτουργικές υδρόξυομάδες των φαινολικών ενώσεων. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), φωσφο-βολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Η ανάμειξη του αντιδραστήριου αυτού με ένα διάλυμα φαινολικών συστατικών προκαλεί την οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ) χαρακτηριστικού μπλε χρώματος. Το μίγμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού ασβεστίου ( $Na_2CO_3$ ) προστίθεται για την ρύθμιση της αλακαλικότητας του μίγματος. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή εκλεκτικότητά της, καθώς η παρουσία αναγόντων σακχάρων, αμινοξέων και ασκορβικού οξέος παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό των φαινολικών ομάδων. (Παπώτη, 2009) (Agbor et al., 2014)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ – ΥΓΡΟΥ

Τις περισσότερες φορές η ανάλυση και ο προσδιορισμός ορισμένων συστατικών των τροφίμων προϋποθέτει τον διαχωρισμό των συστατικών από τις πρωτογενείς πηγές τους. Η εκχύλιση είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους διαχωρισμού. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η απομόνωση των λιπαρών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κακάο για την περαιτέρω μελέτη τους. Δηλαδή εξετάζεται η εκχύλιση ουσιών από μια στερεή πρώτη ύλη.

### 6.1 Γενικά στοιχεία εκχύλισης στερεού- υγρού

Η εκχύλιση στερεού- υγρού είναι μια διαδικασία διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά των διαλυμένων ουσιών από μια στερεή ύλη σε έναν διαλύτη. Το διάλυμα που προκύπτει καλείται εκχύλισμα. Από μηχανικής πλευράς, κατά την εκχύλιση μια σειρά από διαδοχικά στάδια μεταφοράς μάζας λαμβάνουν χώρα που περιλαμβάνουν:

- Τη διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μάζα
- Τη διαλυτοποίηση των ενώσεων
- Την κίνηση του διαλύματος από το εσωτερικό της στερεής μάζας στην επιφάνειά του
- Την μετακίνηση των εκχυλισμένων ενώσεων από την εσωτερική επιφάνεια του στερεού προς τον όγκο του διαλύματος
- Τον διαχωρισμό των επιθυμητών ενώσεων από τον διαλύτη.

Η απόδοση της εκχύλισης επηρεάζεται από τον διαλύτη και πιο συγκεκριμένα από την διαλυτότητα των ανακτούμενων συστατικών στον επιλεγμένο διαλύτη, την τοποθεσία των ενώσεων στη μάζα του στερεού, τη θερμοκρασία της εκχύλισης, την επιφάνεια και το πορώδες του στερεού υλικού, την αναλογία στερεού- υγρού το ιξώδες και τη ροή του διαλύτη. Μικρά μόρια παρουσιάζουν ευκολία και γρηγορότερο ρυθμό διάχυσης σε σύγκριση με μεγαλύτερα μόρια. Για αυτό τα υλικά προτού υποστούν εκχύλιση θρυμματίζονται και καταστρέφονται οι κυτταρικές τους δομές ώστε οι διαδρομές διάχυσης να είναι συντομότερες και να ευνοείται και η διαπερατότητα μεγαλύτερων μορίων (Aguilera et al., 2003). Το κακάο, ωστόσο, υπόκειται σε θρυμματισμό και άλεση κατά την παραγωγική του διαδικασία οπότε δεν απαιτείται αυτή η προεπεξεργασία για να εκχυλιστούν τα επιθυμητά συστατικά του.

## 6.2 Επιλογή διαλύτη

Όπως ήδη έχει σημειωθεί, η επιλογή του διαλύτη στην εκχύλιση είναι μείζονος σημασίας διότι η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από την διαλυτότητα των ανακτούμενων συστατικών στον επιλεγμένο διαλύτη. Η επιλογή του διαλύτη βασίζεται στους εξής εμπειρικούς κανόνες:

- Την επιλεκτικότητα του διαλύτη επί της διαλυτότητας του συνόλου των ενώσεων που επιδιώκεται να εκχυλιστούν.
- Την δυνατότητα απομάκρυνσης του διαλύτη από το τελικό εκχύλισμα
- Την δυνατότητα ανακύκλωσής του
- Ιδιότητες του διαλύτη όπως την επιφανειακή του τάση, το ιξώδες, την σταθερότητά του, να μην αντιδρά και να μην διαβρώνει τα συστατικά.

Η δυσδιαλυτότητα των λιπαρών σωμάτων στο νερό καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό τους από τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και άλλα πολικά συστατικά. Λόγω της υδροφοβικότητάς τους τα λιπαρά απομονώνονται με εκχύλιση με διαλύτες όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας και ο διμέθυλαιθέρας. Υπάρχουν όμως και λιπίδια τα οποία, λόγω κάποιων πολικών λειτουργικών ομάδων (π.χ. φωσφολιπίδια), απαιτούν τη χρήση πολικών διαλυτών. Ως εκ τούτου είναι κατανοητό ότι δεν υπάρχει ένας ενιαίος καθολικός διαλύτης για την εξαγωγή των λιπαρών σωμάτων.

Ανάλογα συμπεράσματα προκύπτουν και για την ανάκτηση αντιοξειδωτικών ουσιών. Τα αντιοξειδωτικά στο κακάο όπως και άλλα φυτικά αντιοξειδωτικά είναι δομικά μεταβλητές ενώσεις, οι οποίες διαφέρουν σε πολικότητες, με τις περισσότερες να είναι μετρίως διαλυτές στο νερό. Για αυτό τον λόγο, η χρήση οργανικών διαλυτών είναι αναπόφευκτη. Πιο συνηθισμένη είναι η χρήση υδατικών μειγμάτων μεθανόλης, αιθανόλης και ακετόνης για πολικά αντιοξειδωτικά και οξικός αιθυλεστέρας αξιοποιείται για την ανάκτηση μη πολικών αντιοξειδωτικών (Perez- Jimenez et al., 2008).

## 6.3 Τεχνικές εκχύλισης

Η πιο απλή εκχύλιση και συχνά χρησιμοποιούμενη από την βιομηχανία είναι η συμβατική εκχύλιση στερεού- υγρού, κατά την οποία πραγματοποιείται διαβροχή του δείγματος από τον διαλύτη εκχύλισης και ανάδευσή του σε αντιδραστήρες μη συνεχούς λειτουργίας (White et al., 2012). Αντίθετα σε εργαστηριακή κλίμακα, η πιο διαδεδομένη μεθοδολογία εκχύλισης είναι η εξαντλητική εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet. Στην εκχύλιση Soxhlet ο διαλύτης, ο οποίος βρίσκεται σε σφαιρική φιάλη, εξατμίζεται, με τη βοήθεια θερμαντικού μανδύα και ανέρχεται εντός τη συσκευής. Με την βοήθεια ψυκτήρα συμπυκνώνεται και έρχεται σε επαφή με το δείγμα σε ξεχωριστό θάλαμο, το θάλαμο εκχύλισης. Η διαδικασία εξάτμισης- συμπύκνωσης-

εκχύλισης επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί η πλήρης εκχύλιση. Παρόλα αυτά, οι δύο αυτές τεχνικές τείνουν να αντικατασταθούν από εναλλακτικές διεργασίες εκχύλισης με τις οποίες επιτυγχάνεται η μείωση του χρόνου εργασίας και του απαιτούμενου όγκου του διαλύτη που χρησιμοποιείται. Ανάμεσα στις καινοτόμες αυτές διεργασίες είναι η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα και η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους. Αυτές οι δύο τεχνικές αξιοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

### **6.3.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα**

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα χρησιμοποιείται για την απομόνωση και ανάκτηση ουσιών από υλικά φυτικής προέλευσης. Τα μικροκύματα έχουν συχνότητες που κυμαίνονται μεταξύ 300MHz και 300GHz, στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Οι συχνότητες αυτές χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση φυτικών ενώσεων μέσω του μηχανισμού της θέρμανσης. Αναλυτικότερα, τα μικροκύματα όταν εκπέμπονται διεισδύουν στα υλικά και αλληλεπιδρούν με τα πολικά μόρια δημιουργώντας θερμότητα. Η θερμότητα αυτή οφείλεται στην διπολική περιστροφή και την ιοντική αγωγιμότητα. Ένα πολικό μόριο όταν ακτινοβολείται με μικροκύματα αλλάζει τον προσανατολισμό του περίπου  $10^9$  φορές το δευτερόλεπτο, με αποτέλεσμα να επικρατεί ένα χάος στο εσωτερικό του συστήματος, το υλικό να γίνεται ευπαθές και έτσι να προκαλείται διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό διευκολύνει την εκρόφιση των επιθυμητών συστατικών από το υπόστρωμα. Η πρώτη ύλη που εκχυλίζεται θερμαίνεται ομοιόμορφα γιατί η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διεισδύει στους ιστούς και αποδεσμεύει τα συστατικά, χωρίς τις απώλειες ενέργειας που συναντώνται στην θέρμανση με αγωγή (Παπαδάκη, 2013).

Η επίδραση των μικροκυμάτων είναι έντονα εξαρτώμενη από την διηλεκτρική ευαισθησία τόσο του διαλύτη όσο και του προς εκχύλιση μέσου. Πιο συγκεκριμένα, η διηλεκτρική σταθερά αποτελεί ένδειξη της πολικότητας ενός μορίου στο ηλεκτρικό πεδίο. Συνήθως όσο υψηλότερη είναι η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη τόσο υψηλότερος είναι και ο βαθμός απορρόφησης των μικροκυμάτων, καθώς τα μόρια του διαλύτη απορροφούν την ενέργεια των μικροκυμάτων και πολώνονται. Η μεγαλύτερη απορρόφηση της ενέργειας των μικροκυμάτων οδηγεί σε μεγαλύτερο ρυθμό θέρμανσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, αν οι προς εκχύλιση ουσίες είναι ευαίσθητες στη θέρμανση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης με μικρή διηλεκτρική σταθερά ώστε η θερμοκρασία του διαλύτη να μην αυξηθεί πολύ και να μην υποστούν θερμική αποδόμηση οι ουσίες στόχοι. Σε αυτήν την περίπτωση η ενέργεια των μικροκυμάτων αλληλεπιδρά μόνο με το φυτικό υπόστρωμα καταλήγοντας σε ικανοποιητική απελευθέρωση των φυτικών συστατικών στον λιγότερο πολικό διαλύτη (Kaufmann et al.,2007). Η εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων ακολουθεί τις ίδιες αρχές διαβροχής και διάλυσης, όμως αλλάζει η

ταχύτητα διάλυσης εντός των φυτικών ιστών η οποία είναι μεγαλύτερη. Έτσι, μειώνεται ο χρόνος επεξεργασίας και κυρίως ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος αποσύνθεσης και οξείδωσης των φυτικών συστατικών. Με άλλα λόγια, μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης υποβαθμίζουν τα συστατικά εξαιτίας θερμικών, οξειδωτικών και άλλου τύπου αποικοδομήσεων. Η εκχύλιση με μικροκύματα διαρκεί πολύ λιγότερο χρόνο και παράγει καλής ποιότητας εκχυλίσματα.

### **6.3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους**

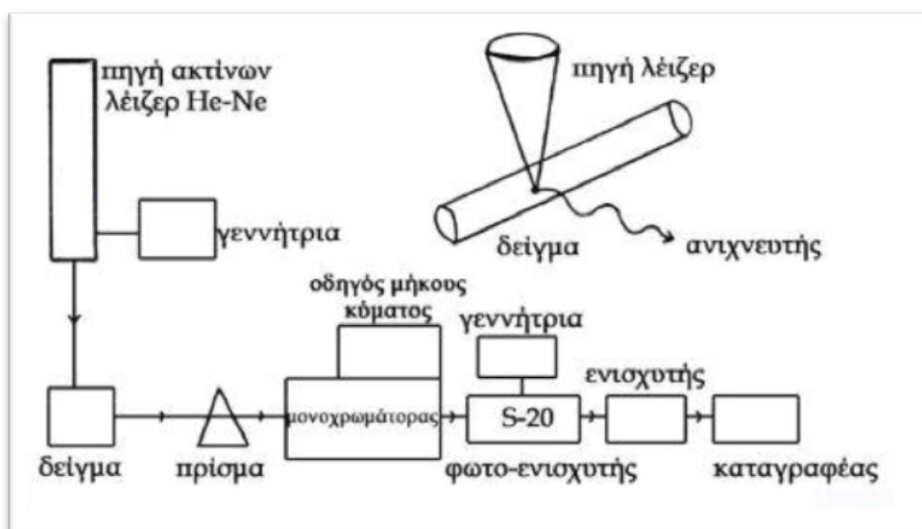
Κατά την εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιούνται ακουστικά κύματα στο εύρος των kilohertz ώστε να διαταράξουν το σύστημα μήτρας- διαλύτη και να διευκολύνουν την απελευθέρωση των επιθυμητών ενώσεων. Όταν το στερεό υλικό βομβαρδίζεται με υπερήχους δημιουργείται ένα διαμήκες κύμα το οποίο διαταράσσει τα σωματίδια και προάγει τη μεταφορά μάζας. Ο μηχανισμός της εκχύλισης περιλαμβάνει δύο ειδών φυσικά φαινόμενα. Τον εμποτισμό της φυτικής πρώτης ύλης από τον διαλύτη με σκοπό τη διάχυση αυτού στο εσωτερικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και την έκπλυση των συστατικών όταν τα φυτικά τοιχώματα διαρρηχθούν. Επομένως η μεταφορά ουσιών στόχων περιλαμβάνει φαινόμενα διάχυσης και ώσμωσης (Chemat et al. 2009). Όταν ο διαλύτης προσβάλλεται από υπερήχους δημιουργούνται μικροφουσαλίδες σπηλαίωσης. Οι φουσαλίδες αυτές διαρρηγνύονται με ταχείς ρυθμούς όταν η ακουστική πίεση είναι αρκετά υψηλή. Η διάρρηξη συντελεί στη δημιουργία μικροπιδάκων και την πρόκληση αλλαγών στη δομή στις φυτικής πρώτης ύλης. Η εκχύλιση με υπερήχους έχει χαμηλό κόστος εξοπλισμού και λειτουργίας και καθιστά την εκχύλιση στερεού υγρού ταχύτερη και αποδοτικότερη. Είναι, τέλος, κατάλληλη για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών αφού είναι δυνατή η ελάττωση της θερμοκρασίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αξιοποίηση ενόργανων τεχνικών ανάλυσης έναντι κλασικών μεθόδων χημικής ανάλυσης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, μεταξύ άλλων τον μικρό χρόνο ανάλυσης, την απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος, τη μεγάλη ευαισθησία, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι μοριακής φασματομετρίας: η φασματομετρία Raman και η υπεριώδης και ορατή φασματομετρία.

### 7.1 Φασματομετρία Raman

Η φασματομετρία Raman βασίζεται στη σκέδαση ενός μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πάνω στα μόρια του υλικού προς ανάλυση και στη μετατόπιση ενός μικρού κλάσματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η μετατόπιση αυτή συμβαίνει λόγω της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με τα μόρια και της διέγερσης των δονητικών τους ενεργειακών επιπέδων, η οποία εξαρτάται από τη χημική δομή των μορίων που προκαλούν σκέδαση. Κάθε χημικό είδος λοιπόν, δίνει το δικό του χαρακτηριστικό δονητικό φάσμα Raman, το οποίο μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό του προσδιορισμό. Γενικά, το φάσμα ενός είδους επηρεάζεται ελάχιστα από την ανάμιξη του με άλλα είδη. Τα εξαρτήματα που απαρτίζουν ένα φασματόμετρο Raman είναι τα εξής: 1) πηγή ακτινοβολίας συνήθως ακτίνες λέιζερ, 2) κυψελίδα ή πλακίδια από γυαλί ή χαλαζία για το δείγμα, 3) σύστημα καθρεπτών, 4) μονοχρωμάτορας, 5) φωτοηλεκτρικός ανιχνευτής, 6) σύστημα ενίσχυσης και 7) σύστημα καταγραφής H/Y. Τα εξαρτήματα ενός φασματόμετρου Raman απεικονίζονται στην εικόνα 9.



**Εικόνα 9: Διαγραμματική παρουσίαση της διαμόρφωσης των εξαρτημάτων ενός φασματόμετρου Raman**

Λόγω του ότι η φασματομετρία Raman καλύπτει όλη την υπέρυθρη περιοχή από 3600 έως  $10\text{cm}^{-1}$ , παρέχει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες και την ταυτοποίηση ολόκληρου του μορίου. Η φασματομετρία Raman χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα και μπορεί να γίνει παρακολούθηση επί τόπου μεταβολών δομής στα μόρια πρωτεϊνών, πεπτιδίων σε λιπαρά και άλλα. (Όξενκιουν (1987))

## 7.2 Υπεριώδης και Ορατή φασματομετρία

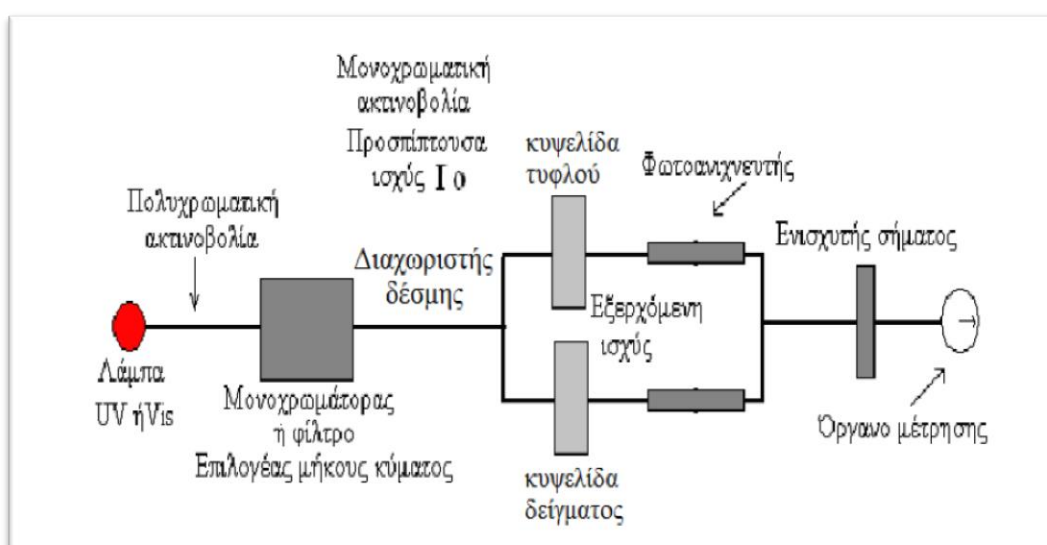
Στην UV-Vis φασματομετρία απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από 190-800 nm από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Τα ορατά και υπεριώδη φάσματα μιας ένωσης δίνουν πληροφορίες για ορισμένες ομάδες ατόμων μέσα στο μόριο. Συγκεκριμένα, οι ομάδες αυτές είναι είτε δραστικές ομάδες με μη δεσμικά ηλεκτρόνια σθένους, ή ακόρεστοι δεσμοί. Ενώσεις που έχουν αυτές τις ομάδες ατόμων μετρούνται στη φασματομετρία UV-Vis ποσοτικά με μεγάλη ακρίβεια σύμφωνα με τον νόμο του Lambert-Beer:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \varepsilon * b * c \quad (7.1)$$

Όπου, A: απορρόφηση ή οπτική πυκνότητα,  $I_0$ : ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I: μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, T: διαπερατότητα (το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα), c: συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας, b: πάχος κυψελίδας, ε: μοριακή απορροφητικότητα ή

μοριακός συντελεστής απόσβεσης. Τόσο το  $b$  όσο και το  $\epsilon$  είναι σταθερές, οπότε η απορρόφηση είναι ανάλογη του  $A$ .

Τα ουσιώδη εξαρτήματα ενός φασματόμετρου απορρόφησης είναι: 1) η σταθερή πηγή ακτινοβολίας, 2) το σύστημα φακών/ καθρεπτών/ σχισμών που ρυθμίζουν την ένταση της πηγής, ευθυγραμμίζουν και εστιάζουν τη δέσμη, 3) ο μονοχρωμάτορας για την ανάλυση της ακτινοβολίας σε επί μέρους μήκη κύματος ή σε ζώνες μηκών κύματος, 4) η διαφανής κυψελίδα για το δείγμα, 5) ο ανιχνευτής ακτινοβολίας (φωτοκύτταρο ή φωτοπολλαπλασιαστής κ.λπ.), 6) μονάδα επεξεργασίας και ανάγνωσης σήματος σε οθόνη Η/Υ. Τα εξαρτήματα αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 10 για UV-Vis φασματόμετρο διπλής δέσμης (Οξενκιουν, 1987).



**Εικόνα 10: Διαγραμματική παρουσίαση της διαμόρφωσης των εξαρτημάτων ενός UV-Vis φασματόμετρου.**





### III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

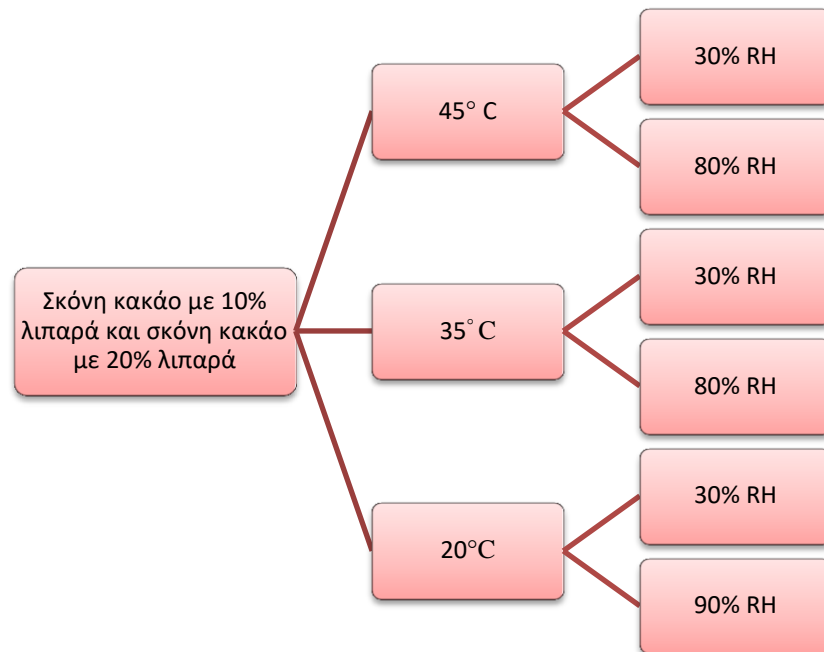
#### i. Εισαγωγή

Το κακάο είναι ένα τρόφιμο το οποίο συμπεριλαμβάνεται στην καθημερινή διατροφή πολλών ανθρώπων, καταναλώνοντάς το είτε ως ρόφημα είτε, κυρίως, ως συστατικό σοκολατένιων σνακ. Είναι γνωστό ότι η διάρκεια ζωής του υπερβαίνει τον έναν χρόνο και για αυτό λίγες έρευνες έχουν διεξαχθεί σχετικά με την διατηρησιμότητά του. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της αλλοίωσης της σκόνης κακάο υπό ρεαλιστικές και επιταχυνόμενες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν σκόνη κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά και σκόνη με 10% λιπαρά κατά τη διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος τριών μηνών. Στο διάστημα αυτό ελέγχθηκε η μικροβιολογική σταθερότητα των σκονών, παρακολούθηθηκε η οξείδωση των λιπαρών τους και προσδιορίστηκε η μεταβολή της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας καθώς και του συνολικού φαινολικού φορτίου τους. Η έρευνα αυτή βασίστηκε σε ενόργανες και κλασικές μεθόδους ανάλυσης. Τέλος, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των εξεταζόμενων αυτών μεταβλητών, δηλαδή της μικροβιακής ανάπτυξης, της οξειδωτικής κατάστασης και της παρουσίας συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας και στα εργαστήρια Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

#### ii. Πειραματικός σχεδιασμός

Δύο προϊόντα σκόνης κακάο, ένα με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά και ένα με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, χορηγήθηκαν από την ION A.E.. Μελετήθηκε η αλλοίωση των σκονών κακάο σε έξι διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Αναλυτικότερα, ποσότητα από κάθε σκόνη αποθηκεύτηκε στους 20, 35 και 45° C και σε κάθε θερμοκρασία αντιστοιχούσε ένα περιβάλλον υψηλής και ένα περιβάλλον χαμηλής υγρασίας. Έτσι, προέκυψαν δώδεκα διαφορετικά δείγματα, δηλαδή έξι δοχεία τα οποία περιείχαν ποσότητα από τις δύο σκόνες σε διαφορετικούς χώρους και υπόκεινται στις συνθήκες του Γραφήματος 1. Σε προκαθορισμένους χρόνους αποθήκευσης πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και συγκεκριμένα στις 0,7,15,30,60 και 90 ημέρες από την έναρξη της μελέτης. Κατά αυτόν τον τρόπο εξετάστηκαν συνολικά 62 δείγματα. Αρχικά, στα δείγματα αυτά έγινε, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, μικροβιακή ανάλυση. Επιπλέον, αφού απομονώθηκαν τα λιπαρά σώματα με εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, προσδιορίστηκε σε αυτά η οξειδωτική τους κατάσταση. Επίσης, απομονώθηκαν τα αντιοξειδωτικά συστατικά με

εκχύλιση με υπέρηχους και εξετάστηκε η διαφορά της αντιοξειδωτικής δράσης μεταξύ των σκονών κακάο με 10% και 20% περιεκτικότητα σε λιπαρά κατά την έναρξη της μελέτης και κατά την ολοκλήρωσή της. Επίσης, προσδιορίστηκε η διαφορά του συνολικού φαινολικού φορτίου δειγμάτων κακάο 20% σε λιπαρά μεταξύ της αρχής και το τέλος της μελέτης. Τα δείγματα σκονών κακάο που αξιοποιήθηκαν για την μελέτη των αντιοξειδωτικών και του φαινολικού φορτίου ήταν αυτά που είχαν αποθηκευτεί στην ακραία θερμοκρασία των 45°C.



**Γράφημα 1: Συνθήκες αποθήκευσης σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά και σκόνης κακάο με 20% σε λιπαρά**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>: ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΚΟΝΩΝ ΚΑΚΑΟ

Το πρώτο βήμα για την μελέτη της γήρανσης των σκονών κακάο είναι η αποθήκευσή τους στις επιθυμητές συνθήκες οι οποίες παρουσιάζονται στο Γράφημα 1, αφού πρώτα αποστειρωθούν όλα τα σκεύη. Η διαμόρφωση της σχετικής υγρασίας στα προκαθορισμένα επίπεδα γίνεται με την χρήση κορεσμένων αλάτων.

### 8.1 Υλικά

Άλατα:

1. Ένυδρο Χλωριούχο Μαγνήσιο ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )
2. Χλωριούχο Κάλιο (KCl)
3. Βρωμιούχο Κάλιο (KBr)
4. Νιτρικό Κάλιο ( $KNO_3$ )

### 8.2 Εξοπλισμός

- Ζυγός
- Nüve MN 090 Microbiological Safety Cabinet
- Θερμοστάτης Elvem
- Θάλαμος γήρανσης Climatic Test Cabinet, Nüve
- Έξι πλαστικά δοχεία αποθήκευσης
- Έξι μικρά γυάλινα δοχεία για τα άλατα
- Αλουμινόχαρτο

### 8.3 Διαδικασία

Προτού πραγματοποιηθεί η αποθήκευση των σκονών κακάο στις συνθήκες του Γραφήματος 1, παρασκευάζονται υπέρκορα διαλύματα αλάτων με τα οποία επιτυγχάνεται η ρύθμιση της επιθυμητής σχετικής υγρασίας εντός του κάθε δοχείου. Για να είναι υπέρκορα διαλύεται σε απιονισμένο νερό ποσότητα άλατος 30% μεγαλύτερη από την διαλυτότητα του στην εκάστοτε θερμοκρασία. Τα άλατα που επιλέχθηκαν καθώς και η διαλυτότητά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5: Τα άλατα που αξιοποιούνται για την επίτευξη της επιθυμητής σχετικής υγρασίας και οι διαλυτότητές τους**

Συνθήκες αποθήκευσης		Διάλυμα άλατος	Διαλυτότητα (g/ 100 mL)
Θερμοκρασία (°C)	Σχετική υγρασία %		
25	30	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	165
25	90	KNO <sub>3</sub>	48
35	30	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	167
35	80	KBr	76
45	30	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	169
45	80	KCl	43

Η αποθήκευση των δειγμάτων κακάο πραγματοποιείται στον απαγωγό μικροβιολογικής ασφάλειας Nüve MN 090 (Microbiological Safety Cabinet), ο οποίος φαίνεται στην Εικόνα 12, ώστε να μην επιμολυνθούν τα δείγματα κακάο με μικροοργανισμούς από τον περιβάλλοντα χώρο. Κατασκευάζονται από αλουμινόχαρτο δύο θήκες για κάθε πλαστικό δοχείο. Τα πλαστικά δοχεία, με τις θήκες από αλουμινόχαρτο, και τα γυάλινα δοχεία με τα άλατα εκτίθενται για 15 λεπτά στο φως λάμπας UV, εξάρτημα που διαθέτει ο συγκεκριμένος απαγωγός με σκοπό την αποστείρωσή τους. Έπειτα η μία θήκη κάθε δοχείου πληρώνεται με κακάο περιεκτικότητας 10-12% σε λιπαρά και η άλλη με κακάο 20-22% σε λιπαρά, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 11. Στο κάθε δοχείο τοποθετείται και το κατάλληλο δοχείο με το διάλυμα άλατος. Δύο δοχεία (ένα με 30% σχετική υγρασία και ένα με 80%) αποθηκεύονται στον θερμοστάτη Elvem ο οποίος λειτουργεί στους 45° C, δύο αντίστοιχα δοχεία αποθηκεύονται στον θάλαμο γήρανσης Nüve ο οποίος λειτουργεί στους 35° C, ενώ τα δύο δοχεία που πρέπει να τοποθετηθούν στους 20° C φυλάγονται στο ράφι του εργαστηρίου.



**Εικόνα 11: Πλαστικό δοχείο στο οποίο έχουν αποθηκευτεί η σκόνη κακάο με 10% περιεκτικότητα σε λιπαρά και η σκόνη με 20%.**



**Εικόνα 12:** Απαγωγός μικροβιολογικής ασφάλειας, Nüve

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9<sup>ο</sup>: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιείται για κάθε ένα από τα δώδεκα δείγματα ( 6 συνθήκες αποθήκευσης \* 2 περιεκτικότητες σκόνης κακάο σε λιπαρά) τις προκαθορισμένες ημερομηνίες δειγματοληψίας, δηλαδή σε χρόνο 0,7,15,30,60,90 ημερών από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Κάθε φορά μετράται το συνολικό μεσοφιλικό αερόβιο μικροβιακό φορτίο και αν εντοπιστούν αποικίες τότε εξετάζονται και οι επιμέρους μικροοργανισμοί. Προηγείται της μικροβιακής ανάλυσης η επεξεργασία του δείγματος λόγω του σκούρου καφέ χρώματος του κακάο, ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση των αποικιών οπτικά.

### 9.1 Υλικά

- Ringer tablet, Merck code 1.15525, Darmstadt, Germany
- Compact Dry, αφυδατωμένα φιλμ θρεπτικού υλικού, HYSERVE GMBH & CO

### 9.2 Εξοπλισμός

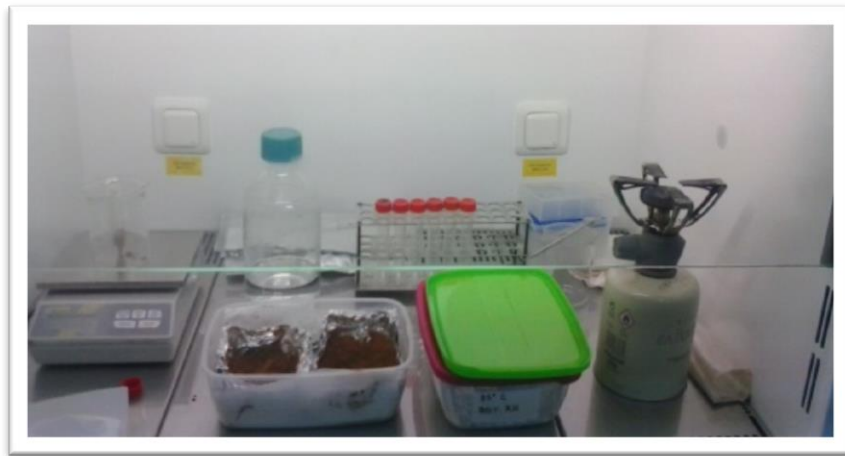
- Απαγωγός μικροβιολογικής ασφάλειας (Nüve MN 090 Microbiological Safety Cabinet)
- Ζυγός (Kern 440)
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex)
- Συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer, Interscience)
- Φυγόκεντρος Nüve
- Πιπέτα
- Μετρητής αποικιών (Selecta Digital Colony Counter)
- Αυτόκλειστο δοχείο

### 9.3 Διαδικασία

#### 9.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα Ringer, διαλύοντας μία ταμπλέτα σε 1L απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αυτό μαζί με όλα τα σκεύη που πρόκειται να αξιοποιηθούν στην ανάλυση αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο δοχείο για μισή ώρα. Η περαιτέρω διαδικασία πραγματοποιείται εντός του απαγωγού μικροβιολογικής ασφάλειας Nüve MN 090 και δίπλα σε λύχνο ώστε να εξασφαλιστούν ασηπτικές

συνθήκες. Η δειγματοληψία από νέο δείγμα απαιτεί κάθε φορά τον καθαρισμό της λαβίδας με αιθανόλη και το πέρασμά της από φλόγα (ανάφλεξη), (Εικόνα 13). Έπειτα λαμβάνεται 1g σκόνης κακάο από κάθε ένα από τα 12 δείγματα και προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 9g διαλύματος Ringer (αραίωση 1/10). Ο σωλήνας αναδεύεται σε συσκευή Vortex. Κατόπιν το περιεχόμενο του εισάγεται σε αποστειρωμένη σακούλα και οδηγείται στη συσκευή ομογενοποίησης BagMixer όπου παραμένει για 60s. Στην Εικόνα 14 παρουσιάζονται η συσκευή ομογενοποίησης και η συσκευή ανάδευσης Vortex. Με την ομογενοποίηση το μικροβιακό φορτίο του δείγματος διαχέεται στον ορό Ringer. Το διάλυμα κακάο- Ringer επανεισάγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Τέλος, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στα 2500rpm.



**Εικόνα 13: Μικροβιολογική ανάλυση στον απαγωγό μικροβιακής ασφάλειας**



**Εικόνα 14: Η συσκευή ομογενοποίησης BagMixer και η συσκευή ανάδευσης Vortex**



### 9.3.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με τη χρήση έτοιμων αφυδατωμένων φιλμ θρεπτικού υλικού μέσα σε πλαστικό τρυβλίο με καπάκι (Εικόνα 15). Τα φιλμ αυτά περιέχουν θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη συγκεκριμένων μόνο μικροοργανισμών. Οι αποικίες που εξετάζονται είναι:

- Συνολικό μεσοφιλικό αερόβιο μικροβιακό φορτίο
- Ζύμες και μούχλες
- Escherichia coli
- Salmonella

Αφού πραγματοποιηθεί η προετοιμασία του δείγματος, λαμβάνεται 1mL δείγματος από το υπερκείμενο υγρό για κάθε εξεταζόμενη αποικία και απλώνεται στο αντίστοιχο τρυβλίο. Εξαίρεση αποτελεί η Salmonella, το τρυβλίο της οποίας απαιτεί 0,1mL δείγματος και 0,9mL διαλύματος Ringer, τα οποία τοποθετούνται αντιδιαμετρικά. Στη συνέχεια, τα τρυβλία τοποθετούνται σε αποστειρωμένες σακούλες και αποθηκεύονται σε κατάλληλη θερμοκρασία για καθορισμένο χρονικό διάστημα (Εικόνα 17). Η θερμοκρασία αποθήκευσης και το διάστημα αυτό παρέχονται από τον προμηθευτή και φαίνονται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6: Ποσότητα δείγματος, θερμοκρασία και διάστημα επώασης για την ανάπτυξη των επιλεγμένων μικροοργανισμών**

Μικροοργανισμός	Ποσότητα δείγματος (mL)	Θερμοκρασία ( $\pm 2$ °C) επώασης	Διάστημα
Συνολικό αερόβιο φορτίο	1	35	48-72 ώρες
Ζύμες και μούχλες	1	30	3-7 ημέρες
E. coli	1	37	24 ώρες
Salmonella	0.1	41	24 ώρες

Με το πέρας του απαραίτητου χρόνου επώασης μετρώνται οι αποικίες σε ψηφιακό μετρητή αποικιών.



**Εικόνα 15:** Αποστειρωμένα τρυβλία με ξηρό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη του ολικού μικροβιακού φορτίου

**Εικόνα 16:** Αποικίες μικροοργανισμών



**Εικόνα 17:** Αποθήκευση τρυβλίων σε φούρνο ο οποίος λειτουργεί στη θερμοκρασία επώασης

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10<sup>ο</sup>: ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ**

Για να μελετηθεί η οξειδωτική κατάσταση του βουτύρου κακάο που περιέχεται στις αποθηκευμένες σκόνες κακάο είναι απαραίτητο να απομονωθεί από τα υπόλοιπα συστατικά. Για αυτό το λόγο εφαρμόζεται μια διαδικασία εκχύλισης με μικροκύματα στα 62 δείγματα κακάο ώστε να σχεδιαστούν κατόπιν και γραφήματα της οξειδωτικής κατάστασης ως προς τον χρόνο.

### **10.1 Απομόνωση λιπαρών**

Η εκχύλιση των λιπαρών γίνεται με πετρελαϊκό αιθέρα υποβοηθούμενη με μικροκύματα.

#### **10.1.1 Υλικά**

- Πετρελαϊκός αιθέρας

#### **10.1.2 Εξοπλισμός**

- Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China)
- Δοχείο εκχύλισης τριών στομιών
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Φυγόκεντρος Nüve
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi Rotavapor R-200)
- Αντλία υψηλού κενού
- Σφαιρική φιάλη
- Ογκομετρικός κύλινδρος

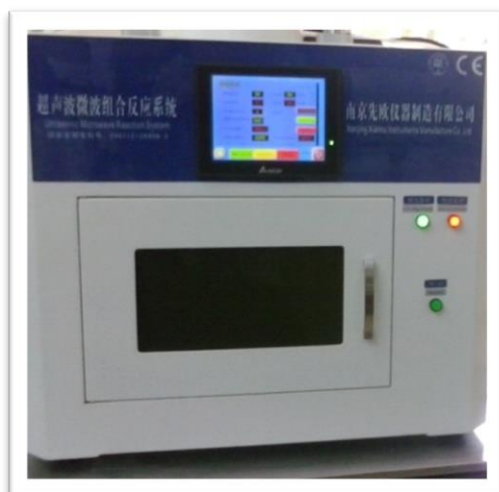
#### **10.1.3 Διαδικασία**

Στην περίπτωση της σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20-22% σε λιπαρά, ζυγίζονται 6g κακάο εντός του δοχείου εκχύλισης και προστίθενται 70mL πετρελαϊκού αιθέρα. Στην περίπτωση της σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10-12% σε λιπαρά, ζυγίζονται 12g κακάο και προστίθενται 90mL πετρελαϊκού αιθέρα. Το δοχείο εκχύλισης τοποθετείται στη συσκευή εκχύλισης και σε αυτό εισάγονται οι δύο υποδοχείς του οργάνου: ένας που καταγράφει και ρυθμίζει τη θερμοκρασία και ένας που περιορίζει την εξάτμιση του διαλύτη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 18. Έπειτα πραγματοποιείται η εκχύλιση με μικροκύματα στους 40°C, στα 250W υπό μαγνητική ανάδευση στα 250rpm. Η διαδικασία της εκχύλισης διαρκεί 30min. Μόλις ολοκληρωθεί, το εκχύλισμα, δηλαδή ο πετρελαϊκός αιθέρας με τα λιπαρά, διαχωρίζεται από το κακάο

με φυγοκέντρηση. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στα 2500rpm για 10min. Το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρησης οδηγείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Η φιάλη συνδέεται με τον περιστροφικό εξατμιστήρα και τοποθετείται μέσα σε λουτρό στους 28°C (Εικόνα 20). Η εξάτμιση λαμβάνει χώρα υπό χαμηλή πίεση, περίπου 300mbar και ολοκληρώνεται όταν φαίνεται να έχει απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του διαλύτη από την σφαιρική φιάλη. Το έλαιο που απομένει είναι τα λιπαρά του κακάο και παραλαμβάνονται από την σφαιρική φιάλη για την ανάλυση της οξειδωτικής τους κατάστασης.



**Εικόνα 18: Δοχείο εκχύλισης με κακάο και πετρελαϊκό αιθέρα εντός της συσκευής εκχύλισης με μικροκύματα**



**Εικόνα 19: Συσκευή εκχύλισης**



**Εικόνα 20: περιστροφικός εξατμιστήρας**

Η οξειδωτική κατάσταση των αποθηκευμένων δειγμάτων παρακολουθείται προσδιορίζοντας τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης δηλαδή τα υπεροξειδία. Ο αριθμός των υπεροξειδίων κατά το χρονικό διάστημα των τριών μηνών ελέγχεται με την ιωδομετρική μέθοδο και γίνεται προσπάθεια να αξιοποιηθεί η φασματομετρική μέθοδος του θειοκυανικού σιδήρου. Επίσης εξετάζεται η μεταβολή του φάσματος Raman κατά την έναρξη της αποθήκευσης και κατά την ολοκλήρωση της μελέτης. Στην συνέχεια περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μελέτη της αλλοίωσης του βουτύρου κακάο.

## **10.2 Ιωδομετρικός προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων**

Όπως έχει ήδη σημειωθεί στην παράγραφο 4.2.1, ο ιωδομετρικός προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων βασίζεται στην ογκομέτρηση του παραγόμενου ιωδίου ( $I_2$ ) κατά την οξείδωση ιόντων ιωδίου ( $I^-$ ) από τα υδροϋπεροξειδία. Ο ιωδομετρικός προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων είναι μια πρότυπη μέθοδος του American Oil Chemists' Society (AOCS) (ISO 3960, 2001) ωστόσο στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται τροποποιημένη λόγω της μεγάλης ποσότητας ελαίου που απαιτεί. Πιο συγκεκριμένα, η πρότυπη μέθοδος χρειάζεται 5g ελαίου, η παραλαβή όμως 5g βουτύρου κακάο με τον δεδομένο εξοπλισμό ήταν ακόμη πιο δαπανηρή και χρονοβόρα. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στη συνέχεια.

### **10.2.1 Αντιδραστήρια**

- Διάλυμα Οξικού οξέος- Χλωροφόρμιο 3:2 ( $CH_3COOH-CHCl_3$ )
- Κορεσμένο διάλυμα Ιωδιούχου Καλίου (KI)
- Θειοθειικό Νάτριο 0.01N ( $Na_2S_2O_3$ )
- Διάλυμα αμύλου 1%
- Βορικό οξύ
- Απεσταγμένο νερό

### **10.2.2 Όργανα- Συσκευές**

- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Κωνική φιάλη 300 mL
- Δύο ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 mL
- Προχοΐδα των 25 mL
- Δύο σιφώνια του 1 mL
- Πουάρ
- Ποτήρια ζέσης 50 και 250 mL
- Λύχνος, σωλήνες, μεταλλικό πλέγμα

### 10.2.3 Διαδικασία

*Προετοιμασία διαλυμάτων:*

- Παρασκευή διαλύματος αμύλου:

Σε ποτήρι ζέσης των 50mL προστίθενται 2.5 g αμύλου και πληρώνεται με απιονισμένο νερό. Με ραβδί ανακατεύεται καλά. Σε ποτήρι ζέσης των 250 mL εισάγονται 200 mL νερού και θερμαίνονται μέχρι βρασμού. Μόλις το νερό φτάσει στη θερμοκρασία βρασμού του προστίθεται αργά το άμυλο και αναδεύεται συνεχώς. Όταν το διάλυμα γίνει διαυγές αφήνεται να ψυχθεί. Εν τω μεταξύ προστίθενται 0.5 g βορικού οξέος, το οποίο λειτουργεί ως συντηρητικό αφού το άμυλο είναι ευπρόσβλητο από μικροοργανισμούς. Το διάλυμα αμύλου χρησιμοποιείται εντός 2-3 ημερών.

- Παρασκευή κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου:

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαλυτότητα του άλατος σε πίεση 1 atm και θερμοκρασία 20°C είναι 140g ανά 100mL απεσταγμένου νερού, ζυγίζονται 16g άλατος και διαλύονται σε 10mL νερού. Στην πράξη το διάλυμα που προκύπτει είναι υπέρκορο για αυτό η απαραίτητη ποσότητα λαμβάνεται από το υπερκείμενο υγρό. Το διάλυμα χρησιμοποιείται εντός της ημέρας.

*Ιωδομετρικός Προσδιορισμός:*

Σε κωνική φιάλη ζυγίζεται 1g δείγματος λιπαρής ύλης. Με τον ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 30 mL διαλύματος οξικού οξέος- χλωροφόρμιου. Η κωνική φιάλη ανακινείται έως ότου διαλυθεί πλήρως η λιπαρή ουσία. Με το σιφόνιο 1 mL προστίθενται 0.5 mL κορεσμένου διαλύματος KI (Εικόνα 21). Για ακριβώς ένα λεπτό η φιάλη αναδεύεται. Με το πέρας του ενός λεπτού, αφήνεται σε σκοτεινό σημείο για άλλα πέντε λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 30 mL απεσταγμένου νερού, με τον άλλον ογκομετρικό κύλινδρο, και η προσθήκη 0.5mL δείκτη αμύλου. Έπειτα το σχηματιζόμενο I<sub>2</sub> ογκομετρείται με το διάλυμα Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> έως το μπλε χρώμα εξαφανιστεί, όπως φαίνεται στις Εικόνες 22 και 23. Γίνεται και τυφλός προσδιορισμός.

Ο αριθμός Υπεροξειδίων υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

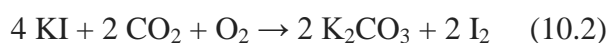
$$PV = \frac{(S - B) * N * 1000}{\text{Βάρος δείγματος (g)}} \quad (10.1)$$

Όπου:

- S: καταναλωθέντα mL διαλύματος  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  για την τιτλοδότηση του δείγματος
- B: καταναλωθέντα mL για τον τυφλό προσδιορισμό
- N: κανονικότητα του διαλύματος  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Παρατηρήσεις:

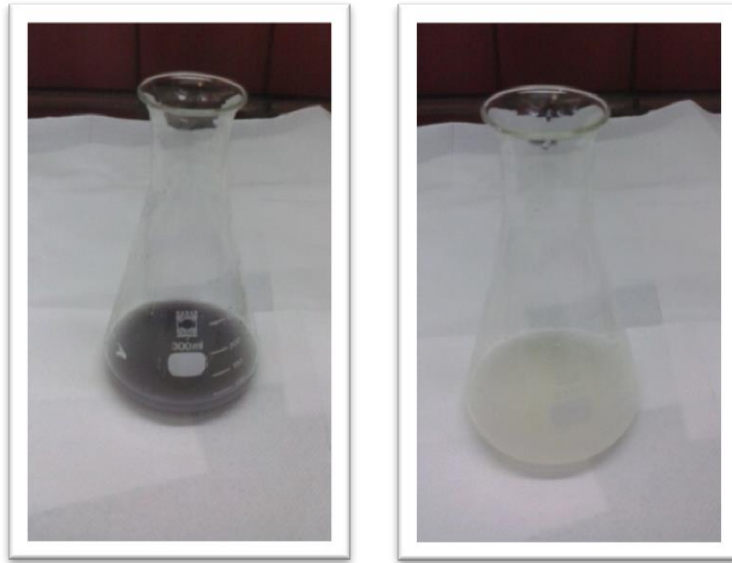
- ❖ Για την προσθήκη κάθε χημικής ουσίας χρησιμοποιείται διαφορετικό σκεύος καθ'όλη τη διάρκεια των ιωδομετρικών μετρήσεων.
- ❖ Το διάλυμα ιωδιούχου καλίου δεν αποθηκεύεται αλλά χρησιμοποιείται εντός της ημέρας. Αυτό συμβαίνει διότι οξειδώνεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Έτσι, το χρώμα του από διαυγές γίνεται υποκίτρινο.



**Εικόνα 21: Η δεξιά κωνική φιάλη περιέχει βούτυρο κακάο διαλυμένο στον οργανικό διαλύτη, ενώ η αριστερή περιέχει το διάλυμα αυτό και KI. Το κίτρινο χρώμα οφείλεται στον σχηματισμό  $\text{I}_2$**

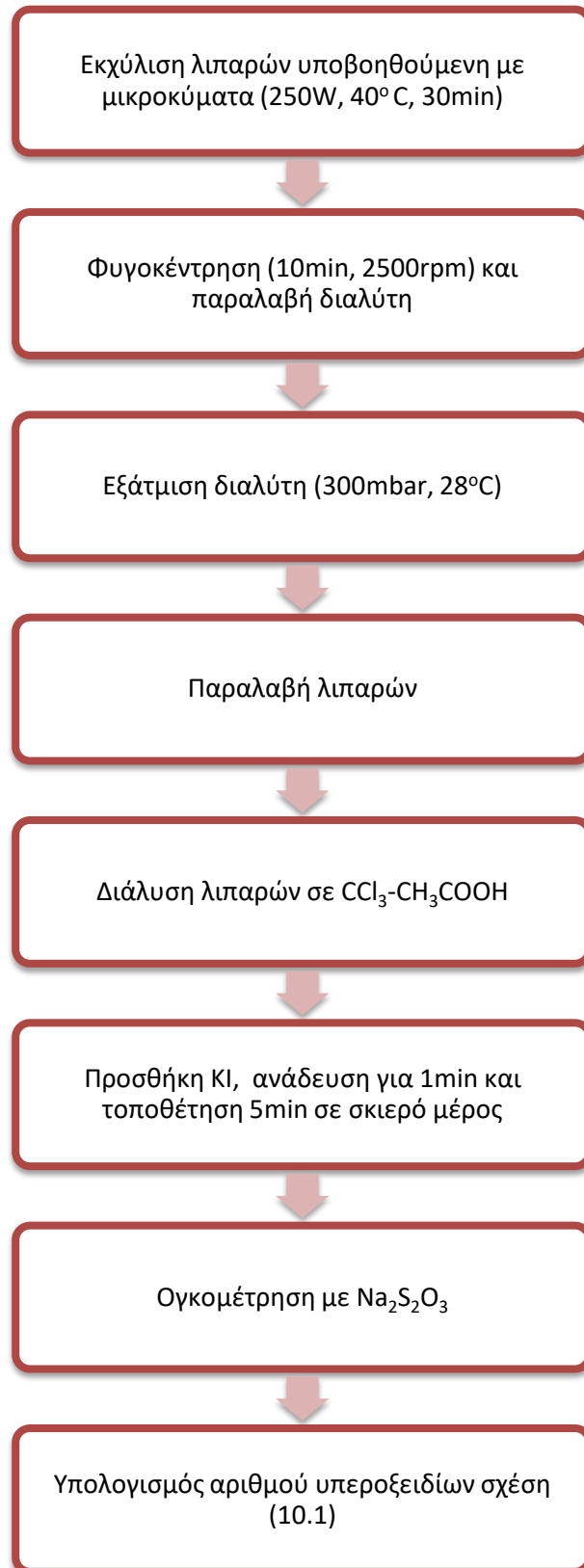


**Εικόνα 22:** Μίγμα διαλυμένου βουτύρου κακάο και  $I_2$  και αμύλου. Το σύμπλοκο αμύλου και Ιωδίου δίνει αυτό το χαρακτηριστικό μπλε- μωβ χρώμα.

**Εικόνα 23:** Ογκομέτρηση Ιωδίου και αποχρωματισμός συμπλόκου με  $Na_2S_2O_3$

Στο Γράφημα 2 συνοψίζεται σχηματικά η πειραματική διαδικασία παραλαβής των περιεχόμενων λιπαρών και ο προσδιορισμός του αριθμού των υπεροξειδίων.





Γράφημα 2: Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού αριθμού υπεροξειδίων

### **10.3 Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο του θειοκυανικού σιδήρου**

Στην φασματοφωτομετρική μέθοδο του θειοκυανικού σιδήρου τα υπεροξείδια οξειδώνουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή και ο τρισθενής σίδηρος στη συνέχεια συμπλοκοποιείται με θεικυανικά ιόντα. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι έγχρωμο και η συγκέντρωσή του είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων. Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόζεται είναι η ακόλουθη (Farhoosh et al., 2010).

#### **10.3.1 Αντιδραστήρια- Διαλύματα**

- Ισο-εξάνιο
- Υψηλής καθαρότητας αιθανόλη
- Διάλυμα θειοκυανικού αμμωνίου 30% ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ )
- Υδροχλωρικό οξύ 3.7% ( $\text{HCl}$ )
- Δισθενής χλωριούχος σίδηρος ( $\text{FeCl}_2$ )
- Τρισθενής χλωριούχος σίδηρος

#### **10.3.2 Όργανα- Συσκευές**

- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Φασματοφωτόμετρο Cary IE, Varian
- Vortex
- Τρεις σύριγγες 100  $\mu\text{L}$
- Σιφόνιο των 5 mL
- Ογκομετρικός κύλινδρος 10 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες ή δοχεία χωρητικότητας 15 mL

#### **10.3.3 Διαδικασία**

Ζυγίζονται 0.2 g λιπαρής ουσίας και διαλύονται σε 10 mL ισο-εξανίου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται κατά σειρά 5 mL αιθανόλης, 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος ισο-εξανίου-λίπους, 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος θειοκυανικού αμμωνίου και τέλος 100  $\mu\text{L}$  δισθενούς χλωριούχου σιδήρου. Μόλις προστεθεί ο σίδηρος, το διάλυμα αναδεύεται σε Vortex για ακριβώς 3 min και έπειτα μετράται η απορρόφησή του στα 500 nm έναντι αιθανόλης.

Πραγματοποιείται και τυφλός προσδιορισμός. Η πειραματική διαδικασία για τον τυφλό προσδιορισμό είναι ακριβώς ίδια με παραπάνω με μόνη διαφορά ότι στο ισοεξάνιο δεν διαλύεται ποσότητα λίπους.

Η μέθοδος του θειοκυανικού σιδήρου παρουσίαζε ένα σοβαρό πρόβλημα. Το τυφλό διάλυμα είχε πολύ υψηλή απορρόφηση. Ενώ βιβλιογραφικά αναμενόταν μεταξύ των τιμών 0,03-0,07 στην πράξη προέκυπτε μεταξύ 0,4-0,5. Επιχειρήθηκε η αγορά καινούργιων αντιδραστηρίων, η απαέρωση των δειγμάτων καθώς και η χρήση άλλων διαλυτών όπως αιθανόλης, χλωροφορμίου, μεθανόλης και μιγμάτων αυτών αλλά η απορρόφηση αν και μειωμένη παρέμεινε υψηλή. Τα οξειδωμένα δείγματα με το τυφλό διάλυμα είχαν διαφορά στην απορρόφηση της τάξης του 0,3. Ωστόσο, η πολύ υψηλή απορρόφηση του τυφλού κατέστησε απαγορευτική τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου.

## 10.4 Φασματομετρία Raman στο βούτυρο κακάο

Εξετάστηκε η μεταβολή του φάσματος Raman ενός δείγματος βουτύρου κακάο από σκόνη κακάο που δεν είχε υποστεί αλλοίωση και ενός δείγματος βουτύρου κακάο από σκόνη που είχε υποβληθεί σε διαδικασία αλλοίωσης. Η ύπαρξη υπολογίσιμων διαφορών στα δύο φάσματα θα οδηγούσε στην λήψη φασμάτων και για τα ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα.

### 10.4.1 Εξοπλισμός

- Φασματόμετρο Raman (A Renishaw inVia reflex Raman microscope)

### 10.4.2 Διαδικασία

Η διαδικασία είναι πολύ απλή. Στα ειδικά πλακίδια του οργάνου απλώνεται λεπτή ομοιόμορφη στρώση δείγματος βουτύρου κακάο και γίνονται οι κατάλληλες ρυθμίσεις. Οι ρυθμίσεις που τέθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατίθενται ακολούθως:

**Πίνακας 7: Ρυθμίσεις φασματόμετρου Raman**

<b>Πηγή laser</b>	785nm
<b>Ένταση laser</b>	1%
<b>Περιοχή λήψης φάσματος</b>	1000-3200 $\text{cm}^{-1}$
<b>Χρόνος έκθεσης</b>	10s
<b>Accumulation</b>	3



**Εικόνα 24: Φασματόμετρο Raman**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11<sup>ο</sup>: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ**

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του συνολικού φαινολικού φορτίου απαιτεί πρώτα την απομόνωση των ουσιών με αντιοξειδωτική συμπεριφορά. Στην συνέχεια παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των ουσιών με αντιοξειδωτική δράση και έπειτα η διαδικασία του προσδιορισμού τους.

### **11.1 Απομόνωση αντιοξειδωτικών**

Η απομόνωση των αντιοξειδωτικών προϋποθέτει να έχει προηγηθεί η απομάκρυνση των λιπαρών. Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομάκρυνση των λιπαρών είναι η ίδια με την διαδικασία της παραγράφου 8.1 με μόνη διαφορά ότι ο διαλύτης σε αυτήν την περίπτωση είναι το εξάνιο (Brcanovic et al.,2013).

#### **11.1.1 Υλικά**

- Εξάνιο
- Διαλύτης αντιοξειδωτικών αποτελούμενος από 70% ακετόνη, 29,5% νερό και 0,5% οξικό οξύ (v/v)

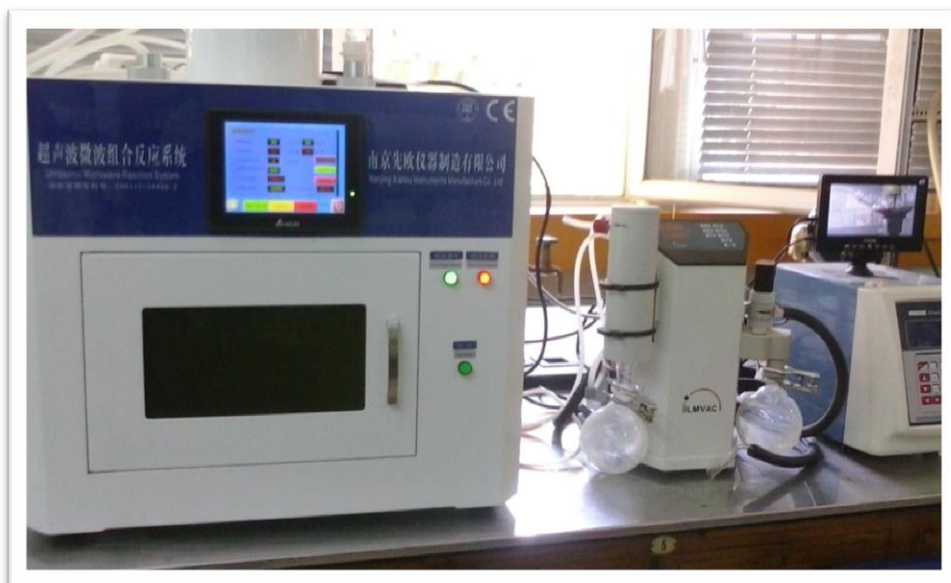
#### **11.1.2 Εξοπλισμός**

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China)
- Δοχείο εκχύλισης τριων στομίων
- Φυγόκεντρος Nüve, NF 400

#### **11.1.3 Διαδικασία**

Ζυγίζονται εντός του ειδικού δοχείου εκχύλισης 10g σκόνης κακάο και προστίθενται σε αυτά 50mL εξανίου. Το δοχείο τοποθετείται στη συσκευή εκχύλισης. Πραγματοποιείται εκχύλιση με μικροκύματα στους 40°C, στα 250W για 30min. Ταυτόχρονα αναδεύεται μαγνητικά στα 250rpm. Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση, διαχωρίζεται το εκχύλισμα από τη σκόνη κακάο με φυγοκέντρηση. Το εκχύλισμα, δηλαδή το εξάνιο με τα λιπαρά, απορρίπτεται. Η σκόνη κακάο, η οποία δεν περιέχει πλέον λιπαρά, αφήνεται για 2 ημέρες να ξηρανθεί φυσικά.

Κατόπιν ζυγίζονται 5g από την σκόνη κακάο, από την οποία έχουν απομακρυνθεί τα λιπαρά, εντός του δοχείου εκχύλισης. Σε αυτά προστίθενται 25mL από τον διαλύτη των αντιοξειδωτικών. Το δοχείο εισάγεται στη συσκευή εκχύλισης με υπέρηχους (Εικόνα 25). Στους δύο υποδοχείς του τοποθετούνται ένα θερμόμετρο το οποίο καταγράφει τη θερμοκρασία του δείγματος και ένα εξάρτημα της συσκευής για τον περιορισμό της εξάτμισης του διαλύτη. Ρυθμίζεται στη συσκευή το δοχείο με το κακάο και τον διαλύτη να βομβαρδίζεται για 1s με υπέρηχους ακολουθούμενο από 1s αδράνειας. Η διαδικασία της εκχύλισης διαρκεί 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ώστε να διαχωριστεί το εκχύλισμα, δηλαδή ο διαλύτης ο οποίος περιέχει πλέον και τα αντιοξειδωτικά, από τη σκόνη κακάο. Το εκχύλισμα ογκομετρείται και οδηγείται στην ανάλυση της αντιοξειδωτικής του δράσης και του φαινολικού του φορτίου. Επιπλέον, ένα εκχύλισμα οδηγείται σε πλήρη εξάτμιση του διαλύτη ώστε να βρεθεί η μάζα των διαλυμένων ουσιών στον διαλύτη. Η εξάτμιση πραγματοποιείται στον περιστροφικό εξάτμιστήρα.



**Εικόνα 25: Συσκευή εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπέρηχους**

## **11.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH•**

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται με τον ποσοτικό προσδιορισμό της σταθερής ρίζας 2,2-διφαινύλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH•), η οποία απενεργοποιείται παρουσία αντιοξειδωτικών, όπως προτάθηκε από τους Brand-Williams et al. (1995).

### **11.2.1 Υλικά**

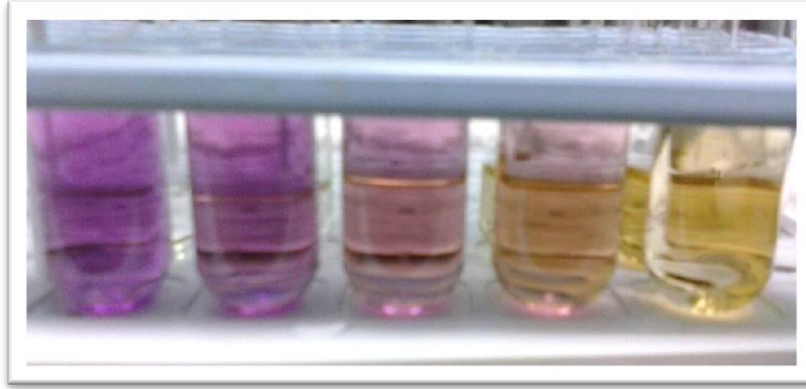
- Μεθανόλη
- Εμπορικά διαθέσιμη ελεύθερη ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH•)
- Διαλύτης αντιοξειδωτικών

### **11.2.2 Εξοπλισμός**

- Φωτόμετρο
- Vortex
- Σιφόνιο των 5mL
- πιπέτα

### **11.2.3 Διαδικασία**

Παρασκευάζεται μεθανολικό διάλυμα DPPH 0,3% w/v. Λαμβάνεται ποσότητα εκχυλίσματος και αραιώνεται 1/20 (Διάλυμα Α). Η αρχική αυτή αραιώση πραγματοποιείται ώστε τα διαλύματα που παρασκευάζονται και έπειτα μετρούνται φωτομετρικά να δίνουν απορροφήσεις μεταξύ 0,1 και 0,6 ABS. Επειδή η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται από το μέγεθος IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών που προκαλούν απενεργοποίηση της ρίζας κατά 50%, κατασκευάζεται για κάθε δείγμα καμπύλη με διάφορες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών. Για αυτό το διάλυμα Α υποβάλλεται και στις εξής αραιώσεις:  $\frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}, \frac{1}{16}$ . Σε κάθε έναν από πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες εισάγονται 3,9mL διαλύματος DPPH. Αφού μετρηθεί η απορρόφηση του DPPH στα 515nm έναντι μεθανόλης, προστίθεται στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα 0,1mL από το διάλυμα Α. Στον δεύτερο προστίθεται 0,1mL από την αραιώση  $\frac{1}{2}$ . Στον τρίτο 0,1mL από την αραιώση  $\frac{1}{4}$  και ούτω καθεξής. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται στη συσκευή Vortex και αφήνονται 20min σε σκοτεινό μέρος (Εικόνα 26) . Μόλις περάσουν τα 20min μετράται η απορρόφηση του DPPH στα 515nm έναντι μεθανόλης. Κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης DPPH. Το ποσοστό της εναπομένουσας ρίζας υπολογίζεται από τη σχέση (4.5). Από τις καμπύλες που δημιουργούνται υπολογίζεται το μέγεθος IC50. Όσο πιο μικρή η τιμή της δραστικής αυτής συγκέντρωσης, τόσο πιο λίγη ποσότητα εκχυλίσματος χρειάζεται για να εξουδετερωθεί η ρίζα, άρα τόσο πιο δραστικό είναι το δείγμα.



**Εικόνα 26: Διαλύματα DPPH- αντιοξειδωτικών. Μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών προκαλεί εντονότερο αποχρωματισμό του μωβ διαλύματος της ρίζας**

### **11.3 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού φορτίου**

Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού φορτίου γίνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin- Ciocalteu (Waterhouse & Laurie, 2006)

#### **11.3.1 Υλικά**

- Απιονισμένο νερό
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Ανθρακικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

#### **11.3.2 Όργανα- Συσκευές**

- Φωτόμετρο (UVMS1, Bel Engineering)
- Vortex
- Σιφόνιο 10mL
- Πιπέτα 1-1000mL
- Υδατόλουτρο

#### **11.3.3 Διαδικασία**

Ποσότητα εκχυλίσματος λαμβάνεται και αραιώνεται σε 1/20. Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται 0,1mL αραιωμένου εκχυλίσματος. Σε αυτά προστίθενται 7,9mL νερού και 0,5mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Αναδεύονται στη συσκευή Vortex για 30sec. Κατόπιν προστίθενται στο διάλυμα 1,5mL ανθρακικού νατρίου. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείνεται με πάραφιλμ και τοποθετείται σε υδατόλουτρο το οποίο λειτουργεί στους 40°C. Αφήνεται για 30min και κατόπιν μετράται η απορρόφηση του

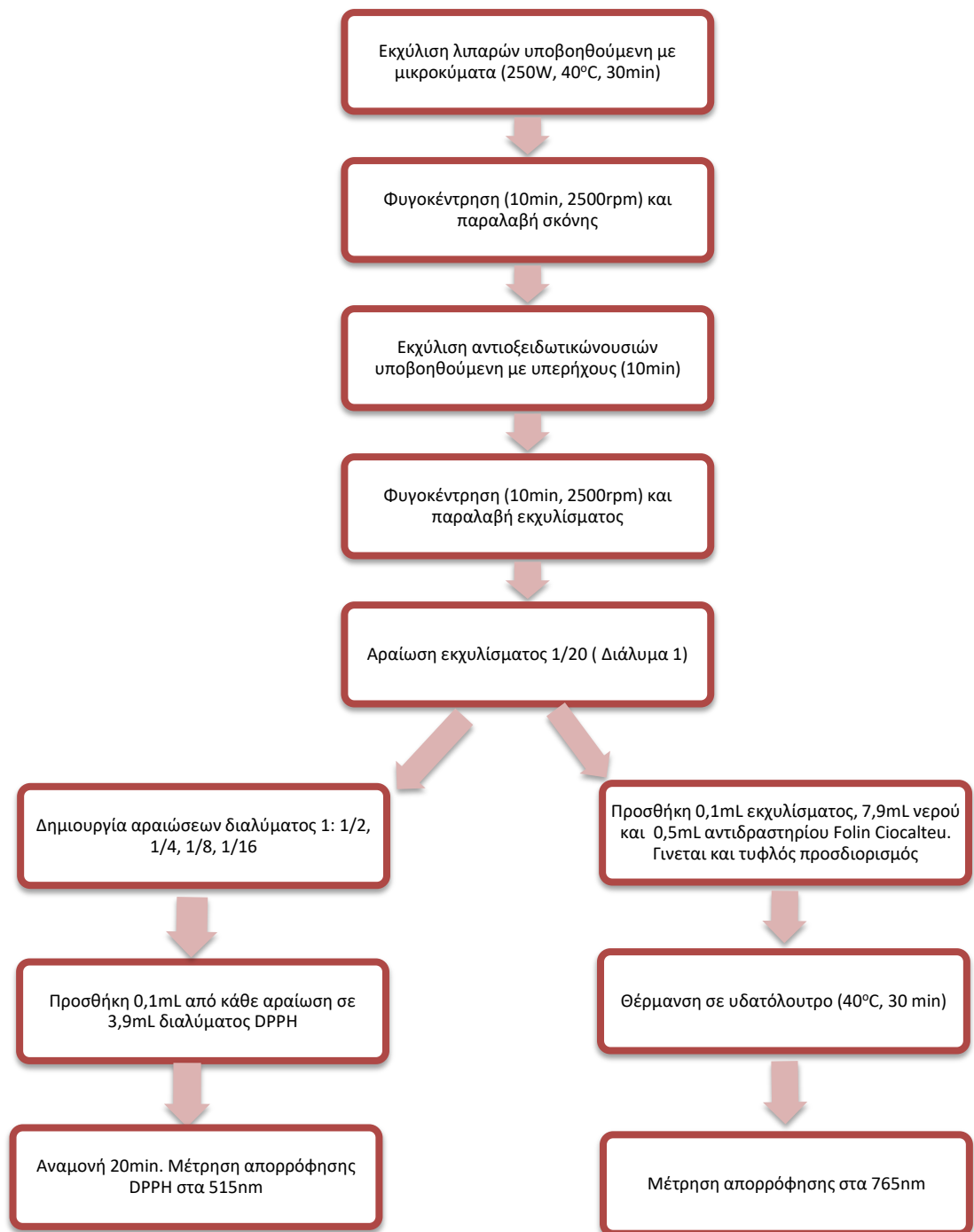


διαλύματος στα 765nm. Οι τιμές της απορρόφησης που προκύπτουν, παρεμβάλλονται σε καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος από όπου υπολογίζεται και το συνολικό φαινολικό φορτίο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος σε g κακάο. Γίνεται και τυφλός προσδιορισμός. Στην Εικόνα 27 παρουσιάζεται το διάλυμα του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu με το πολυφαινολικό εκχύλισμα και το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα προτού τοποθετηθούν στο υδατόλουτρο.



**Εικόνα 27:** Αριστερά φαίνεται το διάλυμα του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu με το εκχύλισμα πολυφαινολών και δεξιά το τυφλό διάλυμα

Το Γράφημα 3 συνοψίζει σχηματικά την πειραματική διαδικασία απομόνωσης των αντιοξειδωτικών ουσιών και τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του συνολικού φαινολικού φορτίου.



**Γράφημα 3: Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και συνολικού φαινολικού φορτίου**

## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12<sup>ο</sup>: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά την μικροβιακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην έναρξη του πειράματος στα δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά και 10% σε λιπαρά δεν μετρήθηκε ούτε μία αποικία. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε για την ανάλυση των δώδεκα δειγμάτων κατά τους χρόνους αποθήκευσης των 7, 15, 30 και 60 ημερών. Αυτό το αποτέλεσμα κρίνεται ως αναμενόμενο δεδομένου ότι το κακάο κατά την παραγωγή του υποβάλλεται σε μια έντονη θερμική επεξεργασία η οποία θανατώνει την πλειοψηφία των μικροοργανισμών. Ακόμη υποδηλώνει ότι το μικροβιακό τεστ στους συγκεκριμένους χρόνους αποθήκευσης για τα 50 αυτά δείγματα πραγματοποιήθηκε ορθά χωρίς την επιμόλυνση των αποθηκευμένων σκονών κακάο.

Στις 90 ημέρες αποθήκευσης όμως, υπήρξε καταμέτρηση αποικιών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εντοπίστηκαν αποικίες μόνο στα δείγματα κακάο με 10% περιεκτικότητα σε λιπαρά. Στον Πίνακα 8 δίνονται οι αποικίες που μετρήθηκαν σε κάθε δείγμα και ο λογάριθμος του πληθυσμού των μικροβιακών κυττάρων ανά γραμμάριο κακάο.

**Πίνακας 8: Αριθμός αποικιών και λογάριθμος μικροβιακού πληθυσμού ανά γραμμάριο δείγματος για την μικροβιακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους τρεις μήνες**

Συνθήκες αποθήκευσης	Αριθμός αποικιών	Λογάριθμος πληθυσμού μικροβιακών κυττάρων ανά γραμμάριο δείγματος Log(cfu/g)
25°C, 90% RH	1	1,0
25°C, 30% RH	2	1,3
35°C, 80% RH	4	1,6
35°C, 30% RH	5	1,7
45°C, 80% RH	1	1,0
45°C, 30% RH	5	1,7

Η εμφάνιση αυτού του μικρού αριθμού αποικιών οδήγησε στη διερεύνηση του είδους των μικροοργανισμών. Εξετάστηκε αν ο αριθμός αυτός οφείλεται σε ζύμες/ μούχλες, E. Coli ή Salmonella. Μόνο η Salmonella έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, στο δείγμα το οποίο ήταν αποθηκευμένο στους 45°C και 30% RH μετρήθηκαν δύο

αποικίες στο τριβλίο Compact Dry με το επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη της Salmonella που αντιστοιχεί σε 1,3 log(cfu/g).

Συνολικά οι μετρήσεις αποικιών ανά γραμμάριο κακάο είναι πολύ μικρές επομένως και στους 3 μήνες η μικροβιακή ανάπτυξη είναι πρακτικά αμελητέα. Τα δείγματα κακάο, είτε έχουν αποθηκευτεί σε ρεαλιστικές συνθήκες είτε σε επιταχυνόμενες θεωρούνται μικροβιολογικά σταθερά. Δεν παρουσιάστηκαν φαινόμενα επιμόλυνσης των δειγμάτων κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά από τα δείγματα με περιεκτικότητα 10% παρόλο που ήταν στον ίδιο χώρο. Το κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά φαίνεται να είναι προστατευμένο από τα αντιοξειδωτικά που περιέχει.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13ο: ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ

### 13.1 Απομόνωση λιπαρών με εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

Η περιεκτικότητα των δύο σκονών κακάο σε λιπαρά είναι γνωστή: η μία περιέχει 10-12% λιπαρά και η δεύτερη 20-22%. Αυτή θεωρείται η πραγματική περιεκτικότητα σε λιπαρά. Επομένως, είναι γνωστή η ποσότητα των λιπαρών σε ένα δείγμα κακάο γνωστού βάρους. Κατά την απομόνωση των λιπαρών, τα λιπαρά μέσω της διαδικασίας της εκχύλισης μεταφέρονται στον πετρελαϊκό αιθέρα και έπειτα από εξάτμιση του διαλύτη παραλαμβάνονται στην σφαιρική φιάλη. Οπότε αν η φιάλη είναι προζυγισμένη και ζυγιστεί ξανά στο τέλος της εξάτμισης του διαλύτη λαμβάνεται το βάρος των λιπαρών που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο δείγμα κακάο. Με αναγωγή προκύπτει η πειραματική περιεκτικότητα σε λιπαρά και συγκρινόμενη με την πραγματική δίνει ένα μέτρο αποδοτικότητας της διαδικασίας εκχύλισης. Αυτός ο υπολογισμός γίνεται και για τα 62 δείγματα κακάο στα οποία έγινε απομόνωση των λιπαρών τους και ο μέσος όρος τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 9:

**Πίνακας 9: Πραγματική και πειραματική περιεκτικότητα σε λιπαρά των δύο σκονών κακάο**

<b>Πραγματική περιεκτικότητα σε λιπαρά</b>	10-12%	20-22%
<b>Πειραματική περιεκτικότητα σε λιπαρά</b>	10,9%	20,3%

Η εκχύλιση με μικροκύματα κρίνεται πολύ αποδοτική καθώς λαμβάνεται το σύνολο των λιπαρών του δείγματος. Σημειώνεται ότι η εξάτμιση ήταν εξαντλητική δηλαδή γινόταν έως ότου ο διαλύτης είχε απομακρυνθεί.

### 13.2 Παρακολούθηση αριθμού υπεροξειδίων

Η παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπαρών, για το χρονικό διάστημα των τριών μηνών, πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων σε κάθε ένα από τα δώδεκα δείγματα. Ο αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου

αποθήκευσης των σκονών παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες και τα διαγράμματα. Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι καλύτερη από 3%.

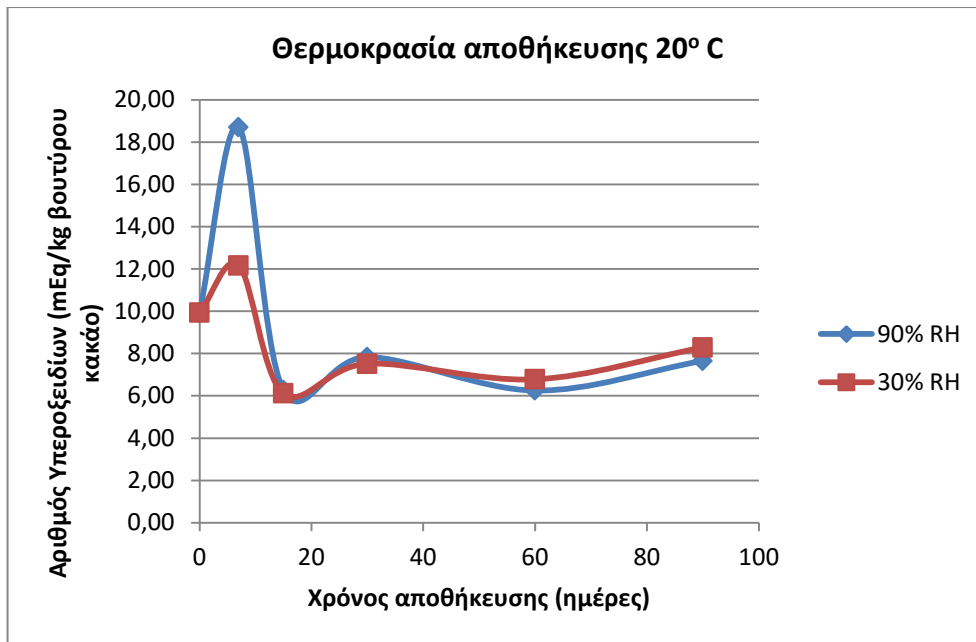
### **13.2.1 Δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά**

Τα δείγματα σκονών κακάο τα οποία ήταν αποθηκευμένα στις συνθήκες του Γραφήματος 1 αφού εκχυλίστηκαν για την παραλαβή των λιπαρών τους, πραγματοποιήθηκε σε αυτά ιωδομετρικός προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων τους. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για τους προκαθορισμένους χρόνους αποθήκευσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10: Αριθμός υπεροξειδίων δειγμάτων σκόνης κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης**

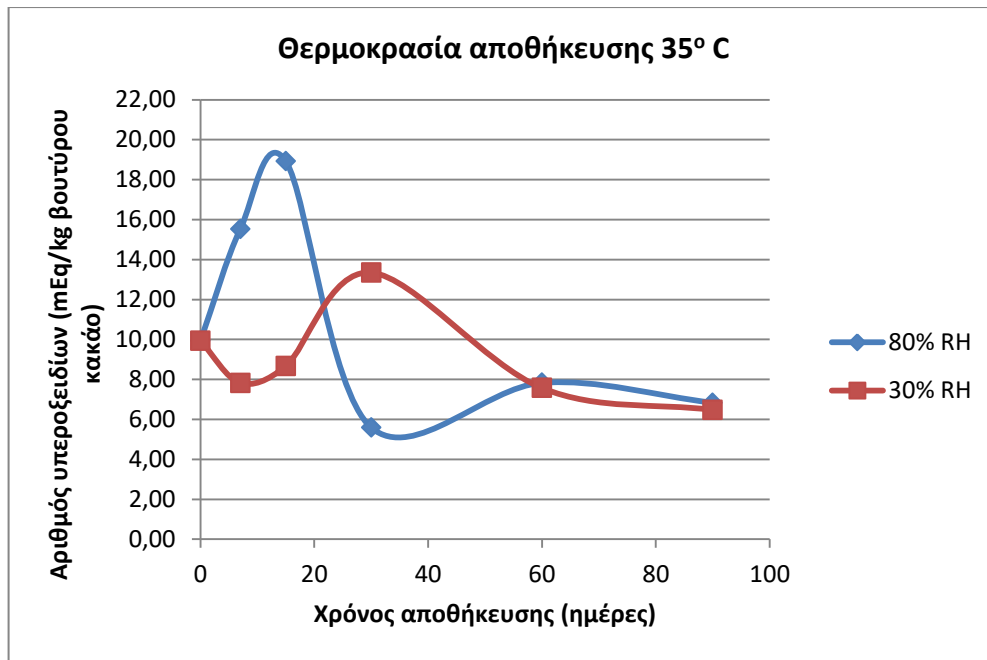
		<b>Δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά</b>					
Συνθήκες αποθήκευσης	Θερμοκρασία (°C)	25	25	35	35	45	45
	Σχετική υγρασία	90	30	80	30	80	30
		<b>Αριθμός Υπεροξειδίων</b>					
Χρόνος αποθήκευσης (ημέρες)	0	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
	7	18,7	12,2	15,5	7,8	11,6	10,3
	15	6,3	6,1	18,9	8,7	13,0	9,7
	30	7,8	7,5	5,6	13,4	9,9	6,9
	60	6,3	6,8	7,8	7,6	6,0	7,3
	90	7,6	8,3	6,8	6,5	7,7	6,4

Για την καλύτερη κατανόηση των μετρήσεων κατασκευάζονται τα διαγράμματα του αριθμού υπεροξειδίων ως προς το χρόνο σε κάθε μία από τις τρεις θερμοκρασίες.



**Διάγραμμα 2: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 20°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (90% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

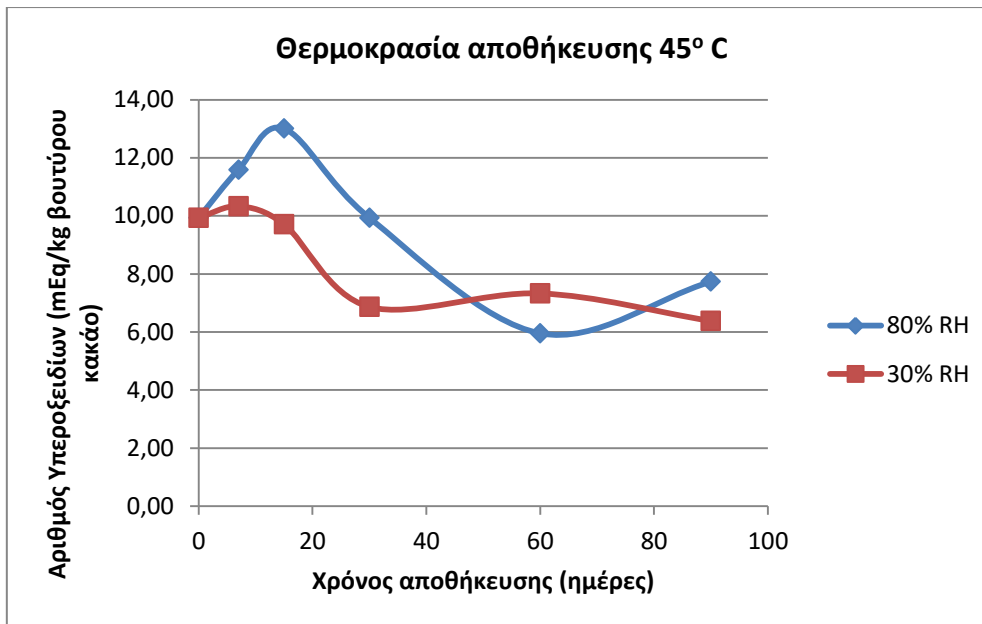
Στο Διάγραμμα 2 φαίνεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 20% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 20°C. Παρατηρείται μια αρχική αύξηση του αριθμού των υπεροξειδίων στις 7 ημέρες αποθήκευσης, η οποία ακολουθείται από την μείωση και τελικά σταθεροποίησης της τιμής του κοντά στις τιμές 7-8mEq O<sub>2</sub>/kg δείγματος βούτυρο κακάο. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τα δύο δείγματα κακάο αποθηκευμένα σε αυτήν την θερμοκρασία με τη διαφορά ότι το δείγμα που βρισκόταν σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας παρουσιάζει πιο έντονη αύξηση του αριθμού υπεροξειδίων. Ωστόσο, οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων είναι αρκετά μικρές δεδομένου ότι η οξειδωτική αλλοίωση των λιπαρών φαίνεται να γίνεται αντιληπτή, από εμπειρικές μελέτες, όταν ο αριθμός υπεροξειδίων υπερβεί τα 40mEq O<sub>2</sub>/kg ελαίου (Chakrabarty, 2003). Μια πιθανή εξήγηση για την έναρξη της οξείδωσης και την διακοπή της προκύπτει από την παρουσία ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, οι οποίες απενεργοποιούν τις σχηματισθέντες υπεροξειδικές ρίζες.



**Διάγραμμα 3: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 35°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

Στο Διάγραμμα 3 φαίνεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 20% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 35°C. Οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων για τα αποθηκευμένα δείγματα στους 35°C είναι παρόμοιες με τις τιμές των δειγμάτων στους 20°C. Συνεπώς, η θερμοκρασιακή αύξηση κατά 15°C δεν έχει σημαντική επίδραση στον ταγγισμό του βουτύρου κακάο. Η υψηλή συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών ενδέχεται να αναστέλλει την οξείδωση του λίπους του κακάο. Παρατηρείται μια αρχική αύξηση για το δείγμα αποθηκευμένο σε περιβάλλον με 80% σχετική υγρασία, ενώ το δείγμα σε περιβάλλον χαμηλότερης σχετικής υγρασίας καθυστερεί να εμφανίσει αυτήν την αύξηση. Στους δύο μήνες και τα δύο δείγματα σκόνης κακάο έχουν λάβει τελική τιμή για τον αριθμό υπεροξειδίων τους στο διάστημα [6, 8] mEq/ kg βουτύρου κακάο.





**Διάγραμμα 4: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 45°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 4 στο οποίο παρουσιάζεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 20% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 45°C, προκύπτει ότι οι αριθμοί υπεροξειδίων κυμαίνονται και πάλι σε χαμηλά επίπεδα. Το δείγμα κακάο το οποίο ήταν αποθηκευμένο σε υψηλότερη υγρασία έχει λίγο μεγαλύτερες τιμές από ότι το δείγμα σε περιβάλλον χαμηλής υγρασίας. Ακόμη παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, σε σχέση με τα προηγούμενα διαγράμματα, δεν αυξάνεται ο αριθμός υπεροξειδίων δηλαδή δεν γίνεται εντονότερη η οξείδωση. Σε ένα τρόφιμο με χαμηλότερη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά η παρατήρηση αυτή θα ήταν παράλογη. Σε επόμενη παράγραφο εξετάζεται η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών και αν αυτή μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου. Η μείωσή της σημαίνει ότι επενεργούν στην οξείδωση και την αναστέλλουν σημαντικά.

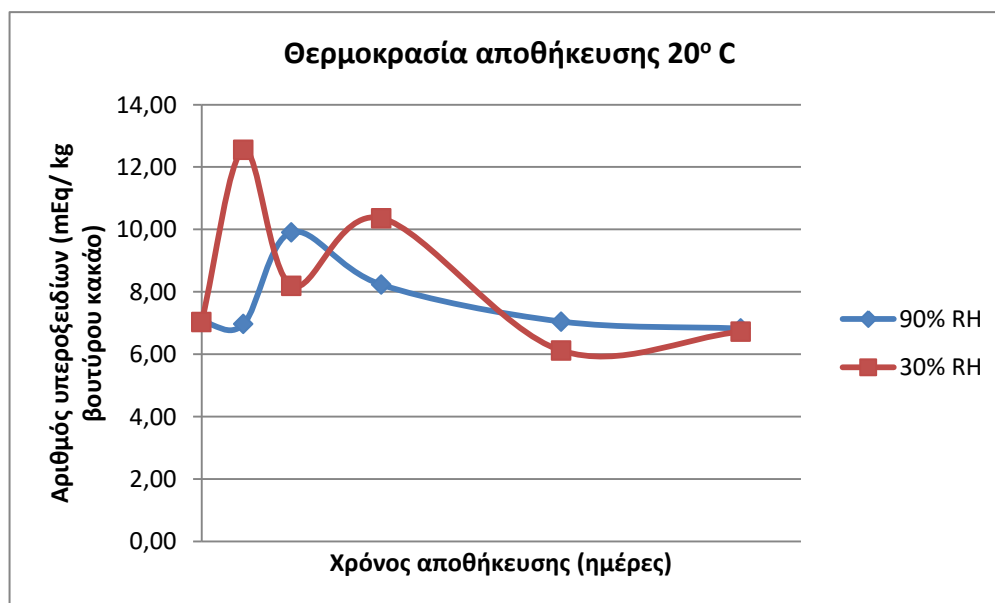
Ένα κοινό συμπέρασμα για τον αριθμό υπεροξειδίων και στα έξι δείγματα κακάο περιεκτικότητας 20% σε λιπαρά είναι ότι το αργότερο στους δύο μήνες ο αριθμός υπεροξειδίων τους σταθεροποιείται σε μια τιμή μεταξύ 6 και 8 mEq O<sub>2</sub>/kg βουτύρου κακάο. Επίσης οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων όλων των δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσής τους παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα. Δεδομένου ότι ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζεται ως προς τα κιλά του δείγματος βουτύρου κακάο γίνεται κατανοητό ότι στο δείγμα κακάο μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά του κακάο η οξείδωση οργανοληπτικά δεν θα γίνει αντιληπτή.

### 13.2.2 Δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά

Ο αντίστοιχος πίνακας και τα διαγράμματα κατασκευάζονται για τα δείγματα κακάο περιεκτικότητας 10% σε λιπαρά.

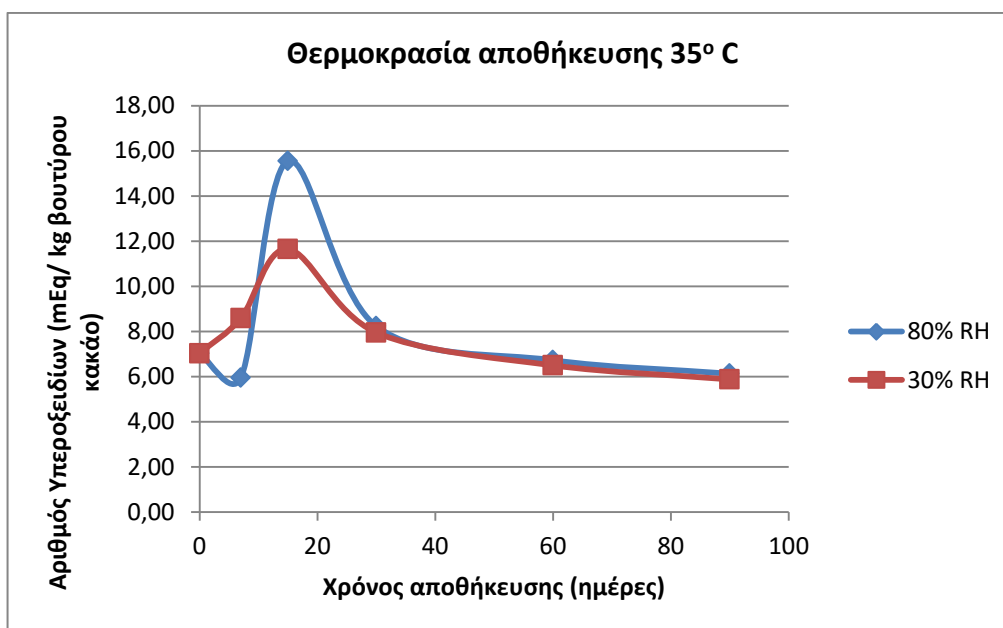
**Πίνακας 11: Αριθμός υπεροξειδίων δειγμάτων σκόνης κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης**

		Δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά					
Συνθήκες αποθήκευσης	Θερμοκρασία (°C)	25	25	35	35	45	45
	Σχετική υγρασία	90	30	80	30	80	30
		Αριθμός Υπεροξειδίων					
Χρόνος αποθήκευσης (ημέρες)	0	7,3	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
	7	6,9	12,6	6,0	8,6	9,6	7,0
	15	9,9	8,2	15,5	11,6	8,6	9,4
	30	8,2	10,4	8,2	8,0	8,7	8,2
	60	7,1	6,1	6,7	6,5	5,6	7,1
	90	6,8	6,7	6,1	5,9	7,3	7,9



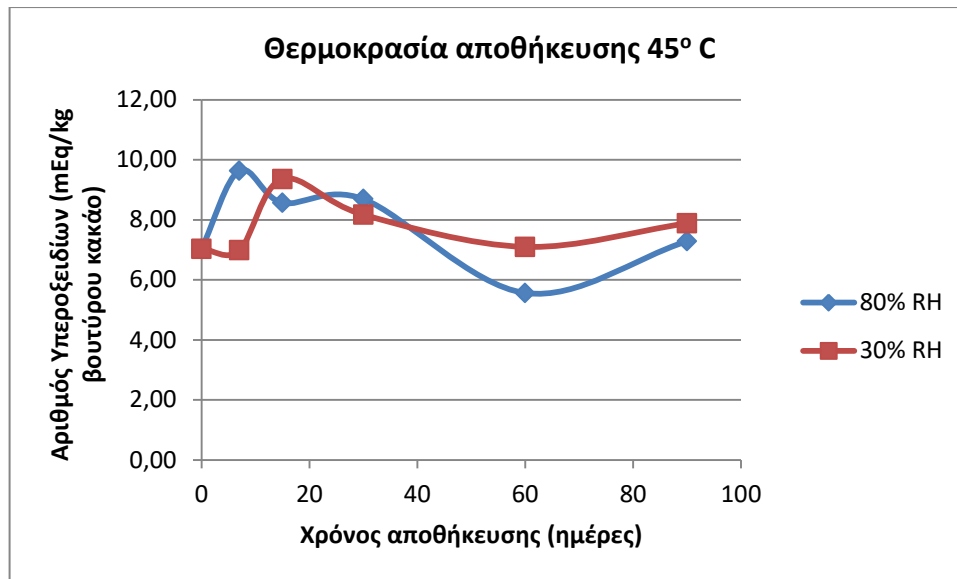
**Διάγραμμα 5: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 20°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (90% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

Στο Διάγραμμα 5 φαίνεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 10% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 20°C. Ο αριθμός υπεροξειδίων του βουτύρου κακάο της σκόνης η οποία ήταν αποθηκευμένη σε περιβάλλον 90% σχετικής υγρασίας παρουσιάζει μια μικρή αύξηση και έπειτα λαμβάνει μια σταθερή τιμή μεταξύ 6 και 8 mEq/kg βουτύρου κακάο. Η μεταβολή, ωστόσο, του αριθμού υπεροξειδίων του βουτύρου κακάο της σκόνης σε χαμηλής υγρασίας περιβάλλον δεν ακολουθεί το προφίλ των υπόλοιπων δειγμάτων και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Οι τιμές του αριθμού υπεροξειδίων και για τα δύο δείγματα είναι χαμηλές καθ' όλη τη διάρκεια των τριών μηνών.



**Διάγραμμα 6: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 35°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

Στο Διάγραμμα 6 φαίνεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 10% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 35°C. Ο αριθμός υπεροξειδίων του βουτύρου κακάο και των δύο σκονών παρουσιάζει μια μικρή αρχική αύξηση. Η αύξηση αυτή είναι λίγο μεγαλύτερη για το δείγμα το οποίο ήταν αποθηκευμένο σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας. Από τις 30 ημέρες και έπειτα η τιμή του αριθμού υπεροξειδίων σταθεροποιείται μεταξύ 6 και 8 mEq/ kg βουτύρου κακάο, όπως συμβαίνει και σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα.



**Διάγραμμα 7: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 45°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH)**

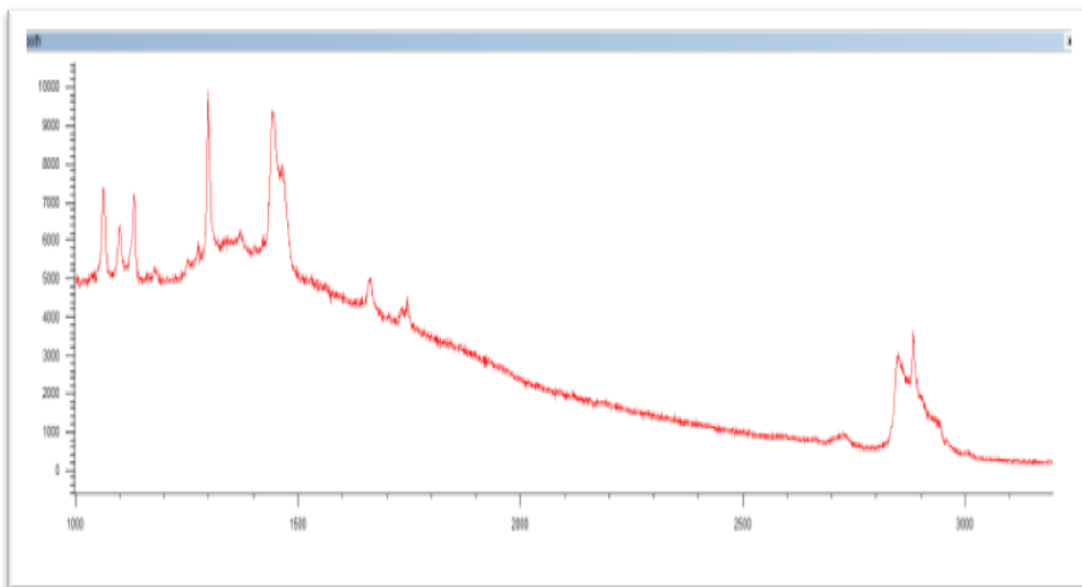
Στο Διάγραμμα 7 φαίνεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς τον χρόνο αποθήκευσης για τα δείγματα σκόνης κακάο περιεκτικότητας 10% σε λιπαρά τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 45°C. Η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων του βουτύρου κακάο στα συγκεκριμένα δείγματα κακάο είναι πιο μικρή συγκριτικά με τα προηγούμενα δείγματα. Δεν έχει την αναμενόμενη μορφή και η οξειδωτική κατάσταση ουσιαστικά δεν αλλάζει.

Παρατηρώντας συνολικά τη μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων ως προς το χρόνο και για τα έξι δείγματα κακάο περιεκτικότητας 10% σε λιπαρά, συμπεραίνεται ότι ο αριθμός υπεροξειδίων παραμένει σε χαμηλές τιμές κατά τη διάρκεια των τριών μηνών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το βούτυρο κακάο αποτελεί μόνο το 10-12% των συστατικών της συγκεκριμένης σκόνης προκύπτει ότι η οξείδωση των λιπαρών σε αυτό το διάστημα δεν θα γίνει αντιληπτή από τον καταναλωτή.

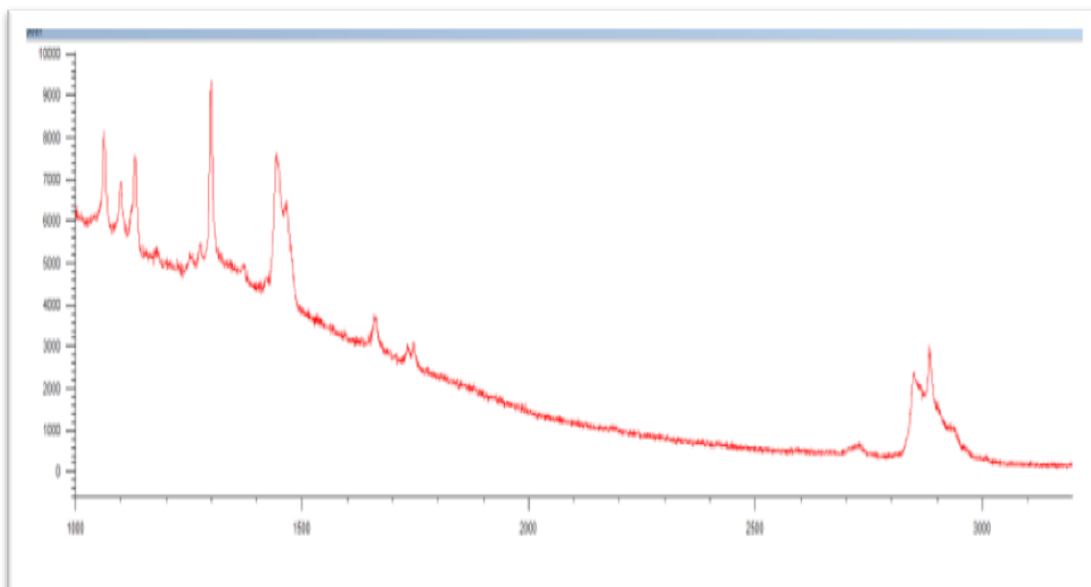
### 13.3 Φασματοσκοπία Raman

Όπως έχει ήδη σημειωθεί στην παράγραφο 9.4, λήφθηκε το φάσμα Raman βουτύρου κακάο προερχόμενο από μία «φρέσκια» σκόνη, δηλαδή τη χρονική στιγμή  $t=0$  και μια σκόνη αλλοιωμένη, η οποία ήταν αποθηκευμένη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αν προέκυπταν φάσματα με έντονες διαφορές θα γίνονταν και μετρήσεις στις ενδιάμεσες χρονικές στιγμές, όμως τα φάσματα που προέκυψαν είναι σχεδόν ίδια. Οι διαφορές που εντοπίζουν οι ερευνητές Bresson et al. μεταξύ των φασμάτων είναι

πολύ μικρές και αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιούν διαφορετική πηγή laser. Πάντως οι χαρακτηριστικές κορυφές που δίνει το βούτυρο κακάο συμπίπτουν με τις κορυφές που βρέθηκαν και στα δύο πειραματικά αυτά φάσματα. Ακολούθως παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν. Στον οριζόντιο άξονα δίνεται ο κυματάρηθος και στον κάθετο η ένταση της ακτινοβολίας.



**Εικόνα 28: Φάσμα Raman του βούτυρου κακάο κατά την έναρξη της μελέτης**

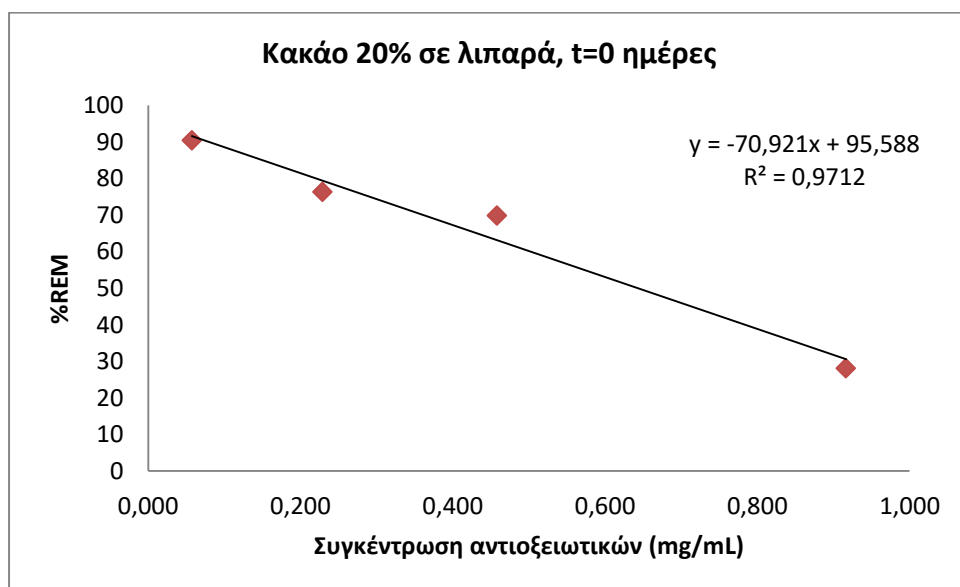


**Εικόνα 29: Φάσμα Raman βουτύρου κακάο από αλλοιωμένη σκόνη**

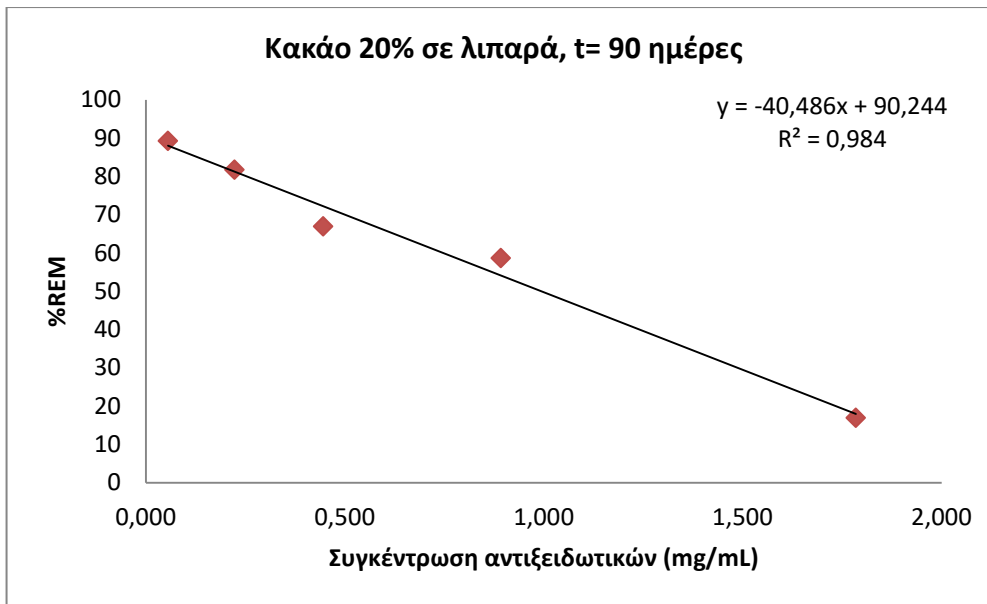
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14<sup>ο</sup> : ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

### 14.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

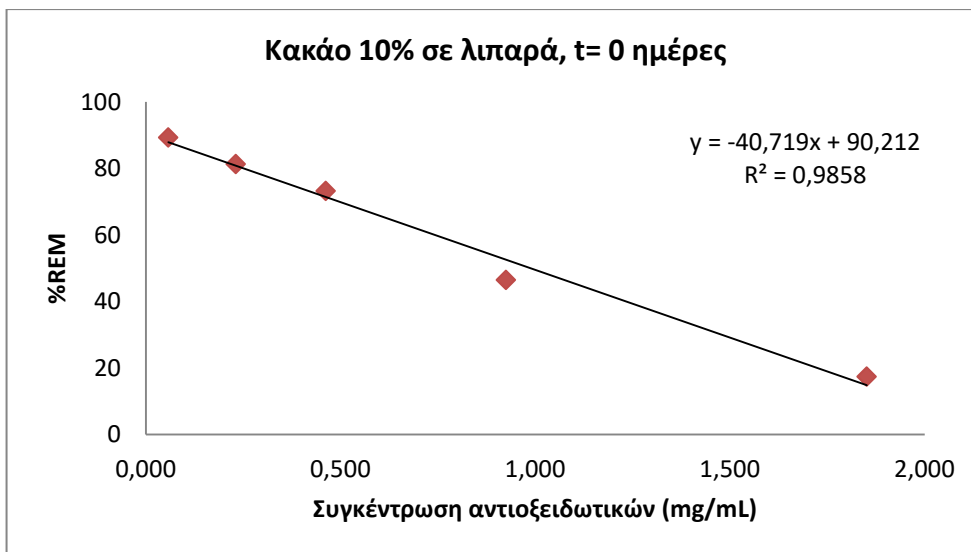
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε με τη μέθοδο δέσμευσης της ρίζας DPPH, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 10.2. Τα δείγματα κακάο που μελετήθηκαν ήταν οι δύο σκόνες κακάο (περιεκτικότητας σε λιπαρά 10% και 20%) κατά την αρχική χρονική στιγμή, και δείγματα κατά την ολοκλήρωση της μελέτης (t=90 ημέρες) τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους 45°C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς τη δραστική συγκέντρωση του δείγματος η οποία μπορεί να εξουδετερώσει το 50% της συγκέντρωσης της ρίζας. Στα Διαγράμματα 8 και 9 δίνονται οι καμπύλες της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς ως προς την εναπομένουσα ρίζα DPPH (%REM , παράγραφος 4.3.1) για τα δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά. Όμοια στα Διαγράμματα 10 και 11 δίνονται οι καμπύλες της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς ως προς την εναπομένουσα ρίζα DPPH για τα δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά. Τα τελικά αποτελέσματα των υπολογισμών για την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 12.



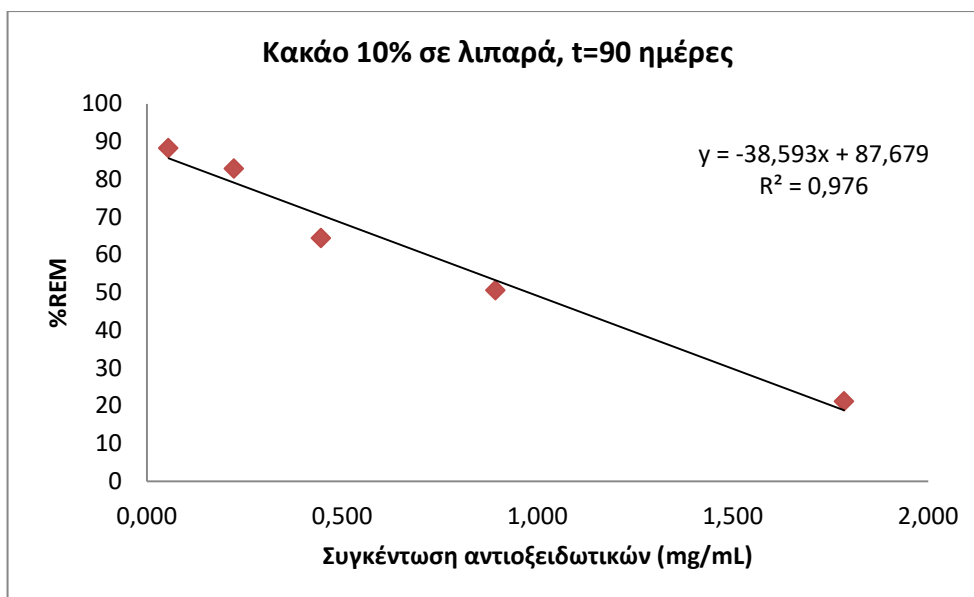
**Διάγραμμα 8: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% κατά τη χρονική στιγμή t=0 ημέρες**



**Διάγραμμα 9: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% κατά τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες, αποθηκευμένο στους 45°C**



**Διάγραμμα 10: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% κατά τη χρονική στιγμή t=0 ημέρες**



**Διάγραμμα 11: : Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% κατά τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες, αποθηκευμένο στους 45°C**

**Πίνακας 12: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων σκονών κακάο, στις οποίες έχουν απομακρυνθεί τα λιπαρά, εκφρασμένη στη συγκέντρωση εξουδετέρωσης του 50% της ρίζας DPPH IC50 (mg/mL)**

	Χρόνος αποθήκευσης	
	t=0 ημέρες	t=90 ημέρες
<b>Κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά</b>	9,0	8,9
<b>Κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά</b>	5,9	9,1

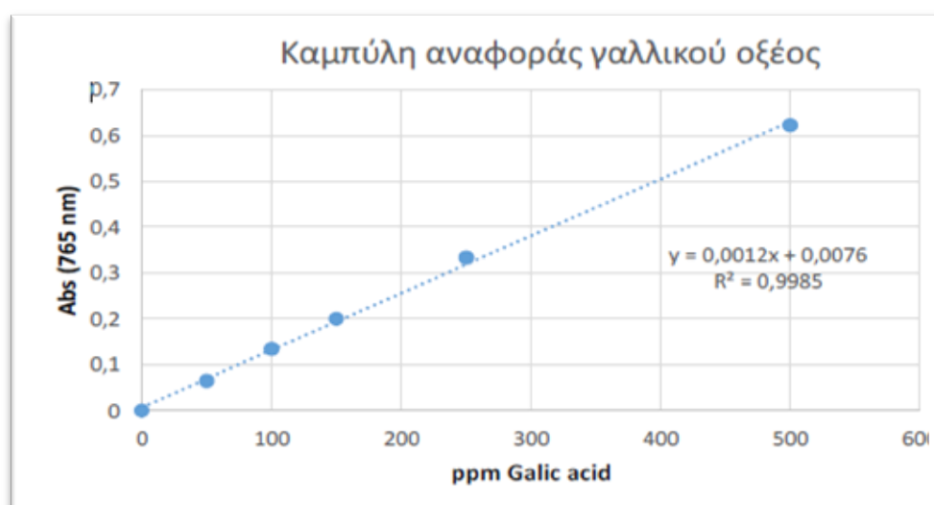
Όσο μικρότερη η τιμή της δραστηκής συγκέντρωσης IC50, τόσο μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος απαιτείται για να εξουδετερωθεί η ρίζα άρα και πιο δραστικό το δείγμα (Antolovich et al., 2002). Επομένως, η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά είναι μεγαλύτερη από την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά για την αρχική χρονική στιγμή (t=0 ημέρες). Το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά ενώ έχει μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα στην αρχή, αυτή μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Υπάρχει, λοιπόν, μια ένδειξη ότι τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται στην υψηλή θερμοκρασία των 45°C, διότι απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά την οξείδωση των λιπαρών στο κακάο. Από την άλλη πλευρά, το κακάο με 10% περιεκτικότητα σε λιπαρά έχει πιο μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα η



οποία παραμένει πρακτικά σταθερή με την πάροδο του χρονικού διαστήματος των τριών μηνών.

## 14.2 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός του φαινολικού περιεχομένου του κακάο γίνεται όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 10.3. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιείται για τη σκόνη κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά για την αρχική χρονική στιγμή και για την χρονική στιγμή  $t=90$  ημέρες. Το δείγμα που αξιοποιείται για τον προσδιορισμό στις 90 ημέρες ήταν αποθηκευμένο στους  $45^{\circ}\text{C}$  ώστε να προκύψει η μέγιστη μεταβολή του φαινολικού φορτίου. Επιλέγεται το κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά διότι αυτό παρουσιάζει μεταβολή της αντιοξειδωτικής του δράσης. Ελέγχεται δηλαδή αν η μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης οφείλεται στην μείωση του φαινολικού του φορτίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/g κακάο) και αυτό επιτυγχάνεται με την κατασκευή της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς.



Διάγραμμα 12: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Πίνακας 13: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, κατά την έναρξη και κατά την ολοκλήρωσή της μελέτης, αποθηκευμένη στους  $45^{\circ}\text{C}$ .

Κακάο περιεκτικότητας 20% σε λιπαρά	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g κακάο)
t=0 ημέρες	23,8
t=90 ημέρες	14,9

Το πολυφαινολικό περιεχόμενο της σκόνης κακάο συνάδει με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών όπως και με του Waterhouse, 2006 τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 4. Την αρχική χρονική στιγμή προκύπτει λίγο υψηλότερο και αυτό ενδέχεται να οφείλεται στη χρήση διαφορετικού διαλύτη εκχύλισης. Κατά την αποθήκευση του κακάο στους 45°C για το χρονικό διάστημα των τριών μηνών παρατηρείται μείωση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου κατά 37%.

## V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα έξι δείγματα σκονών κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά και τα έξι δείγματα σκονών κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά κρίνονται μικροβιολογικά ασφαλή για το χρονικό διάστημα των τριών μηνών, ανεξαρτήτως των συνθηκών αποθήκευσης. Σημειώνεται ότι κατά τον χρόνο αποθήκευσης των 90 ημερών εντοπίστηκαν μικροβιακές αποικίες στα δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά χωρίς όμως να επηρεάζουν τη μικροβιολογική σταθερότητα των δειγμάτων. Σε κανένα από τα δείγματα σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά δεν αναπτύχθηκαν αποικίες. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση των σκονών κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 20%, συμπεραίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση προσδίδει αντιμικροβιακή προστασία. Με άλλα λόγια προκύπτει ότι κάποιες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι λιπόφιλες και για αυτό είναι περισσότερες στο κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά προστατεύοντάς το έτσι από την μικροβιακή αλλοίωση.

Σχετικά με την μελέτη της οξείδωσης των λιπαρών, αναφέρεται πρώτα ότι το εργαστηριακό πρωτόκολλο απομόνωσης των λιπαρών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα δεν επιβαρύνει την οξειδωτική κατάσταση των λιπαρών σωμάτων, λόγω των ήπιων συνθηκών εκχύλισης, παραλαμβάνεται σχεδόν όλη η ποσότητα των περιεχόμενων λιπαρών και δεν απαιτεί προετοιμασία και πολύ χρόνο.

Η παρακολούθηση της οξειδωτικής κατάστασης με τον αριθμό υπεροξειδίων για τα έξι δείγματα σκονών κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά και για τα 6 δείγματα με 10% λιπαρά οδηγεί στην διαπίστωση ότι το περιεχόμενο βούτυρο κακάο δεν παρουσιάζει αξιόλογη οξείδωση στο διάστημα των τριών μηνών. Σε κανένα από τα δείγματα 62 δείγματα σκονών κακάο ο αριθμός υπεροξειδίων δεν υπερέβη την τιμή των 18 mEq/kg βουτύρου κακάο, ανεξαρτήτως των συνθηκών αποθήκευσης. Δεδομένου ότι το βούτυρο κακάο είναι μόνο ένα ποσοστό της σκόνης κακάο, η οξειδωτική αλλοίωση δεν επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων στο διάστημα αυτό.

Όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές ουσίες στο κακάο, οι δύο σκόνες κακάο (περιεκτικότητας 10% και 20% σε λιπαρά) παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά. Η αποθήκευση των σκονών κακάο στους 45°C για το χρονικό διάστημα των τριών μηνών επιδρά μόνο στο κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά το οποίο έχει ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κακάο με 10% περιεκτικότητα λιπαρών πρακτικά δεν μεταβάλλεται. Η έντονη μείωση της

αντιοξειδωτικής ικανότητας για το κακάο με 20% λιπαρά οφείλεται στην μείωση των πολυφαινολικών συστατικών του κατά 37%. Η συγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών στο κακάο είναι υψηλή, κυρίως κατά των έναρξη της αποθήκευσής του, και συγκρίσιμη με τρόφιμα πλούσια σε πολυφαινόλες.

Συνοπτικά, η σκόνη κακάο, όπως αναμενόταν, είναι ένα ιδιαίτερα σταθερό τρόφιμο. Στο χρονικό διάστημα των τριών μηνών δεν παρουσιάζει μικροβιακή ανάπτυξη και τα περιεχόμενα λιπαρά του δεν οξειδώνονται ανεξάρτητα των συνθηκών αποθήκευσης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά είναι υψηλότερη από την αντιοξειδωτική ικανότητα της σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά. Ωστόσο, η αποθήκευση των σκονών στην ακραία θερμοκρασία αποθήκευσης των 45°C μειώνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση και το πολυφαινολικό φορτίο της σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά. Επομένως είναι σημαντικό η αποθήκευση σε υψηλές θερμοκρασίες να αποφεύγεται.

Η παρούσα μελέτη της αλλοίωσης και της ποιοτικής υποβάθμισης της σκόνης κακάο δεν είναι ολοκληρωμένη. Όπως προκύπτει από την εργασία, οι σκόνες κακάο είναι ιδιαίτερα σταθερά προϊόντα με μεγάλη διάρκεια ζωής. Για αυτό προτείνεται η μελέτη της αλλοίωσης των σκονών κακάο για ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ανάλογο του χρόνου ζωής του προϊόντος δηλαδή ένα με δύο χρόνια. Επιπρόσθετα, κρίνεται σημαντικό να διερευνηθεί η μεταβολή των πτητικών του συστατικών τα οποία συμβάλλουν καθοριστικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των γλυκισμάτων και των ροφημάτων που περιέχουν κακάο. Πτητικές ουσίες προκύπτουν από την οξείδωση των λιπαρών και την διάσπαση των αντιοξειδωτικών. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να γίνει με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας και τα αποτελέσματα να συσχετιστούν με οργανοληπτικούς ελέγχους. Γενικά η διερεύνηση του προφίλ των πτητικών ουσιών κατά την αλλοίωση της σκόνης κακάο είναι σημαντική γιατί εκτός από τα προϊόντα αποσύνθεσης ενδέχεται να συμβεί και απώλεια αρωματικών ουσιών που συμβάλλουν στην ποιότητα του τροφίμου καθοριστικά. Κατά αυτόν τον τρόπο θα εντοπιστεί η κρίσιμη παράμετρος της αλλοίωσης και θα γίνει προσδιορισμός του χρόνου ζωής του τροφίμου αλλά και της ποιότητας εν γένει της σκόνης κακάο.

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilera, Jose Miguel. "Solid-liquid extraction." *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-* (2003): 35-56.

Antolovich, Michael, et al. "Methods for testing antioxidant activity." *Analyst* 127.1 (2002): 183-198.

Aprotosoae, Ana Clara, Simon Vlad Luca, and Anca Miron. "Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15.1 (2016): 73-91.

Barriuso, Blanca, Iciar Astiasarán, and Diana Ansorena. "A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task." *European Food Research and Technology* 236.1 (2013): 1-15.

Belitz, H. D., W. Grosch, and P. Schieberle. "Food chemistry, 4th revised and extended edn." Berlin (DE): Springer (2009).

Bencko, Vladimír. *Hygiene & Epidemiology: Selected Chapters*. Karolinum, 2004.

Brand-Williams, Wendy, Marie-Elisabeth Cuvelier, and C. L. W. T. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT-Food science and Technology* 28.1 (1995): 25-30.

Brcanovic, Jelena M., et al. "Cyclic voltammetric determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds." *Food Technology and Biotechnology* 51.4 (2013): 460.

Bresson, Serge, et al. "Raman spectroscopy of the polymorphic forms and liquid state of cocoa butter." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113.8 (2011): 992-1004.

Chaiyasit, Wilailuk, et al. "Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47.3 (2007): 299-317.

Chakrabarty, M. M. *Chemistry and technology of oils & fats*. Vol. 1. Allied Publishers, 2003.

Chen, Xiaoying, and Dong U. Ahn. "Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe<sup>2+</sup> or ultraviolet light." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75.12 (1998): 1717.

Cooper, Karen A., et al. "Cocoa and health: a decade of research." *British Journal of Nutrition* 99.01 (2008): 1-11.

Damodaran, Srinivasan, Kirk L. Parkin, and Owen R. Fennema, eds. *Fennema's food chemistry*. CRC press, 2007.

Damodaran, Srinivasan, Kirk L. Parkin, and Owen R. Fennema, eds. *Fennema's food chemistry*. CRC press, 2007.

Eskin, N. A. M., and R. Przybylski. "Antioxidants and shelf life of foods." *Food shelf life stability: chemical, biochemical, and microbiological changes*. CRC Press, 2000.

Farhoosh, Reza, and S. M. R. Moosavi. "Evaluating the performance of peroxide and conjugated diene values in monitoring quality of used frying oils." *Journal of Agricultural Science and Technology* 11 (2010): 173-179.

Gabis, D. A., B. E. Langlois, and A. W. Rudnick. "Microbiological examination of cocoa powder." *Applied microbiology* 20.4 (1970): 644-645

Gu, Liwei, et al. "Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54.11 (2006): 4057-4061.

Han, Xiuzhen, Tao Shen, and Hongxiang Lou. "Dietary polyphenols and their biological significance." *International Journal of Molecular Sciences* 8.9 (2007): 950-988.

Han, Xiuzhen, Tao Shen, and Hongxiang Lou. "Dietary polyphenols and their biological significance." *International Journal of Molecular Sciences* 8.9 (2007): 950-988.

Jalil, Abbe Maleyki Mhd, and Amin Ismail. "Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?." *Molecules* 13.9 (2008): 2190-2219.

Lee, Ki Won, et al. "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine." *Journal of agricultural and food chemistry* 51.25 (2003): 7292-7295.

Miller, Kenneth B., et al. "Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54.11 (2006): 4062-4068.

Niemenak, Nicolas, et al. "Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents." *Journal of Food Composition and Analysis* 19.6 (2006): 612-619.

Pérez-Jiménez, Jara, et al. "Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results." *Food Research International* 41.3 (2008): 274-285.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.

Semb, Thea Norveel. *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils*. MS thesis. Institutt for bioteknologi, 2012.

Shahidi, Fereidoon, and Udaya N. Wanasundara. "Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils." *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology* (2002): 387-403.

Shahidi, Fereidoon, and Ying Zhong. "Lipid oxidation: measurement methods." *Bailey's industrial oil and fat products* (2005).

Singh, R. P., and B. A. Anderson. "The major types of food spoilage: an overview." *Understanding and measuring the shelf-life of food* (2004): 3-23.

Singh, T. K., and K. R. Cadwallader. "Ways of measuring shelf-life and spoilage." *Understanding and measuring the shelf-life of food* (2004): 165-183.

Taoukis, P. S., and M. C. Giannakourou. "Temperature and food stability: analysis and control." *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food* (2004): 42-68.

Tomas-Barberán, Francisco A., et al. "A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55.10 (2007): 3926-3

Vinson, Joe A., John Proch, and Ligia Zubik. "Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47.12 (1999): 4821-4824.

Waterhouse, Andrew L., Joseph R. Shirley, and Jennifer L. Donovan. "Antioxidants in chocolate." *The Lancet* 348.9030 (1996): 834.

Wollgast, Jan, and Elke Anklam. "Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?." *Food Research International* 33.6 (2000): 449-459.

Wollgast, Jan, and Elke Anklam. "Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification." *Food Research International* 33.6 (2000): 423-447.

Zheng, Wei, and Shiow Y. Wang. "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs." *Journal of Agricultural and Food chemistry* 49.11 (2001): 5165-5170.

Zumbé, Albert. "Polyphenols in cocoa: are there health benefits?." *Nutrition Bulletin* 23.1 (1998): 94-102.

Όξενκιουν-Πετροπούλου, Μ. "Φυσικές Μέθοδοι ανάλυσης-Οπτικές Μέθοδοι." εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα (1987)

Ταούκης Π. & Ωραιοπούλου Β. , Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, εκδόσεις Ε.Μ.Π. , Αθήνα (2009)

Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Συστατικά – Ιδιότητες – Ποιότητα – Μικροβιολογία – Ρεολογία – Συσκευασία, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα (2009)

Ruíz, Antonio, and Bernhard Lendl. "A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection." *Analyst* 126.2 (2001): 242-246.

Velasco, Joaquín, and Carmen Dobarganes. "Oxidative stability of virgin olive oil." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104.9-10 (2002): 661-676.

<https://hyserve.com/>



## VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 14: Προτογενείς μετρήσεις Ιωδομετρίας και αριθμός υπεροξειδίων**

Χρόνος (ημέρες)	Περιεκτικότητα σε βούτυρο κακάο (%)	Συνθήκες αποθήκευσης		Βάρος βουτύρου κακάο (g)	Όγκος Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mL)	Αριθμός Υπεροξειδίων (mEq/kg βουτύρου κακάο)
		Θερμοκρασία (°C)	Υγρασία (%RH)			
0	10	-	-	1,0955	0,9	7,0
0	20	-	-	1,4828	1,2	9,8
7	10	25	90	0,8612	0,9	7,0
7	10	45	80	0,9343	1,2	9,6
7	10	45	30	1,0024	1	7,0
7	10	35	80	1,0085	0,9	5,9
7	10	25	30	0,9558	1,3	12,6
7	10	35	30	1,0305	1,3	11,6
7	20	45	80	1,0354	1,4	11,6
7	20	35	80	0,5797	1	15,5
7	20	25	90	1,1228	2,2	18,7
7	20	45	30	1,0647	1,2	10,3
7	20	25	30	0,9045	1,2	12,2
7	20	35	30	0,8946	0,9	7,8
15	10	35	30	0,9312	0,9	8,6
15	10	25	90	1,009	1,1	9,9
15	10	45	30	1,0684	1,1	9,4
15	10	25	30	0,9763	0,9	8,2
15	10	35	80	1,0289	1,7	15,6
15	10	45	80	1,0506	1	8,6
15	20	45	80	0,9995	1,5	13,0
15	20	45	30	1,0297	1,1	9,7
15	20	35	80	0,6871	1,5	18,9
15	20	25	30	1,1445	0,9	6,1
15	20	35	30	0,9221	1	8,7
15	20	25	90	0,9575	0,8	6,3
30	10	25	30	1,0133	1,1	10,4
30	10	35	30	1,0687	0,9	8,0
30	10	35	80	1,0325	0,9	8,2

30	10	45	30	1,0403	0,9	8,2
30	10	25	90	1,0329	0,9	8,2
30	10	45	80	1,0358	0,9	8,7
30	20	25	30	1,064	1	7,5
30	20	35	30	1,049	1,6	13,3
30	20	35	80	1,1622	0,8	5,6
30	20	25	90	1,0214	1	7,8
30	20	45	30	1,0195	0,9	6,9
30	20	45	80	0,9059	1,2	9,9
60	10	25	30	1,0627	0,8	6,1
60	10	35	30	1,1543	0,9	6,5
60	10	25	90	1,0642	0,9	7,0
60	10	35	80	1,0407	0,9	6,7
60	10	45	30	1,2678	1,1	7,1
60	10	45	80	1,0789	0,8	5,6
60	20	35	80	0,7661	0,6	7,8
60	20	35	30	1,0566	0,8	7,6
60	20	25	30	1,18	0,8	6,8
60	20	45	30	1,0233	0,75	7,3
60	20	25	90	1,0397	0,8	6,3
60	20	45	80	1,2596	0,9	6,0
90	10	35	30	1,0208	0,8	5,9
90	10	25	30	1,1151	0,95	6,7
90	10	25	90	1,026	0,9	6,8
90	10	35	80	1,1419	0,9	6,1
90	10	45	30	1,0148	1	7,9
90	10	45	80	1,2352	1,1	7,3
90	20	25	30	1,2669	1,3	8,3
90	20	25	90	1,0449	1	7,7
90	20	35	80	1,0244	0,9	6,8
90	20	35	30	1,0043	0,85	6,5
90	20	45	30	1,1756	0,95	6,4
90	20	45	80	1,0343	1	7,7

**Πίνακας 15:** Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC50 για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά στην έναρξη της αποθήκευσης (t=0)

Συγκέντρωση δείγματος (mg εκχυλίσματος/ml διαλύτη)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 515nm		%SCA	%REM
	DPPH	20min		
1,833	0,866	0,073	91,570	8,429
0,916	0,848	0,238	71,933	28,066
0,458	0,881	0,615	30,192	69,804
0,229	0,823	0,628	23,693	76,306
0,057	0,862	0,779	9,628	90,371

**Πίνακας 16:** Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC50 για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά στην έναρξη της αποθήκευσης (t=0)

Συγκέντρωση δείγματος (mg εκχυλίσματος/ml διαλύτη)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 515nm		%SCA	%REM
	DPPH	20min		
1,852	0,859	0,149	82,654	17,345
0,926	0,858	0,398	53,613	46,386
0,463	0,863	0,631	26,882	73,117
0,231	0,859	0,698	18,742	81,257
0,058	0,855	0,763	10,760	89,239

**Πίνακας 17: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC50 για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά στο χρόνο των 90 ημερών**

Συγκέντρωση δείγματος (mg εκχυλίσματος/ml διαλύτη)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 515nm		%SCA	%REM
	DPPH	20min		
1,785	0,853	0,18	78,898	21,102
0,892	0,857	0,433	49,475	50,525
0,446	0,832	0,536	35,577	64,423
0,223	0,856	0,709	17,173	82,827
0,056	0,856	0,755	11,799	88,201

**Πίνακας 18: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC50 για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά στο χρόνο των 90 ημερών**

Συγκέντρωση δείγματος (mg εκχυλίσματος/ml διαλύτη)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΑ 515nm		%SCA	%REM
	DPPH	20min		
1,785	0,875	0,148	83,086	16,914
0,892	0,820	0,481	41,341	58,659
0,446	0,853	0,571	33,060	66,940
0,223	0,852	0,696	18,310	81,690
0,056	0,838	0,748	10,740	89,260

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Θεωρητική ανάπτυξη πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης συναρτήσει του χρόνου (Frankel, 2005).....	21
Διάγραμμα 2: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 20°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (90% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	66
Διάγραμμα 3: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 35°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	67
Διάγραμμα 4: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 45°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	68
Διάγραμμα 5: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 20°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (90% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	69
Διάγραμμα 6: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 35°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	70
Διάγραμμα 7: Αριθμός υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά, αποθηκευμένα στους 45°C, το ένα σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας (80% RH) και το δεύτερο σε χαμηλής υγρασίας (30% RH).....	71
Διάγραμμα 8: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% κατά τη χρονική στιγμή $t=0$ ημέρες .....	73
Διάγραμμα 9: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% κατά τη χρονική στιγμή $t=90$ ημέρες, αποθηκευμένο στους 45°C.....	74
Διάγραμμα 10: Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% κατά τη χρονική στιγμή $t=0$ ημέρες .....	74

Διάγραμμα 11: : Εναπομένουσα ρίζα DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού για το δείγμα κάκαο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% κατά τη χρονική στιγμή t=90 ημέρες, αποθηκευμένο στους 45°C.....	75
Διάγραμμα 12: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος .....	76

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Παγκόσμια παραγωγή κακάο κατά το 2013-2014.....	4
Εικόνα 2: Οι καρποί του δέντρου Theobroma cacao.....	5
Εικόνα 3: Εσωτερικό καρπού όπου διακρίνονται οι σπόροι και η πούλπα.....	5
Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής παραγωγής σκόνης κακάο .....	9
Εικόνα 5: Δομή φαινολικών ενώσεων του κακάο .....	12
Εικόνα 6: Τα αλκαλοειδή του κακάο: Καφεΐνη, Θεοφιλίνη και Θεοβρωμίνη.....	13
Εικόνα 7: Δομή φλαβονοειδών.....	23
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης ρίζας DPPH με αντιοξειδωτική ένωση AH, απενεργοποίησής της και αποχρωματισμός του διαλύματός της.....	27
Εικόνα 9: Διαγραμματική παρουσίαση της διαμόρφωσης των εξαρτημάτων ενός φασματόμετρου Raman .....	34
Εικόνα 10: Διαγραμματική παρουσίαση της διαμόρφωσης των εξαρτημάτων ενός UV-Vis φασματόμετρου.....	35
Εικόνα 11: Πλαστικό δοχείο στο οποίο έχουν αποθηκευτεί η σκόνη κακάο με 10% περιεκτικότητα σε λιπαρά και η σκόνη με 20%.....	40
Εικόνα 12: Απαγωγός μικροβιολογικής ασφάλειας, Nüve.....	41
Εικόνα 13: Μικροβιακή ανάλυση στον απαγωγό μικροβιακής ασφάλειας.....	43
Εικόνα 14: Η συσκευή ομογενοποίησης BagMixer και η συσκευή ανάδευσης Vortex .....	43
Εικόνα 15: Αποστειρωμένα τρυβλία με ξηρό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη του ολικού μικροβιακού φορτίου .....	45
Εικόνα 16: Αποικίες μικροοργανισμών.....	45
Εικόνα 17: Αποθήκευση τρυβλίων σε φούρνο ο οποίος λειτουργεί στη θερμοκρασία επώασης.....	45
Εικόνα 18: Δοχείο εκχύλισης με κακάο και πετρελαϊκό αιθέρα εντός της συσκευής εκχύλισης με μικροκύματα .....	47
Εικόνα 19: Συσκευή εκχύλισης Εικόνα 20: περιστροφικός εξατμιστήρας.....	47
Εικόνα 21: Η δεξιά κωνική φιάλη περιέχει βούτυρο κακάο διαλυμένο στον οργανικό διαλύτη, ενώ η αριστερή περιέχει το διάλυμα αυτό και KI. Ο σχηματισμός I <sub>2</sub> οφείλεται για το κίτρινο χρώμα.....	50
Εικόνα 22: Μίγμα διαλυμένου βουτύρου κακάο και I <sub>2</sub> και αμύλου. Το σύμπλοκο αμύλου και Ιωδίου δίνει αυτό το χαρακτηριστικό μπλε- μωβ χρώμα. ....	51
Εικόνα 23: Ογκομέτρηση Ιωδίου και αποχρωματισμός συμπλόκου με Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	51
Εικόνα 24: Φασματόμετρο Raman .....	55
Εικόνα 25: Συσκευή εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπέρηχους.....	57
Εικόνα 26: Διαλύματα DPPH- αντιοξειδωτικών. Μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών προκαλεί εντονότερο αποχρωματισμό του μωβ διαλύματος της ρίζας.....	59

Εικόνα 27: Αριστερά φαίνεται το διάλυμα του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu με το εκχύλισμα πολυφαινολών και δεξιά το τυφλό διάλυμα .....	60
Εικόνα 28: Φάσμα Raman του βουτύρου κακάο κατά την έναρξη της μελέτης..	72
Εικόνα 29: Φάσμα Raman βουτύρου κακάο από αλλοιωμένη σκόνη.....	72



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επί τοις εκατό σύσταση κόκκων κακάο .....	10
Πίνακας 2: Επί τοις εκατό σύσταση σε λιπαρά οξέα του βουτύρου κακάο .....	10
Πίνακας 3: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο σπόρων κακάο ως προς την ποικιλία και την γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας.....	12
Πίνακας 4: Πολυφαινολικό περιεχόμενο τελικών προϊόντων (Waterhouse et al., 2006) .....	13
Πίνακας 5: Τα άλατα που αξιοποιούνται για την επίτευξη της επιθυμητής σχετικής υγρασίας και οι διαλυτότητές τους .....	40
Πίνακας 6: Ποσότητα δείγματος, θερμοκρασία και διάστημα επώασης για την ανάπτυξη των επιλεγμένων μικροοργανισμών .....	44
Πίνακας 7: Ρυθμίσεις φασματομέτρου Raman.....	54
Πίνακας 8: Αριθμός αποικιών και λογάριθμος μικροβιακού πληθυσμού ανά γραμμάριο δείγματος για την μικροβιακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους τρεις μήνες .....	62
Πίνακας 9: Πραγματική και πειραματική περιεκτικότητα σε λιπαρά των δύο σκονών κακάο .....	64
Πίνακας 10: Αριθμός υπεροξειδίων δειγμάτων σκόνης κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 20% συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης .....	65
Πίνακας 11: Αριθμός υπεροξειδίων δειγμάτων σκόνης κακάο με περιεκτικότητα λιπαρών 10% συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης .....	69
Πίνακας 12: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων σκονών κακάο, στις οποίες έχουν απομακρυνθεί τα λιπαρά, εκφρασμένη στη συγκέντρωση εξουδετέρωσης του 50% της ρίζας DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL).....	75
Πίνακας 13: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο σκόνης κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά, κατά την έναρξη και κατά την ολοκλήρωσή της μελέτης, αποθηκευμένη στους 45°C.....	76
Πίνακας 14: Πρωτογενείς μετρήσεις Ιωδομετρίας και αριθμός υπεροξειδίων ....	84
Πίνακας 15: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC <sub>50</sub> για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά στην έναρξη της αποθήκευσης (t=0) .....	86
Πίνακας 16: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC <sub>50</sub> για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά στην έναρξη της αποθήκευσης (t=0) .....	86
Πίνακας 17: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC <sub>50</sub> για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 10% σε λιπαρά στο χρόνο των 90 ημερών.....	87
Πίνακας 18: Δεδομένα για τον προσδιορισμό IC <sub>50</sub> για το δείγμα κακάο με περιεκτικότητα 20% σε λιπαρά στο χρόνο των 90 ημερών.....	87