



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



**ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΛΟΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ-
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΑΡΘΕΝΟΥ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**



ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Dr. ΚΥΡΙΤΣΑΚΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

ΓΙΑΝΝΟΥ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ
2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή καθηγητή της πτυχιακής μου διατριβής Dr. Κυριτσάκη Απόστολο για την συμπαράσταση του καθ'ολη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και ιδιαιτέρως τον κύριο Σωτηρούδη Θεόδωρο ερευνητή βαθμίδος Α` και τον κύριο Ξενάκη Αριστείδη ερευνητή βαθμίδος Α` και όλο το υπόλοιπο προσωπικό για την πολύτιμη βοήθεια τους.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Γιάννου Μαργαρίτα

ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής,
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη Τ. θ. 14561

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παρουσία πρωτεϊνικών ουσιών σε παρθένο ελαιόλαδο και η συνύπαρξη αυτών με πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση του συμπλόκου.

Για την απομόνωση και το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και των πολυφαινολών χρησιμοποιήθηκε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και εκχύλιση με μεθανόλη.

Ακολούθησε υπερδιήθηση των κλασμάτων σε μεμβράνη με όριο μοριακού βάρους 10000 dalton, για την μελέτη των μορίων πολυφαινολών, πρωτεϊνών ή τυχόν συμπλόκων αυτών.

Ο περαιτέρω διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με χρωματογραφία υδατικού εκχυλίσματος σε στήλη sephacryl S-300.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, των πολυφαινολών και των υπαρχόντων υδατανθράκων έγινε με τις μεθόδους Bradford, Folin και Dubois αντίστοιχα.

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του συμπλόκου πρωτεϊνών- πολυφαινολών που προέκυψαν από την ανωτέρω επεξεργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος DPPH.

Από τις δύο μεθόδους εκχύλισης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν η εκχύλιση με μεθανόλη έδωσε μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεϊνών και πολυφαινολών σε σχέση με την εκχύλιση του ελαιολάδου με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Η χρωματογραφική ανάλυση με στήλη Sephacryl s-300 έδειξε την ύπαρξη συμπλόκων πρωτεϊνών-πολυφαινολών. Η χρήση της υπερδιήθησης έδειξε ότι το σύνολο των κλασμάτων πολυφαινολών, πρωτεϊνών και συμπλόκων πρωτεϊνών - πολυφαινολών παρουσίασε $MB < 10000$.

Τέλος διαπιστώθηκε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση με την χρήση της μεθόδου DPPH η οποία μπορεί να οφείλεται τόσο σε ελεύθερες πολυφαινόλες που υπήρχαν στα δειγματά μας όσο και σε σύμπλοκα πολυφαινολών-πρωτεϊνών τα οποία ήταν αδύνατον να διαχωριστούν με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.

STUDY OF PROTEIN FRACTIONS OF VIRGIN OLIVE OIL

GIANNOU MARGARITA

ATEI Thessalonikis school of food Technology and Nutrition

,Department of Food Technology , 54101 Thessaloniki

T. 0. 14561

SUMMARY

In this study, the presence of protein in virgin olive oil and the ,coexistence of these polyphenolic compoundw and antioxidant activity of the proteasome.

For the isolation and separation of proteins and polyphenols used aqueous buffer and precipitation with ammonium sulfate and extracted with methanol.

Followed by ultrafiltration membrane fractions with a limit of molecular weight 10000 dalton, for the study of polyphenol molecules, proteins or any of this complexes.

The further separation of proteins was by chromatography on a column of aqueous extract sephacryl s-300.

To determine the concentration of protein, polyphenols and carbohydrates were existing methods of folin, Bradford and Dubois respectively.

To study the antioxidant activity of polyphenol-protein complex derived from the above treatment was applied DPPH.

Of the two methods for extracting proteins used extraction with methanol gave the largest amounts of proteins and polyphenols in relation to the extraction of oil with an aqueous buffer.

The chromatographic analysis column sephacryl s-300 showed the presence of protein –polyphenol complexes. The use of ultrafiltration showed that all fractions of polyphenols proteins and protein-polyphenol complexes showed MB<10000

Finally found significant antioxidant activity using the method of DPPH which may be due to both free polyphenols exist in our samples and a polyphenol-protein complexes which could not be separated by the methodology used.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	8
2.1. Η ΕΛΙΑ	9
2.2. ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	10
2.3. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	12
2.4. ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ TAG	16
2.4.1 ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	16
2.5. ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ	20
2.6. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	25
2.6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
2.6.2 ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗ ΤΑΓΓΙΣΗ-ΛΙΠΟΛΥΣΗ	25
2.6.3 ΑΥΤΟΞΕΙΔΩΣΗ-ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	26
2.6.4. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	27
2.6.5. ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ	30
2.6.6. ΜΗ- ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΜΑΥΡΩΣΗ	31
2.7. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	32
2.7.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	33
2.7.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	35
2.8. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	37
2.8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	37
2.8.2. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ-ΔΟΜΕΣ	38
2.8.3. ΓΑΛΑΚΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ	40
2.8.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΟΥ	

ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ-----	41
2.8.5.ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ-----	41
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-----	42
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ-----	43
4.1. ΥΛΙΚΑ-----	43
4.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-----	43
4.3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ-----	43
4.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ-----	44
4.4.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BRADFORD -----	44
4.4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ FOLIN. -----	45
4.4.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ DUBOIS-----	46
4.5. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ-----	48
4.5.1 2 ^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ-----	48
4.5.2 3 ^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.-----	49
4.6. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ-----	49
4.6.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ Sephacryl S-300-----	49
4.6.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ Sephadex G-25.-----	51
4.7.ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ POLYCLAR.-----	53
4.8. ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ -----	54
4.9. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.-----	56
4.10 ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ----- -----	56
4.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΖΗΜΑ ΘΕΪΚΟΥ ΑΜΜΩΝΙΟΥ ΜΕ ΥΔΡΟΦΟΒΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ SDS-----	58
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ -----	59
5.1. 1 ^η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ	

ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .-----	59
5.1.1.ΠΡΩΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ-----	59
5.1.2.ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ-----	61
5.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ ΣΕ ΣΤΗΛΗ SEPHACRYL S-300-----	62
5.3 3 ^η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ-----	64
5.3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ----- -----	65
5.3.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ POLYCLAR -----	66
5.3.3.ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΖΗΜΑ ΘΕΪΚΟΥ ΑΜΜΩΝΙΟΥ ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ SDS-----	66
5.3.4.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ Sephadex G-25 ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΙΖΗΜΑΤΟΣ ΘΕΪΚΟΥ ΑΜΜΩΝΙΟΥ-----	68
5.3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 9----- -----	75
5.3.6 ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 7-----	76
5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ-----	76
5.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ/ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ-----	77
5.6 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ POLYCLAR-----	78
5.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ Sephadex G-25 ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ-----	79
5.7.1.ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΥΨΗΛΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ-----	81
5.7.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 7----- -----	84
5.7.3. ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 6 -----	85
6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-----	87
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-----	89

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

EV ₅₀	Efficient Concentration Η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την ελάττωση της αρχικής συγκέντρωσης της ρίζας κατά 50%.
A	Οπτική απορρόφηση
ΔΕΟ	Δραστικά είδη οξυγόνου
DMPD	N,N-διμέθυλο-p-φαίνυλενοδιαμίνη
DPPH	α,α-διφενυλ-β-πικρυλ-υδραζύλιο
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
BSA	Αλβουμίνη Βοΐου ορού
Tris	2-αμινο-2-(υδροξυμέθυλο) προπανοδιόλη 1,3
MB	Μοριακό Βάρος
MC	4-μεθυλοκατεχόλη
UV/Vis	Ορατό/υπεριώδες

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το δέντρο της ελιάς αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργήσιμα δέντρα στον κόσμο (Fiorino & Nizzi 1992). Τόσο το δέντρο όσο και τα κλαδιά του συνδέονται με θρησκευτικά και λατρευτικά στοιχεία διαφορετικών λαών. Οι σύγχρονοι ιστορικοί θεωρούν την καλλιέργεια του δέντρου της ελιάς δείγμα ανάπτυξης πολιτισμού και κουλτούρας των λαών, επομένως και λόγο μελέτης ενός λαού(Chazau 1994). Στην αρχαιότητα το δέντρο της ελιάς συμβόλιζε τη φιλία και την ειρήνη μεταξύ των εθνών. Τους ολυμπιονίκες τους στεφάνωναν με τον κότινο, στεφάνι από κλαδί ελιάς. Το δέντρο, επίσης, συμβόλιζε την ευημερία και τη γνώση.

Υπάρχουν πολλά είδη ελαιοδέντρων, αλλά το πιο διαδεδομένο είναι το *Olea europaea*. Η καταγωγή αυτών των ειδών αποτελεί θέμα διαμάχης (Loukas & Krimbass 1983). Το ελαιόδεντρο *Olea europaea* καλλιεργείται στις Μεσογειακές χώρες, ειδικά στην Ιταλία, στην Ελλάδα και στην Ισπανία, εδώ και χιλιάδες χρόνια και αποτελεί για τους λαούς που τις κατοικούν πηγή πλούτου και ευημερίας. Το βασικό προϊόν που παράγεται από το ελαιόδεντρο, το ελαιόλαδο, είναι ένα υψηλής θερμιδικής αξίας προϊόν με ευγενή χαρακτηριστικά και αποτελεί τη βάση της μεσογειακής διατροφής.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. Η ΕΛΙΑ

Πολλά είδη ελαιοδέντρων είναι γνωστά, αλλά το πιο διαδεδομένο είναι το *Olea europaea*. Το είδος *Olea europaea* ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας των Ελαιϊδών (*Oleaceae*). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 35 είδη αειθαλών θάμνων και δέντρων. Είναι δέντρο αιωνόβιο και μια εξήγηση της μακροβιότητάς του έγκειται στην ανθεκτικότητα και την ικανότητά του να βλαστάνει από οφθαλμούς του κάτω μέρους του κορμού του. Συναντάται σε ξηρές και ημίξερές περιοχές και ευδοκμεί ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, όπου οι βροχοπτώσεις είναι συχνές από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη. Στην Ελλάδα καλλιεργείται μεγάλος αριθμός ποικιλιών ελιάς, από τις οποίες άλλες χρησιμοποιούνται για ελαιοποίηση και άλλες για επιτραπέζια κατανάλωση. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται κυρίως για ελαιοποίηση είναι η Κορωνέικη, η Λιανολιά (Κερκύρας), η Λαδολιά, η Τσουνάτη, το Αγουρομάνακο, η Μεγαρείτικη, η Βαλανολιά, η Αδραμυττινή, η Ματολιά και η Κοθρέικη (Kiritsakis 1990; Μπαλατσούρας 1997).

Ο καρπός του δέντρου *Olea europaea* είναι δρύπη, σχήματος οβάλ, και αποτελείται από δύο κύρια μέρη: το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο (πυρήνας, κουκούτσι). Το περικάρπιο αποτελείται από το επικάρπιο (φλούδα) και το μεσοκάρπιο (σάρκα, πούλπα) που αντιστοιχεί στο 65-83% του συνολικού βάρους. Το ενδοκάρπιο, το οποίο περιέχει το ενδοσπέρμιο, αντιστοιχεί στο 13-30% του συνολικού βάρους. Η σύσταση του ελαιοκάρπου ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της καλλιέργειας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το στάδιο της ωρίμανσης. Η μέση χημική σύσταση των ελαιοκάρπων είναι: νερό (50-70%), πρωτεΐνες (1.5-3%), έλαιο (22%), υδατάνθρακες (19.1%), κυτταρίνη (5.8%), ανόργανα (τέφρα 1.5%). Άλλα σημαντικά συστατικά των ελαιοκάρπων είναι πηκτίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοΐδη και ανθοκυάνες), και γλυκοζίδια των φαινολών (ελευρωπαΐνη) (Foxhall 1993; Μπαλατσούρας 1997). Στους ελαιοκάρπους έχουν ανιχνευθεί ένζυμα, όπως κυτταρινάσες (Heredia et al., 1985), χλωροφυλλάσες (Minguez et al., 1994), πολυγαλακτουρονάση και πηκτινестεράση (Castillo et al., 1987; Minguez 1982), καθώς και

λιπάση (Kiritsakis 1990; Minguez et al.,1994) λιποξυγονάση (LOX) (Castillo et al.,1987) φαινολοξειδάση (PO) (Minguez 1982; Ben et al., 1986) και υπεροξειδάση (POD) (Olias et al.,1993).

Η ωρίμανση των ελαιοκάρπων είναι μια αργή και μακρόχρονη διαδικασία που διαρκεί αρκετούς μήνες και διαφέρει ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος της καλλιεργήσιμης περιοχής, την ποικιλία, την ηλικία και κατάσταση υγείας του ελιόδεντρου (οι καρποί των νεαρών ελαιοδέντρων ωριμάζουν γρηγορότερα λόγω ταχύτερου μεταβολισμού στα νεαρά ελαιοδέντρα), τη διαθεσιμότητα του νερού, τη θερμοκρασία, το φως (σε ηλιόλουστες περιοχές, η ωρίμανση είναι γρήγορη), τη μέθοδο της καλλιέργειας, καθώς και το είδος και την ποσότητα των λιπασμάτων. Η ωρίμανση είναι ταχεία κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου, πιο αργή κατά το δεύτερο στάδιο, τον Αύγουστο και Σεπτέμβριο, και ξανά ταχεία στο τρίτο στάδιο, το φθινόπωρο, που συμπίπτει με την αλλαγή του χρώματος από πράσινο προς κίτρινο, κόκκινο και μαύρο (Kiritsakis 1990). Σημαντικές μεταβολικές και δομικές αλλαγές έχουν παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης: σχηματισμός των ελαιωσωμάτων, μεταβολές στη βιοσύνθεση των δομικών και αποθηκευτικών λιπιδίων και στα λιπαρά οξέα του συνολικού λιπιδικού περιεχομένου (βιοσύνθεση των περισσότερο πολικών λιπιδίων στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης, αύξηση του ελαιϊκού οξέος και παράλληλη μείωση του λινελαϊκού), μείωση των σακχάρων και μεταβολές στη δραστηριότητα της LOX και της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορο-γλυκόζης με παράλληλη μεγιστοποίηση της μεταφοράς υποστρώματος από τα φύλλα στον καρπό (Kiritsakis 1990; Donaire 1984). Το βάρος του καρπού αυξάνεται μέχρι τον Οκτώβριο-Νοέμβριο και στη συνέχεια μειώνεται λόγω απώλειας της υγρασίας του. Το περιεχόμενο έτσι σε έλαιο αυξάνεται κυρίως από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο. Η συσσώρευση του ελαίου ξεκινάει στα τέλη Ιουλίου-αρχές Αυγούστου. Στη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα, ο καρπός μαυρίζει αποκτώντας τη μέγιστη περιεκτικότητα σε έλαιο. Το έλαιο συγκεντρώνεται κυρίως στο περικάρπιο (96-98%).

Προκειμένου το ελαιόλαδο να έχει χαρακτηριστικό αλλά ελαφρύ άρωμα, είναι σημαντικό να παράγεται από ώριμους και υγιείς ελαιοκάρπους.

2.2 ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Η αρχή της χρήσης του ελαιόλαδου στη διατροφή, που είναι εύλογο να δεχθούμε ότι γινόταν, σε περιορισμένη έστω κλίμακα, δεν πιστοποιείται με σαφήνεια. Μια προβληματική στην ερμηνεία λέξη, to-ro-qa/to-qa, μαρτυρημένη σε πινακίδες της Κνωσού ως προσδιοριστική του λαδιού, θεωρήθηκε ότι σημαίνει «για τροφή» (δοτ. ενικού). Η πρόταση όμως αυτή παραμένει αμφίβολη. Πιθανότατα κάποιες από τις καταχωρημένες στις πινακίδες ποσότητες απλού λαδιού να καταναλώνονταν πράγματι στην μαγειρική, ο ακριβής όμως χαρακτηρισμός τους, ως αυτονόητος, ενδεχομένως δεν κρινόταν από τους γραφείς

απαραίτητο να δηλωθεί. Αντίθετα στην πλειονότητα του το καταχωρημένο στις πινακίδες λάδι είναι είτε αρωματικό, ή προοριζόταν ως βάση για την παραγωγή αρωμάτων και αλοιφών για την φροντίδα του σώματος. Στοιχεία των πολιτισμών της Αιγύπτου και Ανατολής αποτελούν μαρτυρίες των ποικίλων βιοτεχνικών χρήσεων του λαδιού, όπως για παράδειγμα στη βυρσοδεψία και την υφαντική (Μπουλώτης 1993).

Το ελαιόλαδο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατροφή, την οικονομία και τον πολιτισμό των κατοίκων της Μεσογείου. Η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί μια από τις πιο τυπικές καλλιέργειες της Μεσογείου με κυριότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα και ακολουθούν η Τουρκία και η Τυνησία. Άλλες χώρες με σημαντική παραγωγή ελαιόλαδου είναι η Συρία, το Μαρόκο, η Αλγερία και η Πορτογαλία. Η παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου φθάνει τους 2,000,000 τόνους και αντιστοιχεί μόνο στο 4% της παγκόσμιας παραγωγής φυτικών ελαίων και στο 2.5% της παγκόσμιας παραγωγής εδώδιμων ελαίων και λιπών .

Σύμφωνα με στοιχεία του ΙΟΟC (Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου), μέγιστη κατανάλωση ελαιόλαδου (90%) παρατηρείται στις χώρες που το παράγουν. Οι χώρες που παράγουν και εξάγουν ελαιόλαδο έχουν σταθερή κατανάλωση που κυμαίνεται μεταξύ 1,520,000 και 1,580,000 τόνων. Οι χώρες που είναι κυρίως εισαγωγείς ελαιόλαδου, αν και ελαιοπαραγωγικές, έχουν πολύ χαμηλότερη κατανάλωση (199,000 τόνους), αλλά τείνουν να την αυξήσουν, όπως επίσης και χώρες, που κάνουν μόνο εισαγωγή, παρουσιάζουν μια μικρή αυξητική τάση κατανάλωσης. Η Ελλάδα έχει το υψηλότερο επίπεδο κατανάλωσης ελαιόλαδου (220,000 τόνοι ανά χρόνο), το οποίο αντιστοιχεί σε 20kg ανά άτομο, ενώ η Ιταλία και η Ισπανία κατέχουν τη δεύτερη και τρίτη θέση αντίστοιχα .

Οι αρχαίοι αναγνώριζαν την ιατρική και κοσμετολογική αξία του ελαιόλαδου και προσέδιδαν σ' αυτό θρησκευτική υπόσταση. Πολλοί γιατροί της αρχαιότητας, μεταξύ των οποίων και ο Ιπποκράτης, αντίληφθηκαν το διπλό ρόλο του ελαιόλαδου, ως τροφή και ως φάρμακο και προήγαγαν τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Η σημασία του ελαιόλαδου στη διατροφή των ανθρώπων είναι πολύ μεγάλη. Αποτελεί ουσιώδη πηγή των απαραίτητων για τον άνθρωπο λιπιδίων, καθώς είναι πλούσιο στα απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό (18:2, ω-6) και το λινολενικό (18:3, ω-3) και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την ανάπτυξη των παιδιών. Η προστατευτική του δράση κατά των στομαχικών παθήσεων είναι ιδιαίτερος αξιοσημείωτη. Έχει θετικές και ηρεμιστικές επιδράσεις στις συσπάσεις της χοληδόχου κύστης, καθώς ενεργοποιεί την ορμόνη χοληκυστοκινίνη. Καθυστερεί έμμεσα την γήρανση λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά, που δεσμεύουν τις καταστρεπτικές για τις κυτταρικές μεμβράνες ελεύθερες ρίζες. Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου στις βιομηχανικές χώρες. Οι ασθενείς που πάσχουν από την αρτηριακή αυτή πάθηση μπορεί να έχουν γενετικές τάσεις, η ασθένεια ωστόσο σχετίζεται και με άλλους παράγοντες όπως το κάπνισμα, η έλλειψη φυσικής άσκησης, η αρτηριακή

υπέρταση, η παχυσαρκία και η υπερχοληστεριναϊμία. Μια δίαιτα βασισμένη σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως αυτά του ελαιόλαδου, επιδρά σημαντικά στο περιεχόμενο σε ολική χοληστερόλη του αίματος, που είναι πρόδρομος των στερεοϊδών ορμονών και συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών. Η ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και η LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) μειώνονται, ενώ η HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη), που αποτελεί προστατευτικό παράγοντα κατά της πάθησης των στεφανιαίων αρτηριών, αυξάνεται (Sotiroudis et al.,2003; Kefatos & Comas 1990).

Η διατροφική αξία του ελαιόλαδου γίνεται εύκολα αναγνωρίσιμη στην υγεία των καταναλωτών της περιοχής της Μεσογείου: χαμηλό ποσοστό στεφανιαίων νοσημάτων και μακρά διάρκεια ζωής.

Το ελαιόλαδο, επειδή διαχωρίζεται με φυσικές τεχνικές από τον ελαιόκαρπο, δεν είναι ποτέ μια καθαρή λιπαρή ουσία, όπως άλλες λιπαρές ουσίες, φυτικές ή ζωικές (Μπαλατσούρας 1997). Πρωτίστως αποτελείται από TAG (τριακυλο-γλυκερίδια) και δευτερευόντως από ελεύθερα λιπαρά οξέα και μη γλυκεριδικά συστατικά (0.5-1%) . Τα δευτερεύοντα αυτά συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στο άρωμα του ελαιόλαδου και για το λόγο αυτό ο ποσοτικός τους προσδιορισμός είναι καθοριστικός για την ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων του .

2.3.ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Στο ελαιόλαδο έχουν γίνει ελάχιστες αναφορές στη βιβλιογραφία στην παρουσία πρωτεϊνών, ενώ υπάρχουν αναφορές στην περιεκτικότητα διαφόρων φυτικών ελαίων (καλαμποκέλαιο, σογιέλαιο, φυσικέλαιο, ηλιέλαιο) σε πρωτεΐνες (Klurfeld 1987). Η περιεκτικότητα των ολικών πρωτεϊνών ποικίλλει μεταξύ 120 και 9380 μg /kg ελαίου, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford στην υδατική φάση μετά την εκχύλιση με μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα και ρυθμιστικού διαλύματος. Από το σογιέλαιο απομονώθηκαν επίσης λεκτίνες, ένα είδος φυτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, των οποίων η παρουσία πιστοποιήθηκε και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου. Πρωτεΐνη σόγιας έχει επίσης ανιχνευθεί με χρήση αντισωμάτων (Porras 1985).

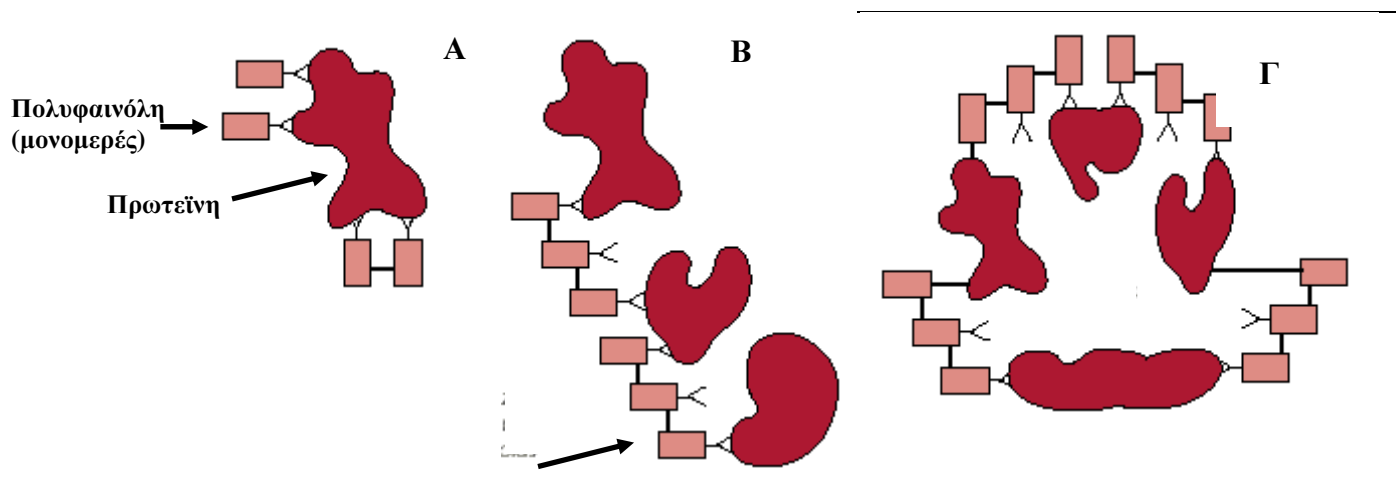
Η ερευνητική ομάδα του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών ανίχνευσε για πρώτη φορά και στη συνέχεια πραγματοποίησε (Georgalaki 1998a) ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών σε δείγματα διηθημένου και μη διηθημένου ελαιόλαδου με δύο διαφορετικές χρωματομετρικές και μία θολομετρική μέθοδο. Οι τιμές που αναφέρουν κυμάνθηκαν μεταξύ 0.28 και 0.52 mg / ml ελαιόλαδου χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Lowry και Vera, και 0.01 έως 0.04 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Είναι πιθανόν οι υψηλές τιμές που έδωσε η μέθοδος Lowry να οφείλονται σε παρεμβαλλόμενα συστατικά του ελαιόλαδου που εκχυλίζονται παράλληλα με τις πρωτεΐνες (π.χ. λιπίδια και φαινολικές ενώσεις). Πιθανό είναι επίσης η μέθοδος Bradford να δίνει χαμηλότερες τιμές εξαιτίας της εξειδίκευσης της μεθόδου προς την αργινίνη. Η ίδια ερευνητική ομάδα προχώρησε και στην ανίχνευση οξειδωτικών ενζυμικών

δράσεων στο ελαιόλαδο τόσο διηθημένο όσο και μη και ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη και δράση της λιποξυγονάσης και της πολυφαινολοξειδάσης (Georgalaki 1998a, 1998b), ένζυμα για τα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά παρακάτω.

Προσδιορισμός πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε λίπη και έλαια, περιλαμβανομένου και του ελαιολάδου, πραγματοποιήθηκε αργότερα και από τον Hidalgo και τους συνεργάτες του (Hidalgo 2001). Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε κατακρύμνιση πεπτιδίων και πρωτεϊνών με ακετόνη και προσδιορίστηκε το συνολικό ποσό πρωτεΐνης σε 40 ελαιόλαδα με HPLC. Το ποσό των πρωτεϊνών κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 50 μg / 100 g ελαιολάδου. Αναφέρουν επίσης ότι το κατακρήμνισμα πρωτεϊνών αποτελείται από ένα πολυπεπίδιο με μοριακό βάρος 4.600.

Πιο πρόσφατη αναφορά για την παρουσία πρωτεϊνών στο ελαιόλαδο έχει γίνει από τον Koidis και τους συνεργάτες του (Koidis 2006). Οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν με ακετόνη και στη συνέχεια προσδιορίστηκε το συνολικό ποσό πρωτεΐνης με τη χρωματογραφική μέθοδο Bradford. Μετρήθηκε στο συνολικό περιεχόμενο πρωτεΐνης 23 ελαιολάδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 0.05 έως 2.40 mg / kg ελαιολάδου. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μη φιλτραρισμένα ελαιόλαδα περιείχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης από τα φιλτραρισμένα. Επίσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση και σε εξευγενισμένο ελαιόλαδο, όπου το ποσό δεν ήταν ανιχνεύσιμο. Στο γεγονός ότι τα μη φιλτραρισμένα ελαιόλαδα περιείχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης αλλά και πολικών πολυφαινολών συγκριτικά με τα φιλτραρισμένα ελαιόλαδα αποδίδεται και η αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα αυτών των προϊόντων. Στην παρουσία αυτών των συστατικών αποδίδουν επίσης και τη θολερότητα που παρουσιάζουν τα μη φιλτραρισμένα ελαιόλαδα (Koidis 2006). Έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία ότι η θολερότητα που παρουσιάζουν ορισμένα ποτά, όπως οι μπίρα, το κρασί και οι χυμοί φρούτων οφείλεται τις περισσότερες φορές στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις πολυφαινόλες (Siebert 1999, Geortges 1982, Heatherbell 1976, Hough 1982). Ο λόγος πρωτεϊνών / πολυφαινολών επηρεάζει σημαντικά το μέγεθος της θολερότητας. Το θόλωμα που προκαλεί ένα πολυπεπίδιο εξαρτάται από το περιεχόμενο του σε προλίνη (Siebert 1999).

Στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 1) παρουσιάζονται τα στάδια σχηματισμού και εξέλιξης του συμπλόκου που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις πολυφαινόλες οι οποίες πιθανόν οξειδώνονται και πολυμερίζονται.



Εικόνα 1.: Σύμπλοκα μεταξύ πρωτεϊνών και πολυφαινόλων. Από αριστερά προς τα δεξιά, διάφορα στάδια σχηματισμού πολυμερών παρουσία πρωτεϊνών και απλών πολυφαινόλων (Α-Γ). Στο πρώτο στάδιο (Α) έχουμε σχηματισμό συμπλόκων μέσω απλών δεσμών υδρογόνου. Με την πάροδο του χρόνου (Β) οι πολυφαινόλες οξειδώνονται και σχηματίζουν πολυμερή πολυφαινόλων μικρών αλυσίδων (ταννοειδή) τα οποία σχηματίζουν γέφυρες με πρωτεΐνες . Μετά από περαιτέρω παραμονή (Γ) σχηματίζονται και ομοιοπολικοί δεσμοί με τις πρωτεΐνες (Rehmanji et al. 2005)

Εκτός όμως από το ελαιόλαδο μέτρηση πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε και στα απόνερα της ελαιουργίας. Από τα απόνερα της ελαιουργίας απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε χημικά ένα οργανικό σύμπλοκο πολυμερών με μέταλλα, το οποίο ονομάστηκε πολυμερίνη (Carasso, 2002). Η πολυμερίνη αποτελείται από υδατάνθρακες ($52.40 \text{ mg } 100^{-1} \text{ w/w}$), μελανίνη ($26.14 \text{ mg } 100^{-1}$), και πρωτεΐνες ($10.40 \text{ mg } 100^{-1}$),, περιείχε επίσης μονοσακχαρίτες, φαινόλες και αμινοξέα. Επίσης βρέθηκε ότι περιείχε μέταλλα ($11.06 \text{ mg } 100^{-1}$),, κυρίως K^+ και σε μικρότερα ποσοστά Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} και Cu^{2+} , τα οποία ήταν φυσικά συνδεδεμένα με τα καρβοξυλικά ανιόντα αλλά και με άλλες ομάδες πυρηνόφιλων, οι οποίες βρίσκονται στην πολυμερίνη. Χρησιμοποιώντας χρωματογραφία μοριακής διήθησης βρέθηκε ότι η πολυμερίνη έχει μοριακή μάζα μεταξύ 0.5 και 2.0 kDa και εμφανίστηκαν δύο κλάσματα. Το ένα κλάσμα αποτελείται από πρωτεΐνη, μελανίνη και πολυσακχαρίτες, τα οποία συσσωματώνονται δημιουργώντας ένα μεγαλομόριο και το άλλο κλάσμα αποτελείται μόνο από ελεύθερους πολυσακχαρίτες.

Το κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίζουμε κατά τον προσδιορισμό πρωτεϊνών σε έλαια είναι η έλλειψη μεθοδολογίας που να μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε λιποειδή υλικά. Οι μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί για υδατικά διαλύματα. Για το λόγο αυτό τα δημοσιευμένα αποτελέσματα που αφορούν το συνολικό περιεχόμενο πρωτεϊνών για

τα βρώσιμα έλαια διαφέρουν μεταξύ τους και εξαρτώνται από το είδος και την πηγή προέλευσής τους αλλά και από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση και την ανάλυση τους (Hidalgo 2006, Crevel 2000). Στον πίνακα 1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στο συνολικό περιεχόμενο πρωτεϊνών ελαιολάδου.

Εξετάζοντας το ρόλο των πρωτεϊνών στη σταθερότητα των εδώδιμων λαδιών έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι ανάλογα με τα πεπτίδια και τα αμινοξέα, τις πρωτεΐνες και τα προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες (Pokorny 2001, Rajalaksmi 1996). Επιπλέον βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες και τα προϊόντα υδρόλυσης τους μπορούν να θεωρηθούν ως συνεργεστικά ή ως κύρια αντιοξειδωτικά . Η αντιοξειδωτική αυτή ικανότητα αυξάνεται όταν οι πρωτεΐνες αντιδρούν με τα προϊόντα οξείδωσης λιπαρών υλών. Για το λόγο αυτό όταν προστέθηκαν 10 – 50 ppm μιας πρωτεΐνης καστανού χρώματος που παράγεται κατά την ένωση αλβουμίνης βόειου ορού με 4,5-έποξυ-2-επτανάλη σε λάδι από σόγια αυξήθηκε σημαντικά η σταθερότητα του λαδιού (Alaiz 1997).

Πίνακας 1.: Περιεχόμενο πρωτεΐνης ελαιολάδων

Είδος Ελαιολάδου	Περιεχόμενο πρωτεΐνης (ppm)	Εφαρμοζόμενη μέθοδος
Παρθένο ελαιόλαδο	0.7 - 5.1	Ακετόνη + HPLC [Hidalgo 2002]
	0.3 – 0.6	Εκχύλιση + Lowry [Georgalaki 1998a]
	0.01 – 0.04	Εκχύλιση + Bradford [Georgalaki 1998a]
	0.4	Εκχύλιση + Θολομετρία [Georgalaki 1998a]
	0.05 – 2.4	Ακετόνη + Bradford [Koidis 2006]
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	0.8 – 1.8	Ακετόνη + HPLC [Hidalgo 2002]
	0.10	Ακετόνη + Bradford [Koidis 2006]

Στους καρπούς της ελιάς οι πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση των ελαιοσωμάτων (Zamora 2001). Ωστόσο αυτή η λειτουργία σταθεροποίησης δεν φαίνεται να υπάρχει και στα ελαιόλαδα με βάση το ποσό των πρωτεϊνών που περιέχουν. Για να εξετάσουν το φαινόμενο αυτό ο Zamora και οι συνεργάτες του (Zamora 2001) 20 ppm κλάσματος πολυπεπτιδίων / πρωτεϊνών, οι οποίες απομονώθηκαν από το μεσοκάρπιο ελαιοκάρπων σε σογιέλαιο. Κατά τη μελέτη αυτή δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη σταθερότητα του προϊόντος. Επιπλέον όταν μελετήθηκε η σταθερότητα 28 παρθένων ελαιολάδων και 6 εξευγενισμένων ελαιολάδων έναντι του συνολικού περιεχομένου πρωτεΐνης των ελαιολάδων παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αρνητική συνεισφορά του περιεχομένου πρωτεΐνης στη σταθερότητα των παρθένων ελαιολάδων (Hidalgo 2001). Αυτό το αποτέλεσμα ίσως είναι σε συμφωνία με το γεγονός της παρουσίας οξειδωτικών ενζύμων στο παρθένο ελαιόλαδο (Georgalaki 1998a), τα οποία επηρεάζουν την οξειδωτική σταθερότητα του προϊόντος.

2.4 ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ TAG

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα του ελαιόλαδου είναι τα εξής: μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0), παλμιτελαϊκό (C16:1), δεκαεπτανοϊκό (C17:0), δεκαεπτενοϊκό (C17:1), στεατικό (C18:0), ελαϊκό (C18:1), λινελαϊκό(C18:2), λινολενικό (C18:3), εικοσενοϊκό (C20:1), αραχιδονικό (C20:4), εικοσιδυανοϊκό (C22:0), λιγνoserικό (C24:0). Η σύσταση των λιπαρών οξέων διαφέρει από δείγμα σε δείγμα και εξαρτάται από την περιοχή της παραγωγής τους. Πρωταρχικοί παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση είναι το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, η ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης των ελαιοκάρπων κατά την συλλογή τους .

Θεωρητικά στο ελαιόλαδο, σύμφωνα με την σύσταση του σε λιπαρά οξέα, θα έπρεπε να υπάρχουν περισσότερα από 70 είδη TAG. Ωστόσο, ο αριθμός των TAG που συναντάται είναι πολύ χαμηλότερος, καθώς ορισμένα απουσιάζουν και άλλα υπάρχουν σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Τα TAG που βρίσκονται σε μεγαλύτερες αναλογίες είναι τα OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12.5-20%), POL (5.5-7%) και SOO (3-7%), όπου O: ελαϊκό, P: παλμιτικό, L: λινελαϊκό και S: στεατικό (Boskou 1996). Γενικά έχει διαπιστωθεί ότι στο ελαιόλαδο δεν απαντώνται TAG που έχουν και στα τρία υδροξύλια του μορίου της γλυκερόλης κορεσμένα λιπαρά οξέα. Συνήθως στη θέση 2 των TAG είναι συνδεδεμένα ακύλια μονο- και πολυ-ακορέστων λιπαρών οξέων και τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα κατανέμονται τυχαίως στα υδροξύλια των θέσεων 1 και 3 του μορίου της γλυκερόλης (Μπαλατσούρας 1997).

2.4.1 ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα δευτερεύοντα συστατικά του ελαιόλαδου μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα παράγωγα των λιπαρών οξέων, όπως μονο- και διακυλο- γλυκερίδια, φωσφατίδια, κηρούς και εστέρες στερολών. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ομάδες συστατικών που δεν σχετίζονται χημικά με τα λιπαρά οξέα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, ελεύθερες στερόλες, τοκοφερόλες, χλωροφύλλες, καροτενοϊδή και πολικά φαινολικά συστατικά όπως τυροσόλη και υδροξυ-τυροσόλη). Ορισμένα από τα συστατικά αυτά υπάρχουν μόνο στο παρθένο ελαιόλαδο, καθώς ο εξυγενισμός απομακρύνει τα φωσφατίδια και τις φαινόλες και προκαλεί σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές σε άλλα συστατικά .

Είναι εξαιρετικά δύσκολος ο προσδιορισμός των ολικών δευτερευόντων συστατικών λόγω της περίπλοκης φύσης τους και της χαμηλής συγκέντρωσής τους. Ένας απλός τρόπος προσδιορισμού τους είναι η εύρεση του ασαπωνοποιήτου μέρους των συστατικών, δηλαδή αυτών, που μετά από σαπωνοποίηση, παραμένουν μη πτητικά κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες μεθόδου. Προσδιορίζονται έτσι συστατικά φυσικής προέλευσης, όπως στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, χρωστικές και υδρογονάνθρακες, καθώς και ξένες οργανικές ουσίες που είναι μη πτητικές στους 103 °C. Με τον τρόπο αυτό προσδιορισμού όμως, δεν προσδιορίζονται άλλα δευτερεύοντα συστατικά που σαπωνοποιούνται, όπως φωσφατίδια και γλυκερίδια, ούτε φαινόλες που είναι υδατοδιαλυτές και απομακρύνονται, ενώ υπάρχουν και συστατικά, όπως στερόλες και αλειφατικές αλκοόλες, που συναντώνται και σε ελεύθερη και σε εστεροποιημένη μορφή. Με τον προσδιορισμό του ασαπωνοποιήτου μέρους επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του συνολικού ποσού των πιο σημαντικών μη γλυκεριδικών συστατικών, όπως οι στερόλες, οι υδρογονάνθρακες, οι λιπαρές αλκοόλες, η φυτόλη και οι χρωστικές. Συγκεκριμένα, δευτερεύοντα συστατικά του ελαιόλαδου είναι τα εξής (αναφέρονται με βάση την αύξηση της πολικότητάς τους):

1) ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ

Δύο είναι οι υδρογονάνθρακες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο σε σημαντικά ποσά, το σκουαλένιο και το β-καρότενιο. Το σκουαλένιο είναι ένας βιοχημικός πρόδρομος της βιοσύνθεσης των στερολών και αποτελεί το βασικό συστατικό του ασαπωνοποιήτου μέρους (ως και 40% w/v). Άλλοι υδρογονάνθρακες που έχουν αναφερθεί είναι παραφίνες, υδρογονάνθρακες διακλαδισμένης αλυσίδας, αρωματικοί υδρογονάνθρακες και πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες σε ίχνη (ναφθαλένιο, φαινανθρένιο, πυρένιο, φλουορανθρένιο, κ.α.).

2) ΣΤΕΡΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΚΑΙ ΚΗΡΟΙ

Διάφορες στερόλες και αλειφατικές αλκοόλες μπορούν να βρεθούν στο ελαιόλαδο στην ελεύθερη ή την εστεροποιημένη μορφή τους με λιπαρά οξέα, όπως η 4-μεθυλοστερόλη και η 4,4-διμεθυλοστερόλη.

3) ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΕΣ

Πρόκειται για σημαντικά συστατικά, τα οποία συμβάλλουν στη σταθερότητα του ελαιόλαδου και έχουν ωφέλιμο βιολογικό ρόλο σαν αδρανοποιητές των ελευθέρων ριζών *in vivo*. Τα διαιτητικά οφέλη του ελαιόλαδου οφείλονται, τόσο στη σύσταση των λιπαρών οξέων του, όσο και στην παρουσία των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών. Η συγκέντρωση των τοκοφερολών είναι υψηλή κατά την πρώτη περίοδο συγκομιδής των ελαιοκάρπων ενώ ελαττώνεται κατά το τέλος αυτής. Η βιοσύνθεση των τοκοφερολών συνεχίζεται και μετά την συγκομιδή.

Τοκοφερόλες που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι η 5,7,8-τριμεθυλο-τοκόλη (α-τοκοφερόλη, ομόλογο της βιταμίνης E), η 5,8-διμεθυλο-τοκόλη (β-τοκοφερόλη), η 7,8-διμεθυλο-τοκόλη (γ-τοκοφερόλη) και η 8-μεθυλο-τοκόλη (δ-τοκοφερόλη) (μπαλατσούρας 1997).

4) ΛΙΠΑΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΔΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

Οι λιπαρές αλκοόλες είναι μια σημαντική ομάδα των δευτερευόντων συστατικών του ελαιόλαδου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν κριτήριο διαφοροποίησης των τύπων του. Οι κύριοι εκπρόσωποί τους είναι η εικοσιδιόλη, εικοσιτετρανόλη, εικοσιεξανόλη και εικοσιοκτανόλη, ενώ απαντώνται και αλκοόλες με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα, όπως η εικοσιτριόλη, η εικοσιπεντανόλη και η εικοσιεπτανόλη. Οι ξηρές κλιματολογικές συνθήκες και οι υψηλές θερμοκρασίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν υψηλή συγκέντρωση αλκανίων στο ελαιόλαδο.

Επίσης δύο διτερπενοϊδή έχουν ανιχνευθεί στο αλκοολικό κλάσμα του ελαιόλαδου, η φυτόλη, που πιθανώς προέρχεται από τη χλωροφύλλη, και η γερανυλγερανιόλη.

Κηροί. Οι κηροί είναι εστέρες των λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα και το περιεχόμενό τους στο ελαιόλαδο είναι πολύ χαμηλό. Οι κύριοι κηροί που απαντώνται στο ελαιόλαδο είναι οι εστέρες C-36, C-38, C-40, C-42, C-44 και C-46 .

5) ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι στερόλες είναι σημαντικά μη γλυκεριδικά συστατικά. Σχετίζονται με την ποιότητα του ελαιόλαδου και χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίησή του. Τέσσερις κατηγορίες στερολών υπάρχουν στο ελαιόλαδο: **α)** Οι δεσμεθυλστερόλες, με κυριότερους αντιπροσώπους στο ελαιόλαδο τη β-σιτοστερόλη, τη Δ-5-αβεναστερόλη και την καμπεστερόλη. Σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν η στιγμαστερόλη, η χοληστερόλη, η 24-μεθυλεν-χοληστερόλη, η Δ-5,24-στιγμασταδιενόλη, η Δ-7-στιγμαστενόλη και η Δ-7-αβεναστερόλη. Οι στερόλες στο ελαιόλαδο βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή ή είναι εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα και το συνολικό περιεχόμενό τους είναι υψηλότερο, όταν και το συνολικό περιεχόμενο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι επίσης υψηλό (Morcío et al., 1987). Η σύνθεση των στερολών επηρεάζεται από τον χρόνο αποθήκευσης των ελαιοκάρπων καθώς και από την επεξεργασία του ελαιόλαδου. **β)** Οι 4α-μεθυλστερόλες, οι οποίες σχηματίζονται ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση των στερολών και πάντοτε βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά στο ελαιόλαδο. **γ)** Οι 4,4-διμεθυλστερόλες (αλκοόλες τριτερπενίων) και **δ)** Οι διαλκοόλες των τριτερπενίων.

Στο ελαιόλαδο έχει επίσης αναφερθεί η ύπαρξη υδροξυ-τερπενικών οξέων .

6) ΜΟΝΟ ΚΑΙ ΔΙΑΚΥΛΟ- ΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ

Η παρουσία αυτών των γλυκεριδίων στο ελαιόλαδο οφείλεται σε ατελή βιοσύνθεση των TAG ή σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Η συγκέντρωση των μονοακυλογλυκεριδίων είναι πολύ χαμηλότερη από αυτήν των διακυλογλυκεριδίων .

7) ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Το παρθένο ελαιόλαδο έχει χρώμα που κυμαίνεται μεταξύ πρασινοκίτρινου και χρυσού, ανάλογα την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης των ελαιοκάρπων (Minguez et al., 1991). Η σύσταση και το συνολικό ποσό των χρωστικών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι σημαντικές παράμετροι ποιότητάς του, εφόσον καθορίζουν το χρώμα του, ενώ οι χρωστικές εμπλέκονται επίσης στους μηχανισμούς αυτοοξειδωσης και φωτοοξειδωσης. Δύο κατηγορίες φυσικών χρωστικών υπάρχουν στο ελαιόλαδο: **α) Η κατηγορία των χλωροφυλλών.** Στις χλωροφύλλες α και β και στις φαιοφυτίνες α και β οφείλεται το πράσινο χρώμα. Το περιεχόμενό τους εξαρτάται από τον τρόπο εκχύλισης των ελαιοκάρπων, ενώ και ο τρόπος της βιομηχανικής εκχύλισης δεν το αφήνει ανεπηρέαστο. **β) Η κατηγορία των καροτενοϊδών** με κύριους αντιπροσώπους τη λουτεΐνη, το β-καροτένιο, τη βιολαξανθίνη και τη νεοξανθίνη. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, το ποσοστό των χλωροφυλλών μειώνεται και αυτό των καροτενοϊδών αυξάνεται.

Και οι δυο τύποι χρωστικών καταστρέφονται μερικώς με την εκχύλιση αλλά η καταστροφή των χλωροφυλλών είναι μεγαλύτερη από αυτή των καροτενοϊδών .

8) ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ

Το ποσοστό των φωσφολιπιδίων διαφέρει ανάλογα με το χρόνο που έχει μεσολαβήσει από την παραγωγή του ελαιόλαδου . Σε παλαιότερα έτσι λάδια περιέχονται φωσφολιπίδια σε χαμηλότερες ποσότητες (Vitagliano 1961). Στο ελαιόλαδο έχει αναφερθεί η ύπαρξη PC (α-φωσφατιδυλο-χολίνη), PE (α-φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη), PI (α-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) και PS (α-φωσφατιδυλι-σερίνη) (Alter & Gutfinger 1982). Σύμφωνα με τον Spettoli (Spettoli 1972), τα φωσφολιπίδια είναι μερικώς ενωμένα με λιποπρωτεΐνες.

9) ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει φαινολικές ουσίες που επηρεάζουν την σταθερότητα και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου συμβατικά χαρακτηρίζονται ως «πολυφαινόλες» και αποτελούν μέρος του πολικού κλάσματος που παραλαμβάνεται από το ελαιόλαδο με εκχύλιση με μεθανόλη-νερό (Cortesi & Fedeli 1983). Ο όρος αυτός είναι συμβατικός διότι δεν είναι όλες οι φαινολικές ουσίες πολυ-υδρόξυ

παράγωγα. Κυριότεροι αντιπρόσωποι των φαινολικών ουσιών στο ελαιόλαδο είναι οι απλές φαινολικές ενώσεις (η τυροσόλη, η υδροξυ-τυροσόλη, το καφεϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, το συρινγικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το π-υδροξυφαινοξυλικό οξύ και το ομοβαννιλικό οξύ), τα σεκοϊριδοειδή (secoiridoids) (η ελευρωπαΐνη, το κύριο γλυκοζίδιο του ελαιόλαδου, το άγλυκο του λιγκστροσιδίου και τα αντίστοιχα αποκαρβοξυλιωμένα διαλδεϋδικά τους παράγωγα) καθώς και οι λιγνάνες [(+)-1-ακετοξυπινορεσινόλη και (+)-πινορεσινόλη (Owen et al., 2000) . Υπάρχουν ωστόσο και άλλες φαινολικές ουσίες που έχουν απομονωθεί από το ελαιόλαδο, όπως επίσης και ουσίες με χαρακτηριστικά φαινολικών ουσιών που δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί (Donaire et al., 1984; Mínguez et al., 1991) . Το περιεχόμενο του ελαιόλαδου σε ελευρωπαΐνη είναι χαμηλότερο, όταν οι ελαιοκάρποι είναι πλήρους ωρίμανσης, ενώ το συνολικό περιεχόμενο σε φαινόλες και ο-διφαινόλες εξαρτάται από το σύστημα εκχύλισης του ελαιόλαδου, και είναι χαμηλότερο όταν χρησιμοποιούνται συνεχή φυγοκεντρικά συστήματα . Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύσταση των φαινολικών ουσιών του ελαιόλαδου εξαρτάται περισσότερο από το στάδιο ωρίμανσης, το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες, αλλά και από την ποικιλία των ελαιοκάρπων (Cinquanta et al., 1997; Owen et al.,2000).

10) ΠΤΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Στο σύνολο έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 100 τέτοια συστατικά στο ελαιόλαδο. Πρόκειται για υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεϋδες, εστέρες, φαινόλες και παράγωγα φαινολών, οξυγονωμένα τερπένια και παράγωγα του φουρανίου. Δεν είναι όλα τα πτητικά συστατικά, αρωματικά. Ορισμένα από αυτά είναι άοσμα (εξάνιο, οκτάνιο και παράγωγα του φουρανίου), ενώ άλλα συμβάλλουν μερικώς στη γεύση του ελαιόλαδου στις συγκεντρώσεις που βρίσκονται . Έχουν ταυτοποιηθεί πάντως πτητικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για κάθε χαρακτηρισμό του ελαιόλαδου που αφορά στους αρωματικούς του χαρακτήρες, όπως πράσινο, φρουτώδες, γλυκό, ώριμο, υπερώριμο, ανεπιθύμητο, γλυκό, ταγγύ, καυτερό κλπ. (Morales et al., 1995). Τα συστατικά αυτά είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και για την ανίχνευση της προέλευσης διαφορετικών δειγμάτων ελαιολάδων (Aparicio et al., 1997), αν και εξαρτώνται περισσότερο από την ποικιλία των ελαιοκάρπων από τους οποίους προέρχεται το ελαιόλαδο (Angerosa et al., 1999).

2.5 ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ

Οι πολυφαινόλες είναι μια σημαντική κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών οι οποίες βρίσκονται στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς, και μάλιστα σε σημαντική ποσότητα, και μεταφέρονται κατά την επεξεργασία του καρπού στο ελαιόλαδο (Βεκιάρης 2001). Τα φαινολικά συστατικά περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι

παρουσιάζουν αρκετές διαφορές στη δομή τους καθώς και μια μεγάλη ποικιλία σε σημαντικές βιολογικές δράσεις. Τα φαινολικά συστατικά σχετίζονται γενικά και με τη γεύση του ελαιόλαδου, αλλά η σχέση αυτή δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Ο κύριος γλυκοζίτης, ο οποίος είναι παρών στο ελαιόλαδο, είναι η ελευρωπαΐνη και θεωρείται υπεύθυνη για την πικρή γεύση των ανώριμων ελιών. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το άγλυκο του διακετοξυλινγκετροσιδίου είναι ο βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη της γεύσης σπιρτάδας (runcency) του ελαιόλαδου (Andrewes et al., 2003).

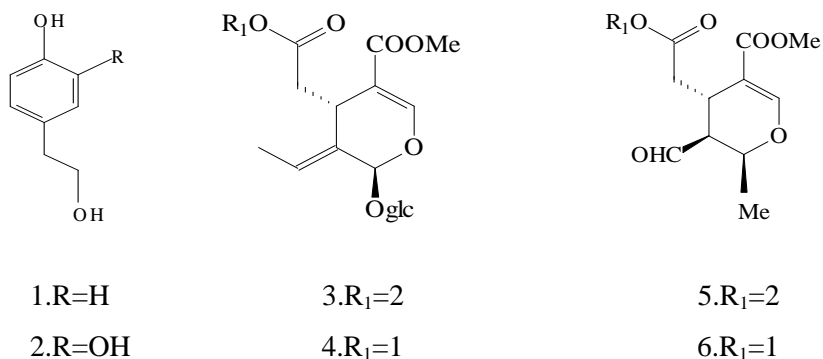
Εκτός από την συμμετοχή του στο άρωμα και την γευστική αξία του ελαιόλαδου, η σημασία του φαινολικού κλάσματος οφείλεται επίσης στο ρόλο του όσον αφορά στη σταθερότητα των ελαιολάδων. Συγκεκριμένα, ελαιόλαδα τα οποία εξήχθησαν με διαλύτη ήταν πλουσιότερα σε πολυφαινόλες σε σχέση με τα παρθένα ελαιόλαδα και διατηρήθηκαν καλύτερα. Η σημασία που έχουν τα φαινολικά συστατικά στην ποιότητα του ελαίου είναι πλέον αναγνωρισμένη, ειδικά η συσχέτισή τους με τον αριθμό υπεροξειδίων, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τον οργανοληπτικό έλεγχο. Μετά την απομάκρυνση των πολυφαινολών, η οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων μειωνόταν και φαινόταν να εξαρτάται από την συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Gutfinger 1981).

Πρόσφατα, το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε έρευνες σχετικές με ιατρικές μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί, προτείνουν ότι μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο σχετίζεται άμεσα με μείωση της επικινδυνότητας από διάφορες μορφές καρκίνου. Την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί μια σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της δράσης του ελαιόλαδου στην αποφυγή του καρκίνου. Ένας μεγάλος αριθμός συστατικών του ελαιόλαδου έχουν ταυτοποιηθεί ως αποτελεσματικοί παράγοντες εναντίον της έναρξης και της προοδευτικής διάδοσης των πολλαπλών πορειών της καρκινογένεσης. Τέτοια συστατικά είναι η διεξοδικά μελετημένη τοκοφερόλη, τα καροτενοΐδη (που έχουν αντιοξειδωτική δράση), οι πολυφαινόλες -απλές φαινόλες (υροξυτυροσόλη, τυροσόλη) και συζευγμένες φαινόλες (δευτεροταγή ιριδοειδή και λιγνάνες)- και η φυτοστερόλη, β-σιτοστερόλη. Πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι τα κύρια αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου μπορούν επίσης να συμμετέχουν σε μη αντιοξειδωτικές βιολογικές δράσεις οι οποίες ενισχύουν τον χημειοπροστατευτικό ρόλο του ενάντια στον καρκίνο (Sotiroudīs et al., 2003). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι καλλιέργειας της ελιάς για την παραγωγή extra παρθένου ελαιόλαδου καθώς και ελαιοκάρπων με στόχο την αυξημένη παρουσία των αντιοξειδωτικών αυτών στο τελικό προϊόν. Μεταξύ των άλλων, τα εν λόγω συστατικά του ελαιόλαδου, που είναι ευρύτατα διαδομένα στο φυτικό βασίλειο, συνεισφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά με διαφορετικούς τρόπους στα διάφορα βότανα, αυτοφυή και καλλιεργούμενα. Δρουν ως ρυθμιστές στην αύξηση και στη διέγερση της φωτοσύνθεσης ή ρυθμιστές της διαδικασίας οξειδοαναγωγής, ως συστατικά των μεμβρανών. Είναι ήδη γνωστή η σχέση ανάμεσα στις φαινολικές ουσίες και στην αντίσταση των φυτών στις ασθένειες (Harborne 1989; Uccella

2001). Ο ενεργειακός ρόλος των εδώδιμων λιπών και ελαίων οφείλεται στα κυριότερα συστατικά τους όπως τα τριακυλογλυκερίδια και τα πολικά λιπίδια. Ως είναι ακατέργαστα προϊόντα, μετά τη διαδικασία εκχύλισης, μπορεί να περιέχουν και τους δύο τύπους λιπιδίων, σε ποσοστό περίπου 98%, καθώς και αριθμό άλλων συστατικών. Το υπόλοιπο 2% είναι σημαντικά δευτερεύοντα συστατικά, όπως βιομόρια, στερόλες, τοκοφερόλες, τερπένια, και βιοφαινόλες (BP), οι οποίες βρίσκονται σε απλή (sBP) και εστεροποιημένη μορφή (secoBP). Οι βιοφαινόλες παρέχουν προστασία ενάντια στην αυτοξειδωση, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και επηρεάζουν τη γεύση (Saiia & Uccella 2001; Heinemann 1968).

Όπως πολλά φρούτα και λαχανικά, οι ελαιώδεις δρύπες περιέχουν βιοφαινόλες, οι οποίες κατανέμονται στο μεσοκάρπιο (πούλπα), καθώς επίσης και στον σπόρο. Οι βιοφαινόλες συναντώνται σε διάφορα μέρη του φυτικού κυττάρου υπό μορφή διαλυτών, εστεροποιημένων και συνδεδεμένων με το κυτταρικό τοίχωμα, βιομορίων (Bianco & Uccella 2000; Parr & Bolwell 2000).

Οι δευτερογενείς βιοφαινόλες είναι τερπενικοί και υδροξυ-αρωματικοί μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από έναν ή περισσότερους υδροξυλ-υποκαταστάτες, συνδεδεμένους στον αρωματικό δακτύλιο. Οι βιοφαινόλες σχηματίζουν δεσμούς με μερικές πρόσθετες λειτουργικές ομάδες βιοσυνθετικής μεβαλονικής προέλευσης, όπως η δευτερογενής ομάδα της ελευρωπαΐνης, η οποία προσδίδει την πικρή γεύση των ελαιοκάρπων (Uccella 1993). Τα φαινολικά συστατικά, τα οποία βρίσκονται στον ελαιοκάρπο, ποικίλλουν από μερικώς απλής μορφής δομές (εικόνα 2) (Macheix et al., 1990) όπως η ένωση 1 [2(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλη ή τυροσόλη], και οι ενώσεις 5 και 6 (ελενολικά παράγωγα των 1 και 2), ως υψηλώς πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες (Ryan & Robards 1998; Uccella et al., 1994).



Εικόνα 2. Δευτεροταγείς βιοφαινολικοί μεταβολίτες των ελαιωδών δρυπών όπου φαίνεται η υδροξυ-αρωματική και τερπενική δομή .

Οι απλές και δευτερογενείς βιοφαινόλες είναι ικανές να παρέχουν εξαιρετική φυσική προστασία από την προσβολή από παθογόνους οργανισμούς και συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος ως σταυροσυνδέτες μεταξύ των διαφορετικών πολυσακχαριδικών τμημάτων. Με τον τρόπο αυτό επηρεάζουν την διαδικασία παραγωγής του extra παρθένου ελαιόλαδου αλλά και την υφή των ελαιοκάρπων. Ο αμυντικός μηχανισμός, που παρουσιάζουν τα ελαιόδεντρα ενάντια σε παθογόνους οργανισμούς, οφείλεται στις δευτερογενείς βιοφαινόλες (Sivinski et al., 1999). Η κατανομή των ολικών βιοφαινολών στους ιστούς των καρπών ελέγχθηκε κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των δρυπών με σκοπό να ταυτοποιηθούν μερικές χαρακτηριστικές παράμετροι οι οποίες σχετίζονται με ανασταλτική δράση κατά συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Η μύγα *Bactrocera oleae* προκαλεί άμεση βλάβη στους ελαιοκάρπους και έμμεση στο extra παρθένο ελαιόλαδο και μπορεί να προκαλέσει την απώλεια ολόκληρης σοδειάς σε περιόδους ισχνής παραγωγής ή μειωμένης ποιότητας ελαιοπροϊόντων (Croveti 1996; Frega et al., 2000).

Ένα ελαιόδεντρο, κατά τη διάρκεια της μακράς ζωής του, εξακολουθεί να αποδίδει σημαντικής ποσότητας και ποιότητας καρπούς, αν και υφίσταται αρκετές επιθέσεις από έντομα και άλλους παθογόνους οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται από τον συνδυασμό αμυντικών μηχανισμών όπως οι βιομοριακές δράσεις των βιοφαινολών καθώς και από σύνθετη βιοδραστικότητα, η οποία προκαλείται από τα προσφάτως παρασκευαζόμενα είδη, τις φυτοαλεξίνες (Mercier 1997). Η παθογόνος προσβολή στα ελαιοκύτταρα και ιστούς προκαλεί παραγωγή βιοφαινολών και συγκομιδή με ταχύτερο ρυθμό στις ανθεκτικές ελαιοκαλλιέργειες σε σύγκριση με τις πιο ευαίσθητες. Η δράση των φυτοαλεξινών ελέγχεται από την ενδογενή δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης (Bianco et al., 1999). Η άμεση διέγερση οφείλεται όχι μόνο στην παρουσία παθογόνων με ταυτόχρονη προβολή λειτουργικών ομάδων, που προϋπήρχαν ως ακεταλικός γλυκοζίτης, αλλά και στις φαινολοξειδάσες, οι οποίες μετείχαν στην μετατροπή του κατεχολικού τμήματος σε κινόνη (Uccella 2000).

Τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αξιόλογες ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές κατά το βιολογικό κύκλο της ελιάς και έχουν σχέση με:

α) Την ποικιλία των ελαιών (Solinas et al., 1975)

β) Την ωριμότητα του καρπού. Έχει δειχθεί ότι στα ώριμα φρούτα το περιεχόμενο των πολυφαινολών είναι σχεδόν το μισό σε σύγκριση με αυτό των άγουρων φρούτων (Di Giovachino et al., 1980)

γ) Το σύστημα παραλαβής του ελαιόλαδου. Τα ελαιόλαδα, τα οποία παράγονται από *σύστημα φυγοκέντρωσης* παρουσιάζουν γενικά μικρότερη ποσότητα πολυφαινολών, σε σχέση με τα ελαιόλαδα τα οποία προέρχονται από *σύστημα πίεσης* (κλασσικό). Ο Di Giovacchino και οι συνεργάτες του (Di Giovachino et al., 1980)

ισχυρίζονται ότι η διαφορά είναι ακριβώς 50%. Άλλοι ερευνητές βρήκαν διαφορά της τάξεως του 5-40% όταν οι ίδιες ελιές επεξεργάστηκαν με το ίδιο συνεχές σύστημα. Μικρές παραλλαγές του μηχανολογικού εξοπλισμού της σύνθλιψης των ελαιών, των θερμοκρασιών που εφαρμόζονται στη διάρκεια της επαφής με το νερό και του συνολικού όγκου του νερού που χρησιμοποιείται, μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στο ολικό ποσοστό των φαινολών.

Αν και δεν υπάρχει συμφωνία των ερευνητών ότι το ποσοστό των πολυφαινολών εξαρτάται από τον τρόπο εξαγωγής του ελαιόλαδου, γενικά από την βιβλιογραφία προκύπτει ότι:

- τα συστήματα πίεσης εγγυώνται ελαιόλαδο με υψηλότερο περιεχόμενο σε συνολικές πολυφαινόλες, ορθο-διφαινόλες και υδροξυ-τυροσόλη
- το σύστημα φυγοκέντρωσης της πάστας ολόκληρων των φρούτων της ελιάς δίνει ελαιόλαδο με συνολικές πολυφαινόλες λιγότερες σε σχέση μ' αυτό που λαμβάνεται από τα παραπάνω συστήματα. Η μείωση σε πολυφαινολικές ουσίες κατά 40-50% οφείλεται στη διαλυτική δράση του νερού το οποίο χρησιμοποιείται. Σε αντίθεση με τη θερμοκρασία του, η προσθήκη νερού εισάγει μεταβλητές που επιδρούν στην ισορροπία κατανομής των πολυφαινολών στο σύστημα νερό-λάδι, χωρίς να λαμβάνονται υπ' όψιν τα φαινόμενα άλλης φύσης που ενδέχεται να εμφανίζονται στις φάσεις εργασίας που προηγούνται της προσθήκης του νερού. Η διαφορά που προκύπτει για το ποσοστό των πολυφαινολών εξαιτίας των διαφορετικών συστημάτων είναι σχεδόν 50% εφόσον όμως εργαζόμαστε με υγιείς ελιές από το δέντρο. Για ελιές πολύ ώριμες συλλεγόμενες από τη γη ή τα δίχτυα, έχουμε ελαιόλαδο που παρουσιάζει χαμηλές πολυφαινόλες (από 30-70mg/l) κι εδώ η δράση των διαφορετικών συστημάτων εξαγωγής είναι λιγότερο εμφανής, γιατί στις ελιές που πέφτουν δημιουργούνται ποικίλες ενζυμικές διεργασίες που οδηγούν σε οξείδωση και πολυμερισμό των πολυφαινολών (Βεκιάρης 2001).

Κατά τη διάρκεια εξαγωγής του ελαιόλαδου έχει μελετηθεί η επίδραση των ακόλουθων παραμέτρων στο περιεχόμενο των πολυφαινολών: θερμοκρασία, χρόνος μάλαξης και λεπτότητα άλεσης (Di Giovachino et al., 1980).

➤ Λεπτότερη άλεση ευνοεί την αύξηση του περιεχομένου αυτών των συστατικών στο ελαιόλαδο

➤ Υπάρχει αντίστροφη σχέση ανάμεσα στο περιεχόμενο πολυφαινολών και τη διάρκεια μάλαξης που οφείλεται μάλλον στη δράση του ατμοσφαιρικού O₂ και άλλων φαινολοξειδασών, που καταλύουν την οξείδωση των φαινολών σε κινόνες και στη συνέχεια σε πολυμερή (Solinas et al., 1975)

➤ Αύξηση της θερμοκρασίας (από 18° C στους 30° C) κατά τη διαδικασία επεξεργασίας ευνοεί τη διάλυση μερικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στην

πάστα και δημιουργεί στη συνέχεια εμπλουτισμό στις πολυφαινόλες του ελαιόλαδου (Solinas et al., 1978).

2.6.ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

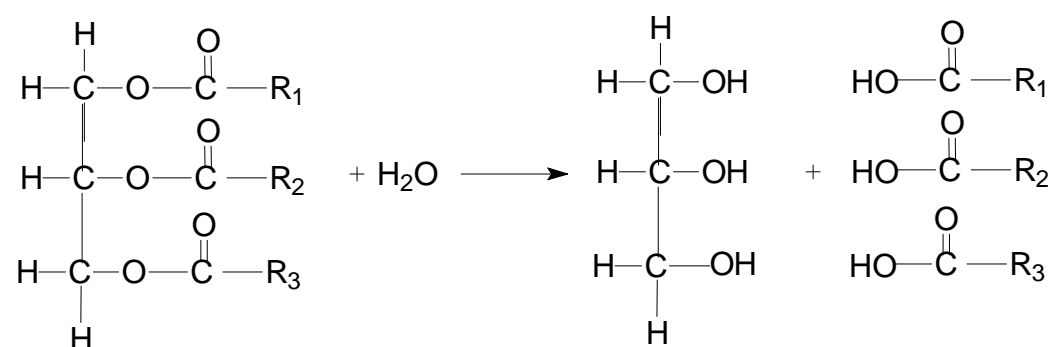
2.6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μία από τις κυριότερες αιτίες για την αλλοίωση των τροφίμων. Αποτελεί μεγάλο οικονομικό πρόβλημα για τις Βιομηχανίες Τροφίμων, εξαιτίας της ανάπτυξης στα εδώδιμα λάδια και λίπη. Χαρακτηρίζεται ως τάγγιση και καθιστά τα τρόφιμα μη αποδεκτά, επίσης, μειώνει και το χρόνο ζωής τους. Επιπλέον, οι οξειδωτικές αντιδράσεις μπορεί να μειώσουν τη διατροφική αξία των τροφίμων, ενώ και αρκετά προϊόντα που σχηματίζονται λόγω της οξείδωσης είναι ενδεχομένως τοξικά (Frankel 1984). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων, επίσης, εμπλέκεται και σε αρκετές ασθένειες όπως η φλεγμονή, η αρτηριοσκλήρυνση, η καρκινογένεση ακόμη και η πρόωρη γήρανση (Ames 1983; Halliwell & Gutteridge 1984).

Εξαιτίας αυτών έχουν πραγματοποιηθεί δαπανηρές έρευνες όχι μόνο για να αναγνωρισθούν τα προϊόντα της οξείδωσης και οι συνθήκες παραγωγής τους, αλλά και για να μελετηθούν οι μηχανισμοί τους οποίους περιλαμβάνουν.

2.6.2 ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗ ΤΑΓΓΙΣΗ-ΛΙΠΟΛΥΣΗ

Το αρχικό στάδιο της αποδόμησης των λιπιδίων είναι η υδρόλυση των γλυκεριδίων από λιπολυτικά ένζυμα, τα οποία βρίσκονται στις ελιές και επίσης μπορούν να ελευθερωθούν από μικροοργανισμούς. Τα υδρολυτικά ένζυμα (λιπάσες) δρουν κατά τη διάρκεια τις ωρίμανσης, της συλλογής και εκχύλισης των ελιών και ελευθερώνουν ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Τρυγλυκερίδια

Γλυκερόλη

Λιπαρά οξέα

2.6.3 ΑΥΤΟΞΕΙΔΩΣΗ-ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Η αυτοξειδωση των λιπιδίων είναι ελεύθερων ριζών ενδιάμεση αλυσιδωτή αντίδραση, που έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική επιδείνωση των ακόρεστων λιπιδίων. Ο μηχανισμός της οξειδωσης είναι περίπλοκος και αποτελείται από τρία στάδια : 1) έναρξη, 2) διάδοση, 3) λήξη.

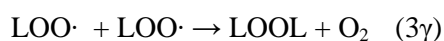
Έναρξη



Διάδοση



Λήξη



Εικόνα 3. Μηχανισμός αυτοξειδωσης των λιπιδίων.

LH = Ακόρεστα λιπίδια

L· , LOO· = Ελεύθερες ρίζες

LOOH = Υδροϋπεροξειδίο λιπιδίων

ΕΝΑΡΞΗ

Η αντίδραση της έναρξης περιλαμβάνει τη δημιουργία ριζών, γενικά άλκυλο- ρίζα (L·) από ακόρεστα λιπίδια. Εφόσον η αντίδραση $2\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow$ ελεύθερες ρίζες είναι δύσκολη θερμοδυναμικά (ενέργεια ενεργοποίησης περίπου 35 Kcal/mol), η παραγωγή των ελεύθερων ριζών, που είναι απαραίτητες, για να ξεκινήσει το στάδιο της διάδοσης, πρέπει να λαμβάνει χώρα μέσω κάποιου καταλυτικού μέσου. Έχει αποδειχθεί ότι το στάδιο της έναρξης μπορεί να πραγματοποιηθεί με αποικοδόμηση υδροϋπεροξειδίων, με κατάλυση με μέταλλα μετάπτωσης ή με έκθεση στο φως (Belitz & Grosch 1987).

ΔΙΑΔΟΣΗ

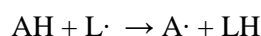
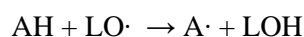
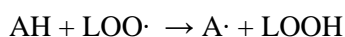
Η άλκυλο ρίζα (L·), η οποία παράγεται στο στάδιο της έναρξης, απορροφά γρήγορα το διαθέσιμο οξυγόνο και οδηγεί στο σχηματισμό των υπέροξυ ριζών (LOO·) (Rice et al., 1991). Οι υπέροξυ ρίζες εξαφανίζονται μέσω μίας πολύ αργής αντίδρασης και αρχίζουν να εμφανίζονται τα μόνο- υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων, τα οποία είναι τα κύρια προϊόντα της αυτοξειδωσης και νέες άλκυλο ρίζες (στάδιο 2α και 2β του σχήματος 2).

Λόγω του ότι το στάδιο της διάδοσης είναι αργό, η αφαίρεση υδρογόνου από τα ακόρεστα λιπίδια γίνεται εκλεκτικά. Έτσι η ευκολία της υδροϋπεροξειδωσης εξαρτάται από τον αριθμό των διπλών δεσμών που υπάρχουν (Kinsella & Hsieh 1989).

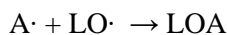
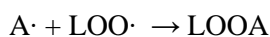
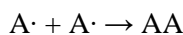
ΛΗΞΗ

Ο κοινός εκμηδενισμός των ελεύθερων ριζών είναι γνωστός ως στάδιο λήξης, τερματισμού. Η αυτόματη λήξη της οξειδωσης είναι δύσκολη, αφού δεν είναι πιθανό για όλες τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται να αδρανοποιησουν η μία την άλλη. Το στάδιο της λήξης 3γ της εικόνας 3 είναι το πιο σημαντικό, ενώ τα στάδια 3α και 3β γίνονται περισσότερο σημαντικά, όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή (Chamulitrat et al., 1991).

Η λήξη της οξειδωσης μπορεί, επίσης, να λάβει χώρα με αντιοξειδωτικά (AH), τα οποία διακόπτουν την αλυσίδα των ελεύθερων ριζών, παρεμβαίνοντας είτε στο στάδιο έναρξης είτε στο στάδιο διάδοσης (Kiritsakis 1991). Τα αντιοξειδωτικά δρουν σαν δότες υδρογόνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων ριζών των αντιοξειδωτικών, οι οποίες μπορούν να καθαρίσουν τις ρίζες λιπιδίων.



Οι ελεύθερες ρίζες των αντιοξειδωτικών αντιδρούν με τον ακόλουθο τρόπο :

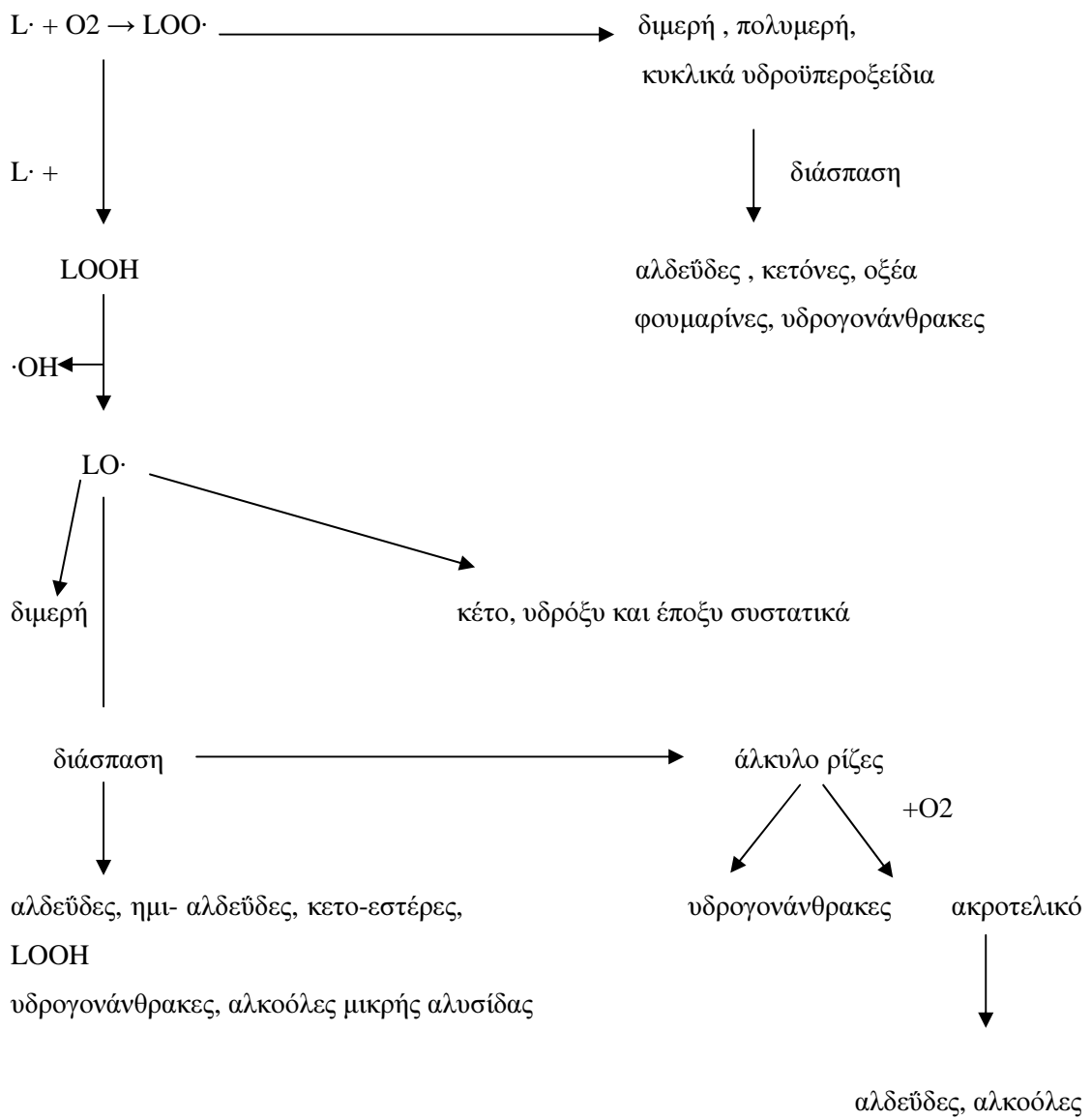


Το ελαιόλαδο είναι ανθεκτικό έναντι της αυτοοξειδωσης λόγω του ότι περιέχει μεγάλο ποσό από φυσικά αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλες, φαινόλες, πολυφαινόλες, καροτενοειδή και άλλα πιο περίπλοκα συστατικά.)

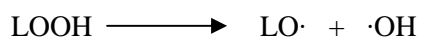
2.6.4. ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

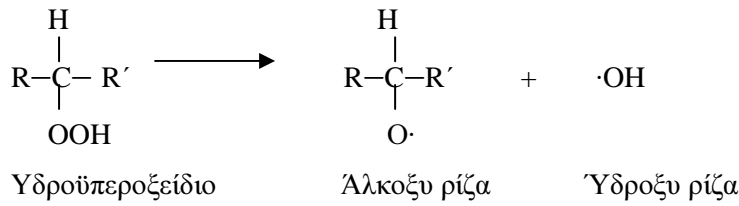
Η απλή κινητική απεικόνιση της αυτοοξειδωσης, που περιλαμβάνει τα στάδια της έναρξης, διάδοσης και λήξης της εικόνας 3, γίνεται περισσότερο πολύπλοκη εξαιτίας της αποικοδόμησης των μονο- υδροϋπεροξειδίων. Η διάσπαση των μονο- υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αρκετά στάδια, παράγοντας ποικίλα προϊόντα αποικοδόμησης , τα οποία στη συνέχεια μπορούν από μόνα τους να προχωρήσουν σε περαιτέρω οξειδωση και αποικοδόμηση, με συνέπεια να συμβάλλουν στη δημιουργία ενός μεγάλου και ποικίλου συνόλου ελεύθερων ριζών. Η εικόνα 4, που ακολουθεί, παρουσιάζει μια γενική εικόνα της αυτοοξειδωσης των λιπιδίων, περιλαμβάνοντας πρωτεύοντα και

δευτερεύοντα προϊόντα, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της οξειδωσης.



Εικόνα 4. Γενική αναπαράσταση της αυτοοξειδωσης των λιπιδίων. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται με ομολυτική διάσπαση του δεσμού O-O του υδροϋπεροξειδίου (LOOH) και σχηματίζονται αλκυλο ρίζες LO·, σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις.

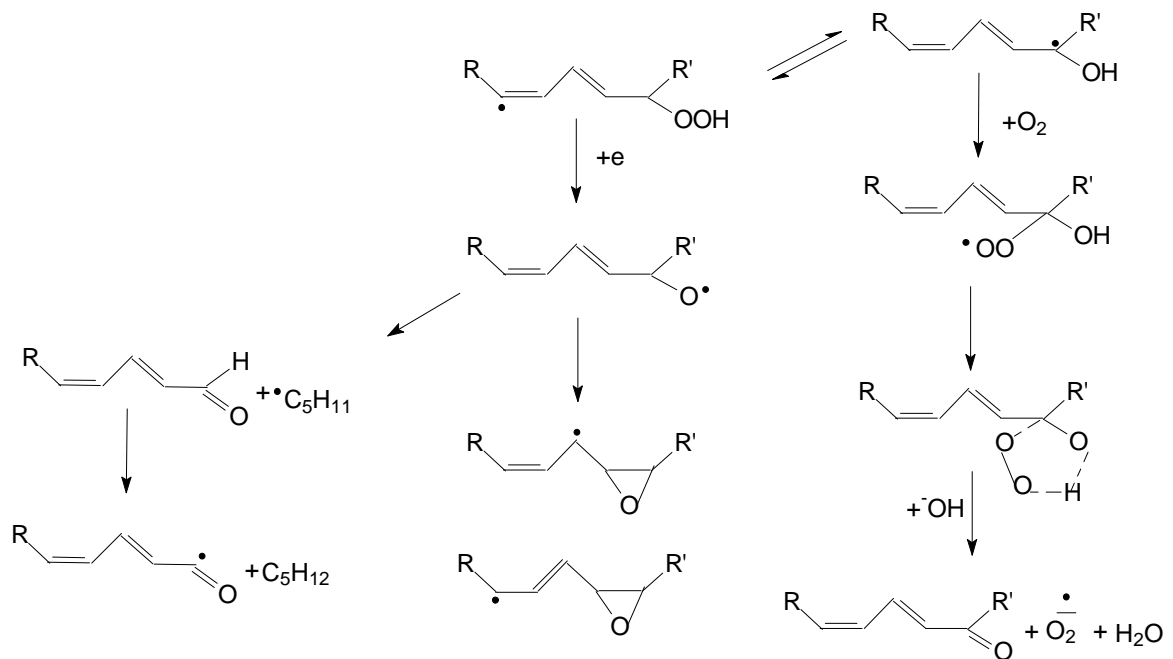




Οι άλκοξυ- ρίζες, που σχηματίζονται αρχικά, πρόκειται να δακτυλιοποιηθούν σε γειτονικούς διπλούς δεσμούς, για να σχηματίσουν ελεύθερες ρίζες με έποξυ- άλκυλο κέντρα άνθρακα, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με οξυγόνο για να σχηματίσουν υπέροξυ- ρίζες (Chamulitrat et al., 1991).

. Οι άλκοξυ ρίζες είναι, επίσης, γνωστό ότι μπορούν να συμμετέχουν σε μία ενδομοριακή διευθέτηση, σχηματισμός εποξειδίων (Chamulitrat et al., 1991).

, β-διάσπαση (Chamulitrat et al., 1990), και ενδομοριακές αντιδράσεις (Rota et al., 1997). Η εικόνα 5 δείχνει ποικιλία μηχανισμών που προτείνονται για τη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων.



Εικόνα 5. Μηχανισμοί διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων .

(I β-διάσπαση, II εποξείδωση, III οξειδωση του RO·, IV μεταφορά H⁺).

Όπως φαίνεται στις εικόνες 4 και 5, τα υπεροξειδία των λιπιδίων, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του σταδίου της έναρξης της αυτοοξειδωσης των λιπιδίων, μπορούν να αντιδράσουν ξανά με οξυγόνο και να παράγουν ενώσεις κυκλικών υπεροξειδίων και υδροϋπεροξειδίων. Επίσης, μπορούν να συμπυκνωθούν σε διμερή και πολυμερή. Αυτά τα

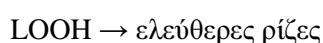
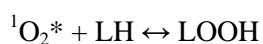
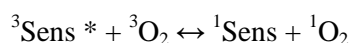
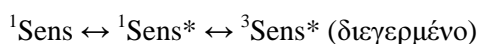
δευτερογενή προϊόντα μπορούν διαδοχικά να αποσυντίθενται μέσω του μηχανισμού, που απεικονίζεται στην εικόνα 5, και να παράγουν μεταβατικές, ασταθείς ενώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δυσάρεστη οσμή και γεύση των οξειδωμένων λαδιών (Frankel 1984).

2.6.5.ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

Τα λιπαρά οξέα δεν μπορούν να υποστούν φωτοοξείδωση άμεσα, καθώς δεν απορροφούν φως στην περιοχή του ορατού, και οξειδώνονται είτε μέσω σχηματισμού διενίων είτε μέσω μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται το διαμαγνητικό οξυγόνο (Chan 1976; Terao & Matsushita 1977).

Ο σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων από την αντίδραση μεταξύ μορίων λιπιδίων και οξυγόνου στη θεμελιώδη κατάσταση του είναι πολύ απίθανος, εξαιτίας του γεγονότος ότι η αντίδραση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την αρχή διατήρησης της στροφορμής (spin). Ωστόσο τα υδροϋπεροξειδία μπορούν να προκύψουν από την αντίδραση μεταξύ των λιπιδίων και του μοριακού οξυγόνου, που βρίσκεται είτε στην απλή είτε στη διεγερμένη κατάσταση .

Ένα ελάχιστο ποσό χρωστικής στα φυτικά έλαια θεωρείται ότι είναι ευαισθητοποιητής για τη φωτοχημική οξείδωση. Φωτοευαισθητοποιητές (χλωροφύλλη, πορφυρίνες, φλαβίνες) απορροφούν φως στην περιοχή του ορατού και διεγείρονται. Μεταφέρουν στη συνέχεια την ενέργεια που απομένει σε ένα μόριο οξυγόνου. Το διαμαγνητικό οξυγόνο που δημιουργείται κατ' αυτόν τον τρόπο αντιδρά με το λιπαρό μόριο και σχηματίζεται ένα υδροϋπεροξειδίο .



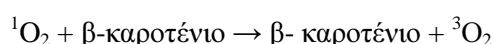
Όπου Sens : ευαισθητοποιητής

Αυτή η αντίδραση υδροϋπεροξειδωσής είναι τόσο γρήγορη που έχει θεωρηθεί σαν μία διαδικασία έναρξης της αυτοοξείδωσης για τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον οξείδωση και αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων παράγει κάποια ίδια και κάποια διαφορετικά προϊόντα διάσπασης, τα οποία μπορούν να έχουν επίδραση σε βιολογικές αλληλεπιδράσεις.

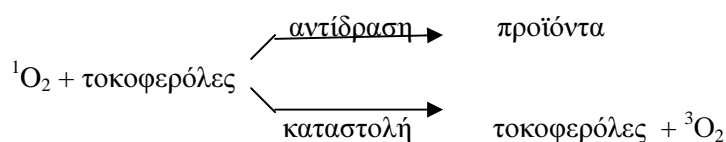
Η προ-οξειδωτική δράση των χλωροφυλλών και άλλων χρωστικών που υπάρχουν στα ελαιόλαδα έχουν αποδειχθεί πειραματικά σε αποχρωματισμένα ελαιόλαδα, σε σπορέλαια και σε εστέρες λιπαρών οξέων, στα οποία οι χρωστικές προστέθηκαν πριν από την έκθεση των λαδιών στο φως (Kiritsakis & Dugan 1985). Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι το παρθένο ελαιόλαδο οξειδώνεται ταχύτερα υπό την επίδραση του φωτός σε σχέση με το σκοτάδι και η ταχύτητα αυτή είναι αναλογική με το ποσό της χλωροφύλλης που περιέχει (Rahmani 1989).

Η αυτοξειδωση με διαμαγνητικό οξυγόνο δεν εμποδίζεται από τα κοινά αντιοξειδωτικά, που χρησιμοποιούνται, για να παρεμποδίσουν την αυτοξειδωση. Η φωτοξειδωση μπορεί να εμποδιστεί από καταστολείς διαμαγνητικού οξυγόνου (Gutierrez-Rosales et al., 1992), τα οποία μειώνουν το βαθμό της οξειδωσης είτε αντιδρώντας φυσικά είτε χημικά με τα διαμαγνητικά οξυγόνα. Χηλικά σύμπλοκα του νικελίου, τοκοφερόλες και το β-καροτένιο έχουν αναφερθεί σαν αποτελεσματικοί καταστολείς του διαμαγνητικού οξυγόνου (Kiritsakis & Dugan 1985).

Το καροτένιο έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει αποτελεσματικά το διαμαγνητικό οξυγόνο, σύμφωνα με την αντίδραση :



Οι τοκοφερόλες λειτουργούν όχι μόνο σαν αντιοξειδωτικά της αυτοξειδωσης, αλλά επίσης και σαν αποδοτικοί συλλέκτες του διαμαγνητικού οξυγόνου και μπορούν να παρεμποδίσουν τη φωτοξειδωση σύμφωνα με την ακόλουθη πορεία :



Σημαντικός είναι, λοιπόν, και ο ρόλος του διαμαγνητικού οξυγόνου, που δημιουργείται από τις αντιδράσεις φωτοξειδωσης, στην έναρξη και τη διάδοση των αντιδράσεων αυτοξειδωσης των λιπαρών υλών (Raws & Santen 1970). Η φωτοχημική οξειδωση διαφέρει από τη φωτολυτική αυτοξειδωση. Η έναρξη της φωτολυτικής οξειδωσης γίνεται με UV- καταλυόμενη αποικοδόμηση των υπεροξειδίων και υδροϋπεροξειδίων, ενώ στη διάδοση λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις ελεύθερων ριζών (Hsieh & Kinsella 1989).

Έτσι το διαμαγνητικό οξυγόνο συμβάλλει στην ιδιαίτερη σύσταση των εστέρων των φυτικών ελαίων σε υδροϋπεροξειδία (Frankel & Neff 1979), τα οποία αποικοδομούνται με τη θέρμανση και αποτελούν σημαντικούς προδρόμους πτητικών ουσιών (Frankel & Neff 1981). Η οξειδωση των λιπαρών ουσιών πέρα από τις επιδράσεις της στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Neff et al., 1983), έχει αποφασιστική βιολογική σημασία, καθώς τα προϊόντα της εμπλέκονται σε μηχανισμούς καταστροφής των πρωτεϊνών και βιομεμβρανών, ενώ παίζει ρόλο στη διαδικασία της φωτοκαρκινογένεσης (Logani & Davies 1979).

2.6.6.ΜΗ- ENΖΥΜΙΚΗ ΑΜΑΥΡΩΣΗ

Πολλοί και διαφορετικοί μηχανισμοί μη-ενζυμικής αμαύρωσης έχουν ταυτοποιηθεί και σε αυτούς περιλαμβάνεται αλληλεπίδραση μεταλλικού ιόντος με φαινολικά, αποικοδόμηση ασκορβικού οξέος και αντιδράσεις Maillard. Απ' αυτούς, μόνο στην πρώτη περίπτωση υπάρχει άμεση μεσολάβηση των φαινολών ως υποστρώματα. Ο ακριβής μηχανισμός, κατά τον οποίο συμβαίνει αμαύρωση με αλληλεπίδραση μεταλλικού ιόντος, δεν είναι αρκετά κατανοητός (Oszmianski et al., 1996) αλλά υποθετικά στηρίζεται στην ικανότητα των φαινολικών συστατικών να σχηματίζουν μεταλλικά σύμπλοκα (Cheng & Crisosto 1997).

Ειδικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ενώσεις που σχηματίζονται μεταξύ των πολυφαινολών και μεταλλικών ιόντων στο κρασί όπου διαφορετικά μεταλλικά ιόντα όπως χαλκός, σίδηρος, κασσίτερος, μαγνήσιο, ασβέστιο και κάλιο έχουν μεσολαβήσει στις αλληλεπιδράσεις των πολυφαινολών (Beveridge 1997; Mathew & Papria 1971). Ο χαλκός έχει συνδεθεί με αυξανόμενου αριθμού συχνότητα σε φαινολική οξειδωση στα κρασιά όπου το κύριο φαινολικό συστατικό που μελετήθηκε ήταν η κατεχίνη. Μελέτες από τον Oszmianski και τους συνεργάτες του (Oszmianski et al., 1996) δείχνουν ότι η αποικοδόμηση της κατεχίνης σε διαλύματα κρασιού αυξάνεται με την παρουσία σιδήρου. Επιπλέον, η παρουσία των δυο αυτών μεταλλικών ιόντων συνδέεται με αυξανόμενες συχνότητες της οξειδωσης της κατεχίνης και άλλων φαινολικών ουσιών στα προϊόντα αμαύρωσής τους. Ένας πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει οξειδωση των φαινολικών με χαλκό σε κινόνη από προϊόντα, τα οποία στην συνέχεια ενδέχεται να συμμετάσχουν σε αντιδράσεις πολυμερισμού προς σχηματισμό χρωστικών αμαύρωσης. Εντούτοις ο εν λόγω μηχανισμός είναι υπό αμφισβήτηση καθώς οι Fulcrand, Cheynier, Oszmianski και Moutounet (Fulcrand et al., 1997) έχουν προτείνει άλλη πορεία οξειδωσης του ταρταρικού οξέος με σίδηρο.

Μη-ενζυμική αμαύρωση εξαιτίας των μεταλλο-φαινολικών συμπλόκων μπορεί να συμβεί και σε χυμούς φρούτων. Διάφορα πολυσθενή κατιόντα έχουν την δυνατότητα να σχηματίσουν σύμπλοκα με φαινολικά σε συνδυασμό με υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες (Beveridge 1997). Πρώτες μελέτες των συστατικών χυμών μήλων σε απομονωμένα συστήματα δείχνουν ότι η παρουσία χαλκού είναι ο κύριος παράγοντας στο σχηματισμό ιζήματος και ότι ο χαλκός καταλύει την αποικοδόμηση των φαινολικών συστατικών των χυμών, ιδιαιτέρως των λευκοανθοκυανινών και της επικατεχίνης, οδηγώντας στην καθίζησή τους (Kieser et al., 1957). Ο σίδηρος εμπλέκεται επίσης σε τέτοιες αντιδράσεις αμαύρωσης σε μικρότερο ποσοστό από το χαλκό.

2.7. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Γενικά χαρακτηρίζουμε ως αντιοξειδωτική ουσία κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους: είτε (1) παρεμποδίζουν τη δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (ΔΕΟ) είτε (2) σταματούν τη διάδοση των ελευθέρων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Επίσης είναι δυνατόν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (πχ της βιταμίνης C) να συμβάλλει στην διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού (πχ της τοκοφερόλης). Στην περίπτωση αυτή έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Μπορούμε επίσης να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευσή τους και τη χημική τους σύσταση. Έτσι υπάρχουν ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός με την τροφή.

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ουσίες (α) μεγάλου Μοριακού Βάρους (MB) και (β) μικρού MB. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η παραοξονάση και το πρωτεάσωμα τα οποία ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΕΟ μέσω της απομάκρυνσης δυνητικών οξειδωτικών ή μετατρέποντας ΔΕΟ σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται επίσης διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα) όπως η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη και η ατογλοβίνη, οι οποίες δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα. Τα μικρού MB ενδογενή αντιοξειδωτικά υποδιαιρούνται περαιτέρω σε λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά μικρά χημικά μόρια (όπως η τοκοφερόλη (βιταμίνη E), τα καροτενοειδή, η χολερυθρίνη, ορισμένες κινόνες και πολυφαινόλες) και σε υδατοδιαλυτά μόρια (όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ και ορισμένες πολυφαινόλες) (Vava & Aviram 2001). Πολλές μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι μεταξύ των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών συμπεριλαμβάνονται και τα φωσφολιπίδια, αλλά τα πειραματικά αποτελέσματα δεν συμφωνούν μεταξύ τους ως προς τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των επιμέρους φωσφολιπιδίων (Nwozu et al., 1997).

2.7.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιολογικών δειγμάτων, όπως το πλάσμα ή ο ορός, το κρασί, τα φρούτα και τα λαχανικά, ή ζωικοί ιστοί. Οι μέθοδοι αυτοί είναι απαραίτητοι λόγω (α) της δυσκολίας της μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά και (β) των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων αντιοξειδωτικών συστατικών σε

πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος περιλαμβάνει κυρίως την ικανότητα του δείγματος να δώσει ηλεκτρόνια (ή άτομα υδρογόνου) σε ένα ειδικό ΔΕΟ ή σε κάθε δέκτη ηλεκτρονίων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής μετράται τελικά με μία αναλυτική μέθοδο όπως αυτές που αναφέρθηκαν στην περίπτωση προσδιορισμού των ΔΕΟ. Παρακάτω αναφέρω μερικές από τις σπουδαιότερες μεθόδους μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης..

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών ενώσεων, συστατικών τροφίμων ή κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται η αντίδραση των αντιοξειδωτικών με σταθερές έγχρωμες ελεύθερες ρίζες (πχ DMPD, DPPH) η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό τους.

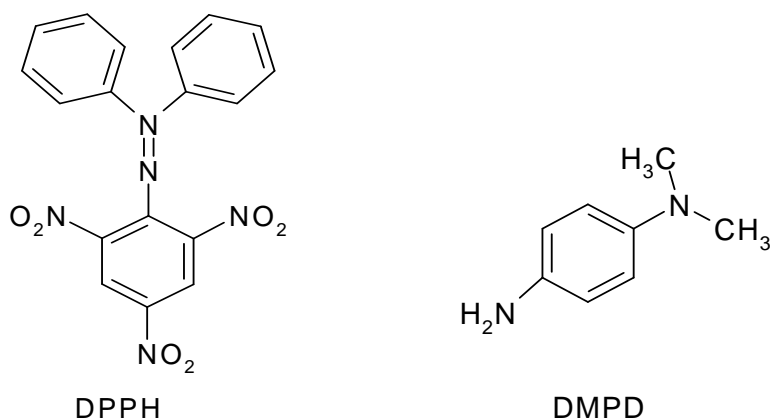
Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity/ Ικανότητα απορροφητικότητας ριζών οξυγόνου) στηρίζεται στην ελάττωση του φθορισμού ορισμένων ουσιών (φυκοερυθρίνες) με τη προσθήκη ελευθέρων ριζών. Η δράση αυτή των ελευθέρων ριζών αναστέλλεται παρουσία των αντιοξειδωτικών.

Με την μέθοδο φασματοσκοπίας του Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) μπορούμε να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική δράση ουσιών με βάση την ελάττωση του EPR σήματος συγκεκριμένων ελευθέρων ριζών μετά την αντίδραση τους με το αντιοξειδωτικό παρουσία μιας παγίδας σπιν.

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power/Αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής τρισθενούς σιδήρου) στηρίζεται στην αναγωγή ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου από το αντιοξειδωτικό προς ένα προϊόν με έντονο κυανούν χρώμα.

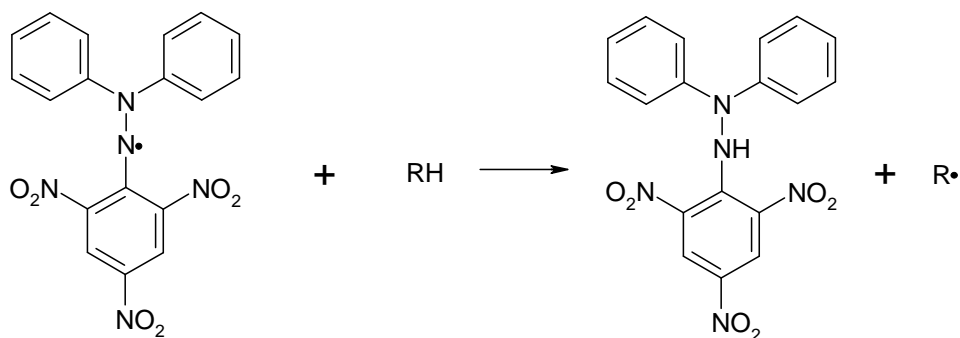
Η μέθοδος TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential/ Συνολικό δυναμικό παγίδευσης ριζών υπεροξειδίου) βασίζεται στην αντίδραση ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου με μία ουσία την λουμινόλη. Το προϊόν της αντίδρασης είναι μία ρίζα λουμινόλης η οποία εκπέμπει φως (χημειοφωταύγεια) το οποίο και μετράται. Παρουσία αντιοξειδωτικών η χημειοφωταύγεια ελαττώνεται (Ramadan et al., 2003; Schiesier et al., 2002).

Από τις παραπάνω μεθόδους αυτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα περιλαμβάνουν την αντίδραση ενός αντιοξειδωτικού, λιποδιαλυτού ή υδατοδιαλυτού, με τις σταθερές έγχρωμες ελεύθερες ρίζες DPPH και DMPD αντίστοιχα.



Εικόνα 6. Χημικοί τύποι των μορίων του DPPH και DMPD

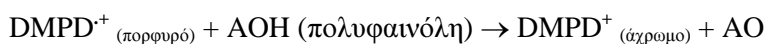
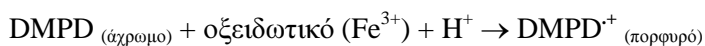
Κατά την αντίδραση ενός λιπόφιλου αντιοξειδωτικού (RH) με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH έχουμε την αντίδραση που φαίνεται στην εικόνα 7 με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της.



Εικόνα 7. Αντίδραση ενός λιπόφιλου αντιοξειδωτικού (RH) με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH

Παράλληλα για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης υδρόφιλων αντιοξειδωτικών χρησιμοποιείται η ελεύθερη ρίζα του DMPD η οποία σχηματίζεται με οξείδωση με Fe^{3+} .

Οξειδωτικά συστατικά όπως οι πολυφαινόλες, τα οποία είναι ικανά να μεταφέρουν ένα άτομο υδρογόνου στην ρίζα $DMPD^+$, προκαλούν αποχρωματισμό του διαλύματος σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Η μέθοδος του DMPD μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ικανότητας βιοδραστικών μορίων να ανάγουν την ρίζα του DMPD μέσω δημιουργίας

χηλικού συμπλόκου με τον Fe^{2+} του αντιδραστηρίου DMPD (Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

2.7.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά του ελαιολάδου, στα οποία οφείλεται και η οξειδωτική του σταθερότητα είναι πολικές και μη-πολικές φαινόλες (πολυφαινόλες, τοκοφερόλες) και καροτενοειδή (Sotiroudis et al., 2003; Boskou 1996; Aparicio et al., 1999; Psomiadou & Tsimidou 1999). Από την άποψη του αντιοξειδωτικού/ αντικαρκινικού δυναμικού, οι πολυφαινόλες θεωρούνται τα πιο σημαντικά συστατικά του ελαιόλαδου. Οι πολυφαινόλες (π.χ. τυροσόλη, ύδροξυ τυροσόλη, ελευρωπαΐνη) είναι χαρακτηριστικά συστατικά του ελαιόλαδου, τα οποία βοηθούν στην σταθερότητα του και παρέχουν προστασία για την υγεία. Σήμερα η Βιομηχανία ελαιόλαδου ενθαρρύνει την παραγωγή εμπλουτισμένων με πολυφαινόλες προϊόντων.

Οι τρεις κατηγορίες των φαινολικών συστατικών (απλές φαινόλες, σεκοϊριδοειδή, λιγνάνες) έχουν ικανές αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες είναι σαφώς μεγαλύτερες από εκείνες του κλασσικού *in vivo* και *in vitro* περισυλλέκτη ελευθέρων ριζών (free radical scavenger), της βιταμίνης E. Φαίνεται πιθανό σ' αυτές τις ιδιότητες να οφείλεται η αντικαρκινική δράση τους. Σαν συνέπεια των παραπάνω, η υδροξυτυροσόλη, τα σεκοϊριδοειδή και οι λιγνάνες είχαν την πιο έντονη ανασταλτική δράση σε πειραματικό σύστημα, που περιελάμβανε προσβολή δραστικών ειδών οξυγόνου σε σαλικυλικό οξύ σε σύστημα οξειδάσης της υποξανθίνης/ξανθίνης (Sotiroudis et al., 2003; Owen et al., 2000; Owuor & Kong 2002; Owen et al., 2000c). Εκχυλίσματα του ελαιόλαδου που περιείχαν ένα μείγμα γνωστών και αγνώστων φαινολικών ουσιών ήταν αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ότι σε καθαρή μορφή (Owen et al., 2000c). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, τα εκχυλίσματα ελαιόλαδου είναι ικανοί αναστολείς της οξείδωσης της ξανθίνης, αν και παρόμοιες συγκεντρώσεις των εν λόγω απλών φαινόλων δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα (Owen et al., 2000c).

Άλλος σημαντικός ρόλος των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου, σε σχέση με το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και ανάπτυξης καρκίνου, αφορά την ανασταλτική τους δράση κατά την παραγωγή των εικοσανοειδών. Μελέτες αναφέρουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ ανάπτυξης καρκίνου και μιας ανώμαλης υπερέκφρασης ενζύμων σχηματισμού εικοσανοειδών όπως οι λιποξυγονάσες (LOX) και κυκλοοξυγονάσες (COX). Επιπλέον, πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος συμβάλλουν στην μεταγωγή σήματος που συνδέεται με την ανάπτυξη (Cuendet & Pezzuto 2000). Ο De La Puerta και η ομάδα του (De La Puerta et al.,

1999) επίσης απέδειξαν ότι μερικά φαινορικά συστατικά από το πολικό κλάσμα του παρθένου ελαιόλαδου αναστέλλουν αποτελεσματικά τη δημιουργία λευκοτριενίου B₄ στο επίπεδο της 5-LOX με σειρά αποτελεσματικότητας, υδροξυτυροσόλη > ελευρωπαΐνη > καφεϊκό οξύ > τυροσόλη. Αντιθέτως, κανένα απ' αυτά τα συστατικά δεν αναστέλλει τη δημιουργία της μέσω της κυκλοοξυγονάσης.

Η ικανότητα κάποιων πολυφαινόλων να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική τους δράση, επειδή ο εν λόγω σχηματισμός μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την περισυλλογή τους σε ειδική θέση scavenging ("site-specific scavenging") (Purpo 1992; Van Acker et al., 1998). Εντούτοις έχει τονισθεί, ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να έχουν προ-οξειδωτικές δράσεις ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης, όπως παρουσία συμπλόκων σιδήρου ή σύμφωνα με την συγκέντρωση του μεταλλικού ιόντος (Purpo 1992; Suiqihara et al., 1999). Οι ο-διφαινόλες του ελαιόλαδου συμπλοκοποιούν διάφορα μεταλλικά κατιόντα και, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μετατρέπονται σε προοξειδωτικά. Ο ταχύς σχηματισμός των χηλικών συμπλόκων συνήθως συνοδεύεται από μια μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης της πολυφαινόλης και από μια βραδεία χημική οξείδωση του αντιοξειδωτικού μορίου (Sotiroudis et al., 2003; Aruoma et al., 1998; Deiana et al., 1999).

Αρκετές μελέτες αναφορικά με τις πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειραματικά συστήματα, κατέληξαν στα παρακάτω συμπεράσματα, τα οποία είναι πιθανόν να σχετίζονται με το αντιοξειδωτικό τους δυναμικό:

(α) Το οξειδωτικό στρες, που προκλήθηκε παρουσία H₂O₂ και οξειδάσης της ξανθίνης στα Caco-2 ανθρώπινα κύτταρα, αναστάληκε παρουσία συγκεντρώσεων 100-500 μmol/L της υδροξυτυροσόλης. Στο ίδιο σύστημα, η τυροσόλη ήταν αναποτελεσματική σε συγκεντρώσεις κάτω των 500 μmol/L (Sotiroudis et al., 2003; Manna et al., 1997).

(β) Υδροξυτυροσόλη και ελευρωπαΐνη αποδείχτηκαν ικανοί περισυλλέκτες ριζών υπεροξειδίου (Sotiroudis et al., 2003; Visioli et al., 1998)

(γ) Ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη ήταν αποτελεσματικοί περισυλλέκτες ριζών των δραστικών μορφών αζώτου ενώ η τυροσόλη, που δεν έχει το κατεχολικό τμήμα στο μόριό της, ήταν λιγότερο δραστική (De la Puerta et al., 2001)

(δ) Η δραστικότητα του ενζύμου ββ-υδροξυλάσης της ανδροστενοδιόνης και η αναγωγική δραστικότητα της αφυδρογονάσης των 17β-υδροξυστεροειδών από ανθρώπινο ήπαρ, ανεστάλησαν από την ελευρωπαΐνη, την υδροξυτυροσόλη και το γαλλικό οξύ. Ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών των συστατικών που δρουν ως αναστολείς, έδειξε ότι η 3,4-διυδροξυφαινυλ-αιθανολική δομή είναι απαραίτητη προκειμένου να ανασταλεί η δραστικότητα της ββ-υδροξυλάσης από την ομάδα αυτή των συστατικών (Stupans et al., 2000).

2.8. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

2.8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για να κατανοήσουμε πλήρως την οξείδωση των λιπιδίων στα τρόφιμα, όπου αυτά βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό υπό την μορφή γαλακτωμάτων, πρέπει να κατανοήσουμε τις δομές των γαλακτωμάτων και τον τρόπο που συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις. Πολλές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων, μπορούν να γίνουν κατανοητές μόνο λαμβάνοντας υπ' όψη την υψηλή δυναμική φύση τους π.χ. τα σφαιρίδια του ελαίου βρίσκονται σε διαρκή κίνηση και αλληλοσυγκρούονται (γαλάκτωμα νερού σε έλαιο.).

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει το ελαιόλαδο περιέχει ενδογενή αμφίφιλα μόρια, όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, αλλά και δευτερεύοντα συστατικά όπως φωσφολιπίδια, πολυφαινόλες και γλυκερίδια. Σε μελέτες (Georgalaki et al., 1998a; Georgalaki et al., 1998b) έχει αποδειχθεί η ύπαρξη πρωτεϊνών και ενζύμων στο παρθένο ελαιόλαδο. Ως συνέπεια των παραπάνω το ίδιο το παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να θεωρηθεί ως ένα γαλάκτωμα νερού σε μία μη πολική φάση (ελαιόλαδο) (Bianco et al., 1998).

2.8.2. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ-ΔΟΜΕΣ

Κατά την άλεση της ελιάς εκτός από το λάδι, ελευθερώνεται και το νερό που περιέχεται στους φυτικούς ιστούς του ελαιοκάρπου. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο σχηματισμός γαλακτωμάτων τα οποία περιέχονται στην ελαιόπαστα και μάλιστα σε αρκετές περιπτώσεις λαμβάνονται ειδικά μέτρα για το «σπάσιμο» αυτών των γαλακτωμάτων.

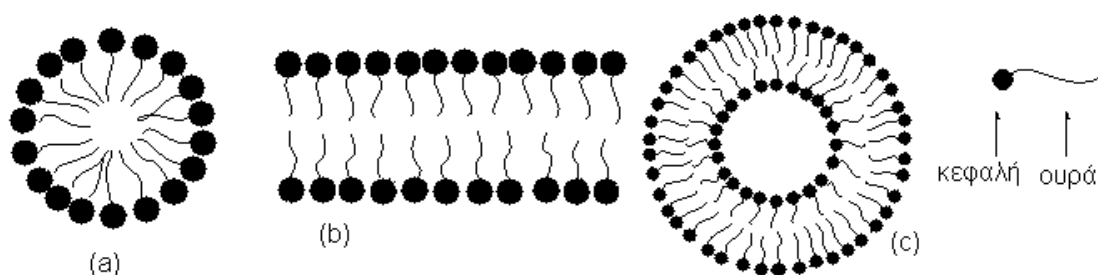
Γενικά, τα γαλακτώματα αποτελούνται από δύο μη- αναμειγνυόμενα υγρά, μια πολική και μία μη πολική φάση. Η μία φάση βρίσκεται σε διασπορά μικρών σφαιριδίων μέσα στην άλλη. Στα τρόφιμα αυτές οι δυο φάσεις συνήθως είναι νερό και έλαιο και το σύνηθες μέγεθος αυτών των σφαιριδίων είναι περίπου από 0,1 μm ως 50 μm.

Τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα, λόγω του θετικού ποσού της ελεύθερης ενέργειας, που απαιτείται για την αύξηση της επιφάνειας μεταξύ των δυο φάσεων (ελαιίου και νερού) (Dickinson 1992) και με την πάροδο του χρόνου τα γαλακτώματα διαχωρίζονται πλήρως. Για να διατηρηθεί η δομή του γαλακτώματος για μεγάλα χρονικά διαστήματα απαιτείται η χρήση χημικών ενώσεων, που καλούνται γαλακτωματοποιητές πριν το σχηματισμό των γαλακτωμάτων. Οι γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοενεργά μόρια που απορροφώνται στην επιφάνεια των σχηματιζόμενων σφαιριδίων, διαμορφώνοντας μια προστατευτική μεμβράνη η οποία δεν επιτρέπει στα σφαιρίδια να έρθουν αρκετά κοντά ώστε να συσσωματωθούν προς μία ενιαία φάση και τελικά να καταστραφεί το γαλάκτωμα (Dickinson 1992) .

Κάθε γαλάκτωμα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από 3 περιοχές : το εσωτερικό του κάθε σφαιριδίου, τη φάση της διασποράς και την μεσεπιφάνεια. Η μεσεπιφάνεια είναι η στενή περιοχή που περιβάλλει κάθε σφαιρίδιο του γαλακτώματος και συνίσταται σε ένα μίγμα ελαίου, ύδατος και επιφανειοενεργού, ενώ το πάχος της είναι μόλις της τάξεως των νανομέτρων (Dickinson & McClements 1995).

Τα διάφορα μόρια που περιέχονται σε κάθε γαλάκτωμα, ανάλογα με τη πολικότητα τους, διασπείρονται στην αντίστοιχη φάση. Τα μη πολικά μόρια βρίσκονται κυρίως στο εσωτερικό των σφαιριδίων του ελαίου, τα πολικά μόρια στην υδατική φάση και τα αμφίφιλα μόρια εντοπίζονται στη μεσεπιφάνεια, το ακριβές περιβάλλον κάθε ένωσης παίζει καθοριστικό ρόλο στη δυνατότητα να δώσει αντιδράσεις αλλά και στις ιδιότητες του συστήματος (coupland & McClements 1996).

Η μορφή των σταθερών γαλακτωμάτων καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του γαλακτωματοποιήτη (επιφανειοενεργό) που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό τους. Ορισμένοι τύποι γαλακτωματοποιήτων μετακινούνται ταχύτατα μεταξύ της μεσεπιφάνειας και της υδατικής φάσης (ή και της ελαιώδους), κάποιιοι άλλοι κάνουν αυτή τη μετακίνηση αργά και κάποιιοι καθόλου. Μη πολικά μόρια μπορούν να μεταφερθούν από το ένα σφαιρίδιο στο άλλο κατά τη σύγκρουσή αυτών των δυο, μέσω διάχυσης ή και με σύνδεση στη μικκυλιακή δομή. Όταν τα επιφανειοενεργά βρίσκονται σε διάλυμα σχηματίζουν αυθόρμητα διάφορες θερμοδυναμικά σταθερές δομές όπως : μικκύλια, διπλοστοιβάδες και κυστίδια (βλ. εικόνα 8).



Εικόνα 8. Δομές επιφανειοενεργών σε γαλακτώματα. (a): μικκύλιο, (b): διπλοστοιβάδα, (c): κυστίδια

Αυτές οι δομές σχηματίζονται γιατί ελαχιστοποιούν την επιφάνεια επαφής μεταξύ μιας πολικής και μίας μη – πολικής περιοχής. Η ακριβής φύση του σχηματισμού αυτών των μοριακών συσσωματωμάτων εξαρτάται από τη γεωμετρία των μορίων αλλά και τις αλληλεπιδράσεις κεφαλής-ουράς των επιφανειοενεργών (Dickinson & McClements 1995). Τόσο στα μικκύλια όσο και στα κυστίδια, τα επιφανειοενεργά τοποθετούνται έτσι ώστε το

υδρόφοβο μέρος (ουρά) τους να είναι στραμμένο προς τη μη πολική φάση ενώ το πολικό τους τμήμα (κεφαλή) να είναι στραμμένο προς την επιφάνεια, σε επαφή με την πολική φάση.

Στον υδρόφοβο εσωτερικό πυρήνα των μικκυλίων και των κυστιδίων είναι δυνατό να διαλύσουμε μη πολικά μόρια και αυτή η δυνατότητα μας δίνει τις παρακάτω πρακτικές εφαρμογές :

1. μπορούμε να αυξήσουμε τη συγκέντρωση μη πολικών μορίων στην υδατική φάση
2. μη πολικά μόρια δύναται να μεταφερθούν σε υδατική φάση, στην οποία κανονικά είναι αδιάλυτα
3. η ταχύτητα ορισμένων αντιδράσεων μεταβάλλεται σε τέτοιες δομές σε σχέση με κανονικά διαλύματα.

2.8.3. ΓΑΛΑΚΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

Επειδή όπως αναφέραμε και προηγουμένως, τα γαλακτώματα είναι ασταθή για να εμποδιστεί η συνένωση και διαχωρισμός των δύο φάσεων, προστίθενται επιφανειοενεργές ουσίες. Οι ουσίες αυτές προσροφώνται στη μεσεπιφάνεια, ελαττώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ των δύο φάσεων και επομένως μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια επιφάνειας του συστήματος. Συγχρόνως σχηματίζουν μια προστατευτική στιβάδα γύρω από κάθε σταγονίδιο με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της συνένωσης τους. Το τελευταίο είναι ίσως και το πιο σημαντικό αφού ενώσεις που δεν προκαλούν την ελάττωση της επιφανειακής τάσης εξακολουθούν και είναι καλοί γαλακτωματοποιητές, σχηματίζοντας μόνο μια προστατευτική στοιβάδα.(Παπαϊωάννου 1993).

Ανάλογα με το είδος της στιβάδας που σχηματίζεται στην μεσεπιφάνεια οι ουσίες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες :

- Επιφανειοενεργές ουσίες : οι ουσίες αυτές μπορούν να σταθεροποιήσουν ένα γαλάκτωμα σχηματίζοντας μια μονομοριακή στοιβάδα γύρω από κάθε σταγονίδιο μέσω προσροφήσεως μορίων ή ιόντων της ουσίας στην μεσεπιφάνεια ελαίου-ύδατος. Η τάση για συνένωση περιορίζεται λόγω μείωσης της επιφανειακής τάσης, εκτός αν πρόκειται για ιόντα, που οφείλεται στην άπωση των σταγονιδίων λόγω του φορτίου τους.
- Υδρόφιλα κolloειδή : ουσίες όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, συνθετικά πολυμερή, σχηματίζουν στοιβάδα γύρω από κάθε σταγονίδιο μέσω πολυμοριακής προσροφήσεως. Δεν προκαλούν μείωση της επιφανειακής τάσης, αλλά παρεμπόδιση της συνένωσης οφείλεται στην ικανότητα τους να σχηματίζουν ισχυρή και συνεκτική μεμβράνη γύρω από κάθε σταγονίδιο.

- Στερεές ουσίες σε λεπτό καταμερισμό : πρόκειται για πολικά ανόργανα στερεά (π.χ. άλατα βαρέων μετάλλων) αλλά και μη-πολικά στερεά (π.χ. άνθρακας, διστεατική γλυκερίνη). Τα πολικά διύγραινονται από νερό και τα μη-πολικά από έλαιο. Έτσι τα πολικά ευνοούν το σχηματισμό γαλακτωμάτων έλαιο-σε-νερό και τα μη-πολικά σχηματισμό γαλακτωμάτων νερό-σε-έλαιο. Οι ουσίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνδυασμό με τις δύο παραπάνω κατηγορίες. Ο τρόπος δράσης τους είναι η συγκέντρωση τους στην μεσεπιφάνεια όπου σχηματίζουν μία ιδιαίτερη μεμβράνη γύρω από κάθε σταγονίδιο (Παπαϊωάννου 1993).



2.8.4.ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ

Οι παράγοντες που καθορίζουν το σχηματισμό γαλακτώματος του τύπου ελαίου-σε-νερό (o/w) ή νερό-σε-έλαιο (w/o), σχετίζονται άμεσα με τις τρεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα κατά το σχηματισμό του γαλακτώματος.

1. Ο σχηματισμός των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσεως.
2. Ο σχηματισμός μίας προστατευτικής στοιβάδας γύρω από κάθε σταγονίδιο.
3. Η τάση των σταγονιδίων για συσσωμάτωση και συνένωση.

Οι τρεις αυτές διεργασίες από δυναμική άποψη αναλύονται παρακάτω.

Κατά τη μηχανική ανατάραξη μίγματος ελαίου και νερού, αρχικά και οι δυο φάσεις τείνουν να σχηματίσουν σταγονίδια. Η φάση που παραμένει υπό μορφή σταγονιδίων για μακρύτερο χρονικό διάστημα, θα γίνει η διεσπερμένη φάση του συστήματος. Τα σταγονίδια της άλλης φάσης, συνενούμενα με μεγαλύτερη ταχύτητα θα αποτελέσουν το μέσο διασποράς. Η αναλογία των δυο φάσεων, καθορίζει και την αναλογία των σταγόνων και κατά συνέπεια, την πιθανότητα συνένωσης τους. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις γαλακτωμάτων όπου η διεσπερμένη φάση είναι σε αναλογία μεγαλύτερη από 50%.

Ένα άλλο σπουδαίο σημείο είναι η προστατευτική στοιβάδα που σχηματίζει ο γαλακτωματοποιητής, εκλεκτικά γύρω από τα σταγονίδια της διεσπερμένης φάσης. Η στοιβάδα δρα σαν φυσικός ή χημικός παρεμποδιστικός παράγων με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ταχύτητα συνένωσης των σταγονιδίων.

Τέλος ο σχηματισμός και ο τύπος του γαλακτώματος επηρεάζονται από το ιξώδες της κάθε φάσεως. Το ιξώδες φαίνεται ότι έχει σχέση με το μέγεθος και τον αριθμό των σταγόνων κάθε φάσεως και με την ταχύτητα σχηματισμού της προστατευτικής στοιβάδας. Ακόμη το ιξώδες του μέσου διασποράς επηρεάζει και την ταχύτητα με την οποία κινούνται τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσεως, ιδιαίτερα κατά το στάδιο σχηματισμού του γαλακτώματος. Όσο μεγαλύτερο είναι αυτό τόσο μικρότερη θα είναι η ταχύτητα, με συνέπεια το σχηματιζόμενο γαλάκτωμα να είναι σταθερό. Το ιξώδες της υδατικής φάσεως μπορεί να αυξηθεί με τη διάλυση διαφόρων μεγαλομοριακών ενώσεων ή με την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή (Παπαϊωάννου 1993)..

2.8.5.ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

Σαν φυσική σταθερότητα αυτών των συστημάτων, ορίζεται η κατάσταση εκείνη στην οποία τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσεως, παραμένουν ομοιόμορφα κατανεμημένα μέσα στο μέσο διασποράς.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει τα συστήματα αυτά έχουν την αυθόρμητη τάση να οδηγηθούν σε διαχωρισμό των δυο φάσεων. Αυτό πραγματοποιείται ή με την ελάττωση της συνολικής επιφάνειας (συνένωση σταγονιδίων) ή με μείωση της επιφανειακής τάσης. Η επιφανειακή τάση ελαττώνεται με την προσθήκη επιφανειοενεργών ουσιών, όμως δεν μηδενίζεται ποτέ. Επομένως το σύστημα οδηγείται στη συνένωση των σταγονιδίων που έχει σαν συνέπεια τα παρακάτω:

Αστάθεια γαλακτωμάτων

- Σχηματισμός κρέμας και καθίζηση : η προς τα πάνω και προς τα κάτω αντίστοιχα μετακίνηση και συγκέντρωση των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσεως. Ο σχηματισμός κρέμας και η καθίζηση είναι ανεπιθύμητα λόγω της ανομοιογένειας που εμφανίζουν αλλά δεν συνίσταται στην καταστροφή του γαλακτώματος.
- Κροκίδωση και συνένωση ή θραύση : τα μικρά σωματίδια σχηματίζουν συσσωματώματα οποία συμπεριφέρονται σαν μεγαλύτερα απλά σταγονίδια. Αν τα παραπάνω συσσωματώματα συνεχίσουν να συνενώνονται, θα μειώνεται συνεχώς ο αριθμός των σταγόνων της διεσπαρμένης φάσεως ώσπου τελικά να έχουμε πλήρη διαχωρισμό των δυο φάσεων, δηλαδή την θραύση του γαλακτώματος.
- Αναστροφή των φάσεων : έχουμε όταν η διεσπαρμένη φάση μετατρέπεται σε μέσο διασποράς και το μέσο διασποράς σε διεσπαρμένη φάση. Αυτό είναι δυνατό ή με την προσθήκη ενός ηλεκτρολύτη ή με μεταβολή της αναλογίας των όγκων των δυο φάσεων (Παπαϊωάννου 1993) .

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εκχύλιση και ο μερικός καθαρισμός πρωτεϊνών από το παρθένο ελαιόλαδο χρησιμοποιώντας διαφορετικά πειραματικά σχήματα τα οποία θα διαφέρουν στις συνθήκες εκχύλισης και στον τρόπο διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Ο τελικός στόχος είναι να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα καθώς και η εφαρμογή της μεθόδου Bradford για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και της μεθόδου Folin για τον

ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στα ανωτέρω πρωτεϊνικά/πολυφαινολικά παρασκευάσματα. Επιπλέον θα μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση των παρασκευασμάτων αυτών ως προς την ικανότητα τους να ανάγουν την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Υλικά

- Παρθένο ελαιόλαδο

4.2. Αντιδραστήρια

- **Αντιδραστήριο Bradford**

Προϊόν της εταιρίας (Sigma B 6916-500 μ L) .

- **Πρωτεΐνη**

Αλβουμίνη (BSA) της εταιρίας SERVA

- **Tris**

(2-άμινο-2 (υδροξυμέθυλο) προπανοδιόλη 1,3) Προϊόν της εταιρείας Serva.

- **DPPH**

Προϊόν της εταιρείας SIGMA.

- **(NH₄)₂ SO₄**

Ammonium sulfate Προϊόν της εταιρείας Panreac.

- **SDS**

(θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο) Προϊόν της εταιρείας Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

- **Polyclar AT**

Προϊόν της εταιρίας SERVA.

- **Sephacryl S-300 και Sephadex G-25**

Προϊόντα της εταιρίας Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

- **blue dextrane**

κυανό της δεξτράνης Προϊόν της εταιρίας Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

- **Φυγοκεντρικά φίλτρα υπερδιήθησης**

Τα φυγοκεντρικά φίλτρα υπερδιήθησης Centricon με όριο Μοριακού Βάρους (Nominal Molecular Weight Limit) 10,000 ήταν της εταιρείας Millipore, USA.

4.3. Συσκευές

- **Φωτόμετρα :**

Novaspec II. Pharmacia Biotech, Sweden.

- **Φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους (UV/VIS):**

Cary 1E. Varian, Australia.

Για τη λήψη όλων των φασμάτων στο φασματοφωτόμετρο (Cary 1E) χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες από χαλαζία με μήκος διαδρομής 1cm καθώς και πλαστικές κυψελίδες με ίδιο μήκος διαδρομής.

- **Στήλη FPLC :**

Στήλη χρωματογραφίας μοριακού ηθμού Sephacryl S-300 (34 x 1.1 cm) της Pharmacia.

- **Συσκευή μετρήσεως pH :**

Το pHμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Metrohm (691 pHMeter).

- **Μηχανικός αναδευτήρας:**

Vortex Genie 2: Scientific Industries.

- **Φυγόκεντρος:**

Centrifuge 5415 C. Eppendorf, Germany.

4.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

4.4.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στη σύνδεση της χρωστικής ουσίας Coomassie blue G-250 στην πρωτεΐνη.

Μελέτες έδειξαν ότι η ελεύθερη χρωστική ουσία μπορεί να υπάρξει σε τρεις διαφορετικές ιοντικές μορφές για τις οποίες η τιμή pKa είναι 1.15 , 1.82 και 12.4. Από τις τρεις διαφορετικές μορφές της χρωστικής ουσίας που υπερισχύουν στην όξινη συμπεριφορά του αντιδραστηρίου , οι πιο κατιονικές κόκκινες και πράσινες μορφές έχουν τα μέγιστα απορροφητικότητας σε 470 nm και 650 nm αντίστοιχα.

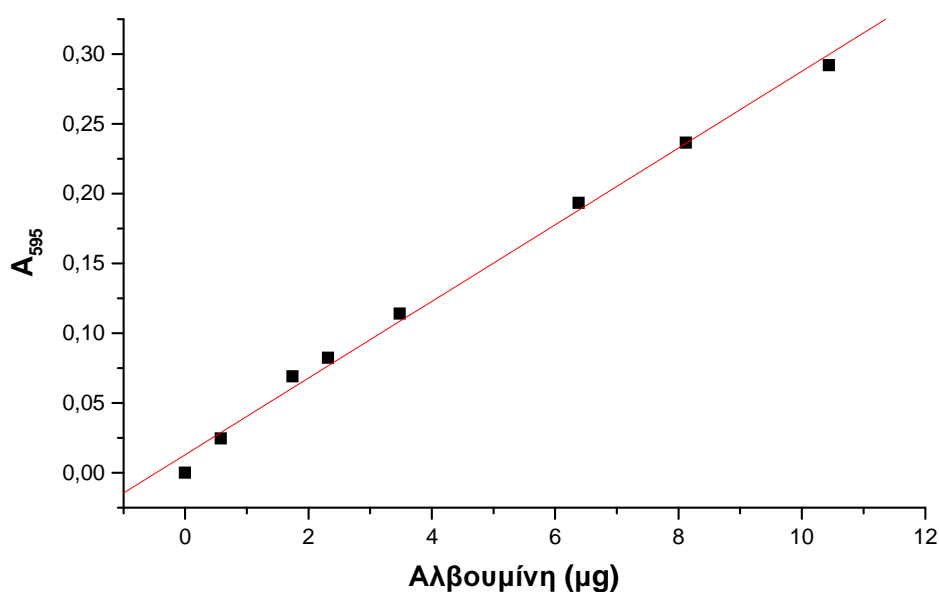
Αντίθετα η πιο ανιονική μπλε μορφή της χρωστικής ουσίας που συνδέεται στην πρωτεΐνη, έχει ένα μέγιστο απορροφητικότητας στα 595 nm.

Κατά συνέπεια η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογισθεί με τον καθορισμό του ποσού της χρωστικής ουσίας στην μπλε ιοντική μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται με μέτρηση απορροφητικότητας του διαλύματος στα 595 nm.(instruction manual).

Εφαρμογή μεθόδου

- Ποσότητα δείγματος αραιώθηκε μέχρι όγκο 1ml
- Ακολουθεί προσθήκη και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και ανάδευση.
- Μετά από 5 έως 45 min ακολουθεί μέτρηση απορρόφησης στα 595 nm

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο προέκυψε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



Εικόνα 9.: Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αλβουμίνης με την μέθοδο Bradford

4.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN.

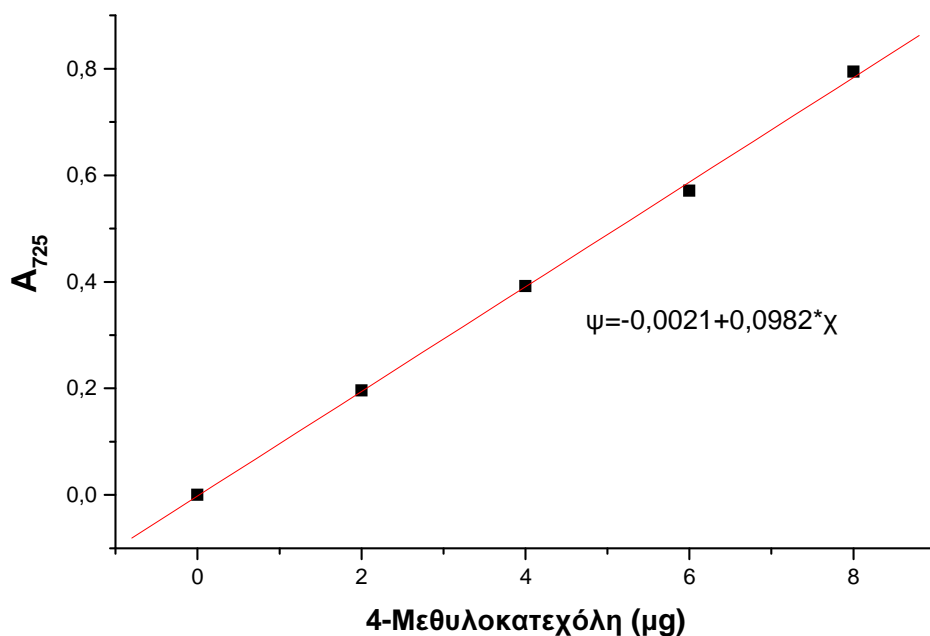
Η μέθοδος Folin στηρίζεται στο γεγονός ότι το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu το οποίο είναι ένα μείγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδενικού οξέος, κατά την οξείδωση των φαινολών τα οξέα αυτά μετατρέπονται σε μπλέ οξειδία

βολφραμίου(W_8O_{23}) και μολυβδενίου(MO_8O_{23}) . Αυτή η αντίδραση εμφανίζεται σε αλκαλικό περιβάλλον και πραγματοποιείται παρουσία ανθρακικού άλατος νατρίου. Ο μπλε χρωματισμός που προκύπτει μετράται στα 795 nm και απεικονίζει την ποσότητα των πολυφαινολών σε ισοδύναμα 4-μέθυλο-κατεχόλης. (George et al., 2005)

Εφαρμογή μεθόδου

- Ποσότητα δείγματος αραιώθηκε μέχρι όγκο 600 μl.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 60 μL Folin Ciocalteau.
- Μετά από 3 min προστέθηκαν 120 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (35%).
- Τέλος κάθε όγκος αραιώθηκε σε όγκο 1,2 ml και ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων .
- Μετά από 45 min το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 10000 rpm και ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης στα 725 nm.

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο προέκυψε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



Εικόνα 10.: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού πολυφαινολών με το αντιδραστήριο Folin και την πρότυπη πολυφαινόλη 4-μεθυλοκατεχόλη

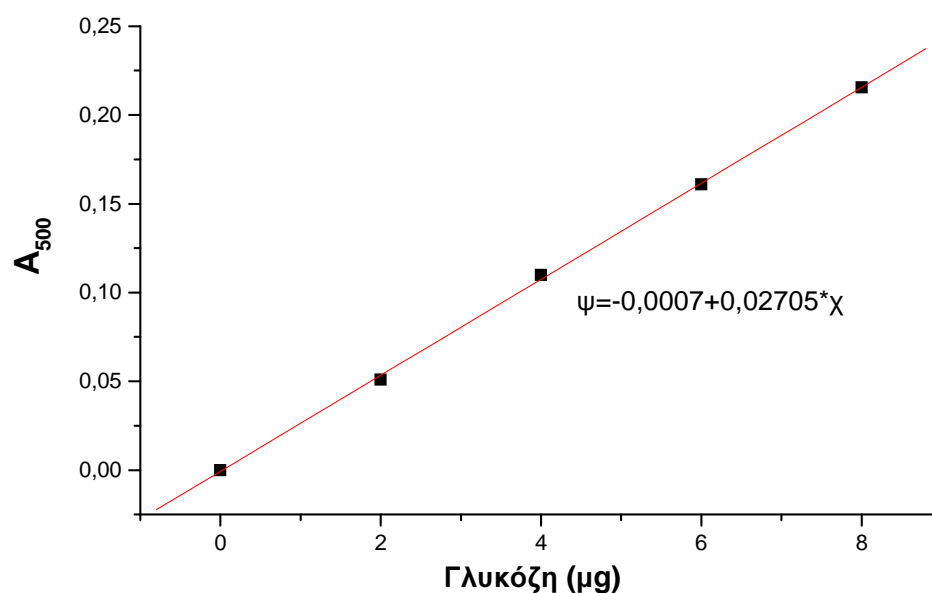
4.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ DUBOIS

Η μέθοδος Dubois στηρίζεται στο ότι απλά ζάχαρα ,ολιγοσακχαρίτες , πολυσακχαρίτες και τα παράγωγά τους , συμπεριλαμβανομένων και των μεθυλικών αιθέρων με ελεύθερες ομάδες δίνουν ένα πορτοκαλί-κίτρινο χρώμα όταν αντιδράσουν με φαινόλη παρουσία πυκνού θεικού οξέος. Η αντίδραση είναι ευαίσθητη και το χρώμα σταθερό (Dubois et al., 1955).

Εφαρμογή μεθόδου

- Ποσότητα δείγματος αραιώθηκε μέχρι όγκο 100 μl.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl φαινόλη 5% και 1000 μl H₂SO₄.
- Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων 1,5 h.
- Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 500 nm.

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο προέκυψε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη:



Εικόνα 11. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού σακχάρων με την μέθοδο Dubois και το πρότυπο σάκχαρο γλυκόζη.

4.5. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .

Η μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση των υδρόφιλων πρωτεϊνικών συστατικών του ελαιολάδου με την δημιουργία γαλακτώματος και την εν συνεχεία καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο

Εφαρμογή μεθόδου

- 1) Σε όγκο 175 ml παρθένου ελαιολάδου προστέθηκε ίση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM , pH 7,5 παρουσία ,1M NaCl.
- 2) Έγινε μαγνητική ανάδευση για 48 h στους 4° C
- 3) Φυγοκέντρωση στις 5.500 rpm (5000 x g) για 30 min στους 15°.
- 4) Μετά την φυγοκέντρωση ακολούθησε διαχωρισμός σε διαχωριστική χοάνη και λήψη της υδατικής φάσης.
- 5) Καταβύθιση της υδατικής φάσης με θειικό αμμώνιο 80% και παραμονή του διαλύματος όλη τη νύχτα στους 4°C.
- 6) Φυγοκέντρωση του ιζήματος για 1 ώρα στα 15000 g στους 15°.
- 7) Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και συλλέχθηκε το ίζημα.
- 8) Επαναιώρηση του ιζήματος με 1.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl.
- 9) Φυγοκέντρωση από 10.000 rpm για 10 min
- 10) Διαχώρισμός του ιζήματος από το εκχύλισμα .
- 11) Ακολούθηθηκε διαπίδυση του εκχυλίσματος για 72 h στους 4°C έναντι του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl.

Η Μέθοδος απομόνωσης των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε επιπλέον και για άλλες δυο φορές με κάποιες παραλλαγές κάθε φορά.

4.5.1 2^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .

Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν ο χρόνος εκχύλισης του ελαιολάδου με το ρυθμιστικό διάλυμα επηρεάζει την παραλαβή των πρωτεϊνικών συστατικών του, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την πρώτη μέθοδο εκχύλισης σε 250 ml ελαιολάδου, η οποία όμως διέφερε στα παρακάτω στάδια :

- ❖ Στο δεύτερο στάδιο η μαγνητική ανάδευση πραγματοποιήθηκε για 24 h.
- ❖ Στο έκτο στάδιο λόγω του ότι υπήρχε ίζημα εν αιώρηση στην υδατική φάση έγινε και επιπλέον φυγοκέντρωση σε περισσότερες στροφές .

4.5.2 3^η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.

Με σκοπό να μελετηθεί το σύνολο των πρωτεϊνικών ειδών που παραλαμβάνονται μετά από καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, όλα τα στάδια της εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την 2^η μέθοδο απομόνωσης, σε 240 ml ελαιολάδου, αλλά στο τελικό δείγμα δεν πραγματοποιήθηκε το στάδιο της διαπίδυσης μετά την διαλυτοποίηση του ιζήματος έτσι ώστε να μην απομακρυνθούν τα μικρού Μοριακού Βάρους πεπτίδια.

4.6. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ

Αρχή της μεθόδου

Ο καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους επιτυγχάνεται με την τεχνική της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή ή μοριακού ηθμού ή μοριακής διήθησης. Το δείγμα μπαίνει στην κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους φτιαγμένους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατεί πολύ νερό, όπως η δεξτράνη, η αγαρόζη ή το πολυακρυλαμίδιο. Μικρά μόρια περνούν μέσα από τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν να περάσουν μέσα από αυτούς. Αποτέλεσμα είναι ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδατικό περιβάλλον μέσα στους κόκκους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Έτσι κατά την διαδικασία της χρωματογραφίας τα μεγάλα μόρια περνούν πιο γρήγορα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα.

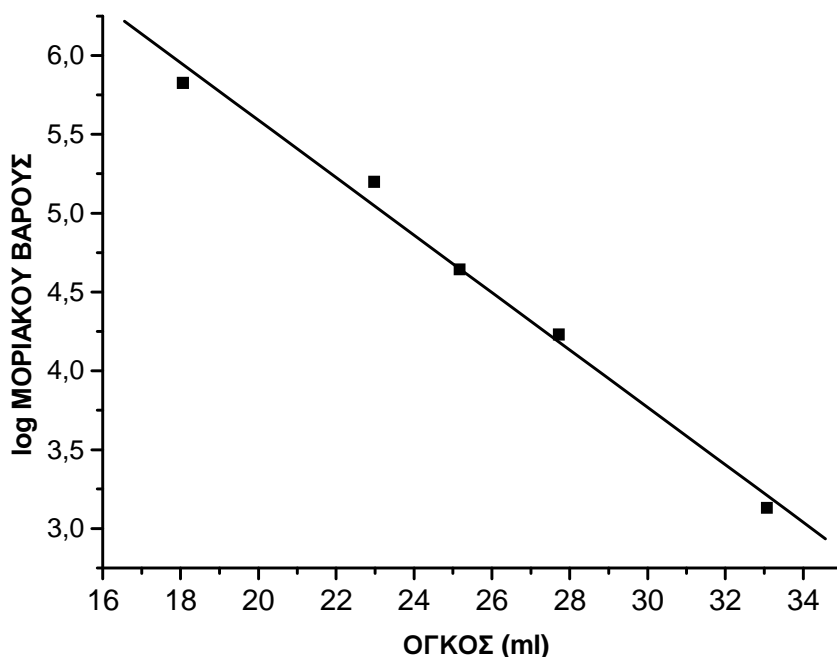
4.6.1 Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή Sephacryl S-300

Για την μοριακή διήθηση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε στήλη η οποία περιείχε Sephacryl S-300.

Με σκοπό τον προσδιορισμό της Μοριακής Μάζας των πρωτεϊνικών μοριακών ειδών που εκχυλίζονται από το παρθένο ελαιόλαδο πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης, χρησιμοποιώντας στήλη Sephacryl S-300 (30 x 1.1 cm). Η στήλη εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH 6.0, που περιείχε 0.1 M NaCl.. Για τον προσδιορισμό του Μοριακού Βάρους των πρωτεϊνών, δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα μεταξύ του λογαρίθμου του μοριακού βάρους και του όγκου έκλουσης, για πρωτεΐνες γνωστής Μοριακής Μάζας που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης ως μάρτυρες (εικόνα 12). Έτσι σύγκριση του όγκου έκλουσης του κλάσματος, που αντιστοιχεί στα μοριακά είδη του ελαιολάδου, με τον όγκο έκλουσης προτύπων πρωτεϊνών, γνωστού μοριακού βάρους στην ίδια στήλη, επιτρέπει τον προσδιορισμό με αρκετή ακρίβεια, της Μοριακής Μάζας των μοριακών αυτών ειδών. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Θυρεοσφαιρίνη (MB=670,000)
- 2) Βοδινή γ-σφαιρίνη (MB=158,000)
- 3) Αλβουμίνη κοτόπουλου (MB=44,000)
- 4) Μυογλοβίνη αλόγου (MB=17,000)
- 5) Βιταμίνη B-12 (MB=1,350)

Μετά το πέρασμα από την στήλη των πρωτεϊνικών δεικτών προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα :



Εικόνα 12. Απεικόνιση της ημιλογαριθμικής συνάρτησης του μοριακού βάρους σε σχέση με τον όγκο έκλουσης των πρότυπων πρωτεϊνικών μορίων

4.6.2 Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή Sephadex G-25.

Για τον γρήγορο διαχωρισμό των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από πολυφαινολικές ενώσεις που συνδέονται μη-ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες του ελαιολάδου, χρησιμοποιήθηκε μικρή στήλη η οποία περιείχε Sephadex G-25 Superfine.

Για τον έλεγχο της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω δείκτες;

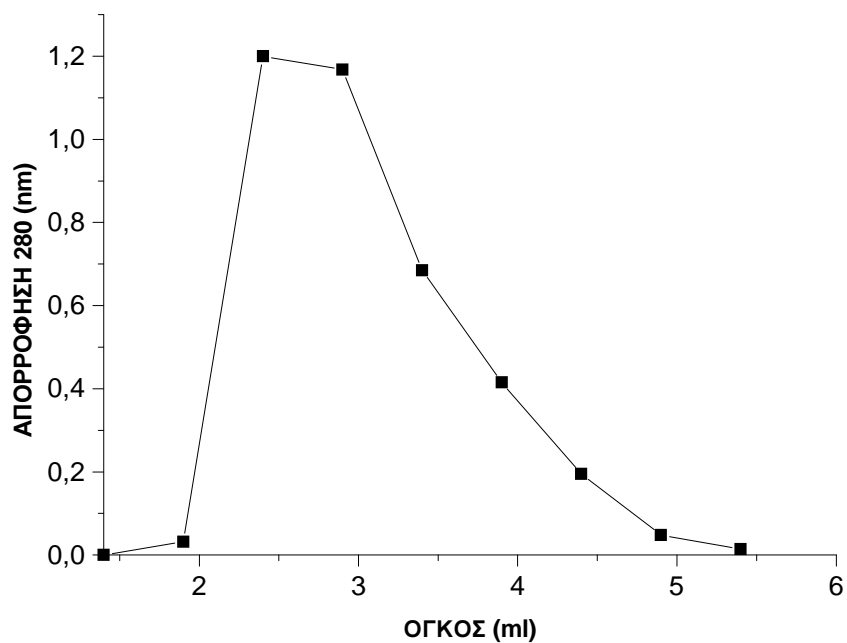
- Κυανούν της δεξτάνης (blue dextran) (για τον προσδιορισμό του όγκου έκλουσης μεγάλου Μοριακού Βάρους μορίων).
- 4-μέθυλο-κατεχόλη (MB=124,1) (για τον προσδιορισμό του όγκου έκλουσης μικρού Μοριακού Βάρους πολυφαινολών)

Τα χαρακτηριστικά της στήλης φαίνονται παρακάτω:

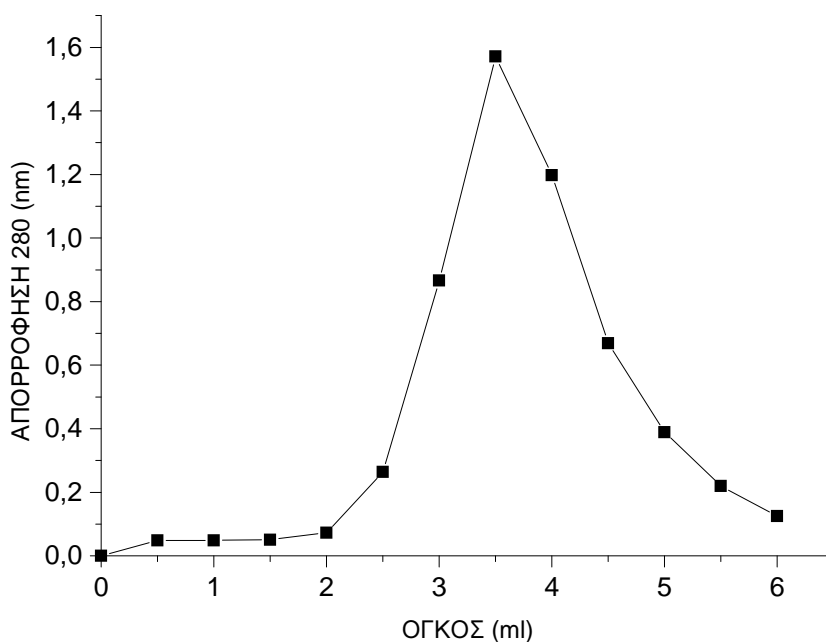
- Ροή της στήλης : 12,93 ml /hour.
- Όγκος της στήλης : 5,5 ml.

Από τον δείκτη κυανού της δεξτράνης ο οποίος εμπεριεχόταν σε 20% μεθανόλη τοποθετήθηκαν στην στήλη 0,3ml και από τον δείκτη 4-μέθυλο-κατεχόλη ο οποίος εμπεριεχόταν σε 60% μεθανόλη τοποθετήθηκαν επίσης 0,3 ml. Η έκλουση έγινε με 60% μεθανόλη.

Σύμφωνα με την μέθοδο προέκυψαν οι παρακάτω γραφικές παραστάσεις:



Εικόνα 13. Απορρόφηση των κλασμάτων κυανού της δεξτράνης στα 280 nm μετά την διάδο από την στήλη Sephadex G-25.

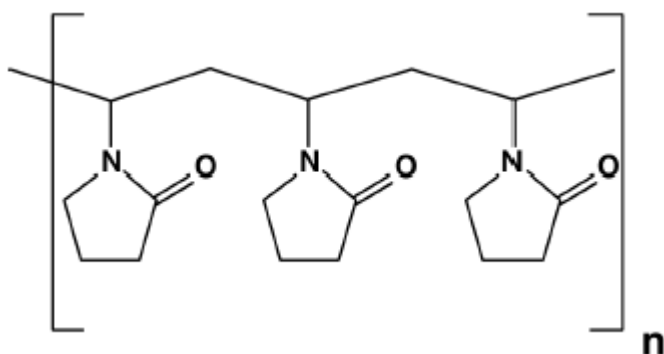


Εικόνα 14. Απορρόφηση των κλασμάτων 4-μέθυλο-κατεχόλης στα 280 nm μετά την δίοδο από την στήλη Sephadex G-25.

Όπως παρατηρήθηκε στις εικόνες 13 και 14, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε, υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ του μέγιστου του όγκου έκλουσης της μεγαλομοριακής δεξτράνης (2,4 ml) και της μικρομοριακής πολυφαινόλης (3,5 ml).

4.7.— ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ POLYCLAR.

Το αδιάλυτο πολυμερές πολυβινιλο-πολυπυρρολιδόνη ή polyclar (polyvinylpyrrolidone-PVPP) (εικόνα 15) είναι ευρύτατα γνωστό για την ικανότητα του να δεσμεύει πολυφαινόλες και χρησιμοποιείται στην βιομηχανία της μπίρας για την σταθεροποίηση του προϊόντος με απομάκρυνση του θολώματος της μπίρας που οφείλεται στη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης-πολυφαινολών. Η απομάκρυνση των πολυφαινολών με την βοήθεια του polyclar οφείλεται στη δημιουργία πολύ ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ του polyclar και των πολυφαινολών κατά την προσρόφηση τους στην επιφάνεια του πολυμερούς (Rehmanji et al., 2005; Gopal @ Rehmanji, 2000).



Εικόνα 15. Polyclar (Rehmanji et al., 2005).

Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το πολυμερές αυτό για την απομάκρυνση πολυφαινολών από ορισμένα πρωτεϊνικά κλάσματα ελαιολάδου.

Σε 0,2 ml δείγματος προστέθηκε η χημική ένωση polyclar σε ποσοστό 5%.

- Ακολούθησε ανάδευση.
- Μετά την ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 10 min.
- Τέλος πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί πολυφαινολικών ενώσεων και πρωτεϊνών για να διαπιστωθεί η μεταβολή της συγκέντρωσης τους σε σχέση με την αρχική.

4.8 ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ

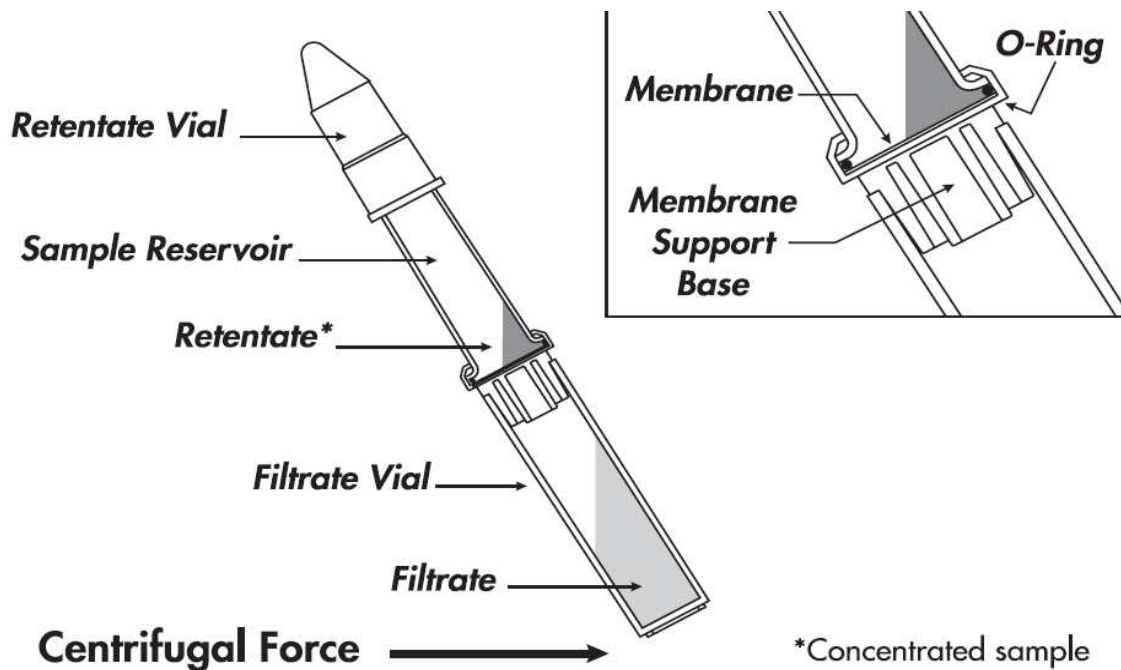
Με στόχο τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υπερδιήθησης η οποία είναι μία από τις διεργασίες διαχωρισμού με μεμβράνες οι οποίες συγκαταλέγονται στις διεργασίες με ωθούσα δύναμη την πίεση. Καλύπτει την περιοχή ανάμεσα στην μικροδιήθηση και την αντίστροφη όσμωση και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό σωματιδίων 0,001-0,02μm. Διαλύτες και άλατα χαμηλού μοριακού βάρους διέρχονται μέσα από τη μεμβράνη ενώ μεγαλύτερα μόρια συγκρατούνται. Συνεπώς η βασική εφαρμογή της υπερδιήθησης είναι ο διαχωρισμός μακρομορίων με μέγεθος συγκράτησης σε εύρος μοριακής μάζας 300-300000. οι μεμβράνες υπερδιήθησης είναι περατές για μόρια μοριακής μάζας της τάξης <1000 και συνεπώς παρουσιάζουν χαμηλή συγκράτηση αλάτων. Στην υπερδιήθηση και γενικότερα στην περίπτωση των πορωδών δομών ισχύει ο μηχανισμός της ημιπερατότητας δηλαδή το “φαινόμενο κοσκινίσματος”(sieving effect), όπου ο

διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορά μεγεθών. Σύμφωνα με τον απλό αυτό μηχανισμό , σε μια ρευστή φάση που περιέχει μόρια ή/και σωματίδια και η οποία αναγκάζεται να περάσει δια μέσου της μεμβράνης , τα μόρια ή τα σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους από το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης , δεν μπορούν να περάσουν δια μέσου της μεμβράνης , αντίθετα με τα μικρότερα που έχουν την τάση να περνούν.

Η απόδοση των μεμβρανών υπερδιήθησης γενικά καθορίζεται από το ελάχιστο μοριακό βάρος συγκράτησης και το θεωρητικό μέγεθος των πόρων. Αυτές οι τιμές είναι προσεγγιστικές διότι τα ίδια μόρια μπορεί να έχουν διαφορετικές ακτίνες εξαρτώμενες από τις ιδιότητες του διαλύματος όπως pH, ιοντική ισχύς κλπ. Όσον αφορά το μέγεθος πόρων, υφίσταται πάντοτε μια κατανομή . Επιπρόσθετα θα υπάρχουν αναπόφευκτα φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον διαλυτή-διαλυμένη ουσία και την επιφάνεια της μεμβράνης .Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αθροιστικά μπορεί να είναι απωστικές ή ελκτικές και να οδηγήσουν στη μεγαλύτερη ή μικρότερη δέσμευση της διαλυμένης ουσίας στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το γεγονός αυτό, ακολούθως , μπορεί να προκαλέσει τη μείωση της διαπερατότητας.

Οι επιδράσεις της οσμωτικής πίεσης στις μεμβράνες υπερδιήθησης είναι μικρές και η εφαρμοζόμενη πίεση , της τάξης των 1-7 bar,ασκείται πρωταρχικά για να ξεπεραστεί η ιζώδης αντίσταση της διαπέρασης του υγρού από το δίκτυο πόρων της μεμβράνης. Οι μεμβράνες υπερδιήθησης με εμπορικές εφαρμογές είναι ασύμμετρες , με ένα λεπτό επιφανειακό στρώμα πάχους 0,1-1μm ,το οποίο έρχεται σε επαφή με το ρεύμα τροφοδοσίας. Αυτό το επιφανειακό στρώμα υποστηρίζεται από ένα μακροπορώδες στρώμα πάχους 50-250 μm.

Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται η διάταξη φυγοκεντρικού φίλτρου υπερδιήθησης Centricon που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υπερδιήθησης.



Εικόνα 16. Συσκευή φυγοκεντρικού φίλτρου υπερδιήθησης Amicon-Centricon (Millipore). Retentate: κατακράτημα, filtrate: διήθημα. (Amicon-Centricon Centrifugal Filter Devices, DataSheet, Millipore, USA, 2004)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Ποσότητα δείγματος περίπου 300-400 μl τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα υπερδιήθησης με μεμβράνη με όριο Μοριακού Βάρους τα 10000. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 min στις 6000 rpm .
- Στη συνέχεια προστέθηκαν στο υπόλοιπο του δείγματος 350 μl 60% μεθανόλης και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά για 10 min στις 6000 rpm.
- το παραπάνω στάδιο επαναλήφθηκε για ακόμα δύο φορές.

4.9 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Περίπου 10g παρθένου ελαιολαδου διαλύθηκαν σε 50ml εξανίου.
- Έγιναν εκπλήσεις 3 φορές με 20ml υδατικής μεθανόλης 60%.

- Ανάμιξη για 2min κάθε φορά.
- Συγκέντρωση όλων των εκχυλισμάτων μεθανόλης.
- Εξάτμιση στους 40° C.
- Διάλυση του υπολείματος σε 1 ml μεθανόλης.
- Συνεχίζεται η διαδικασία που εφαρμόζεται στην μέθοδο Folin για τον προσδιορισμό πολυφαινολικών ουσιών .

Η παραπάνω μέθοδος πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές απ' όπου το δείγμα της δεύτερης επανάληψης χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό από την στήλη Sephadex G-25 ενώ το δείγμα της τρίτης επανάληψης αφού πρώτα εξατμίστηκε με άζωτο χρησιμοποιήθηκε για το δεύτερο στάδιο αναλύσεων της μεθόδου εκχύλισης πρωτεϊνών από το ίζημα με ακετόνη .

4.10. ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

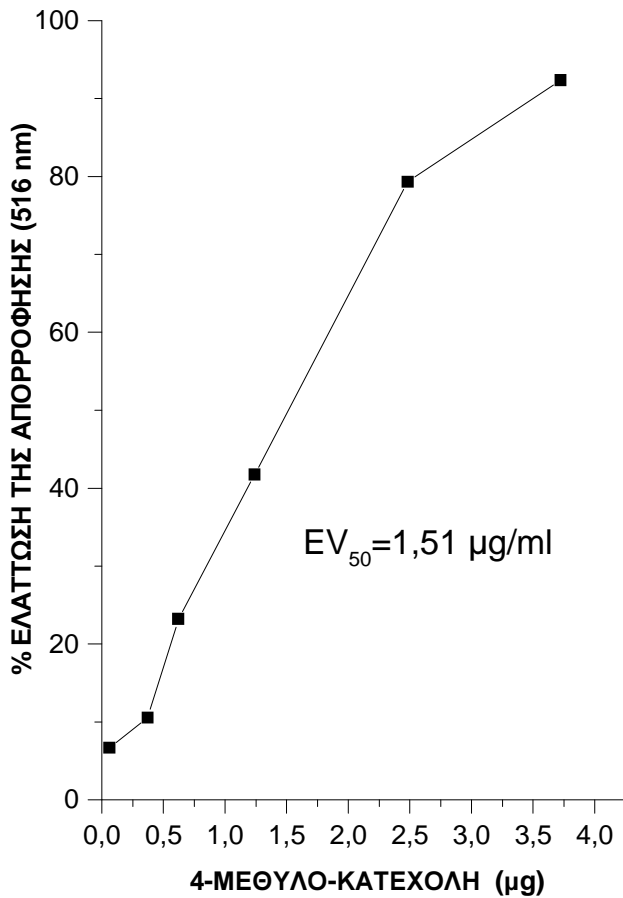
Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση ενός λιπόφιλου αντιοξειδωτικού (RH) με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της (Nenadis & Tsimidou 2002) .

Μέθοδος

- Παρασκευή μεθανολικού εκχυλίσματος της ελεύθερης ρίζας DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) σε συγκέντρωση 1mM.
- Σε κυψελίδα προστέθηκε 60 μL DPPH συγκέντρωσης 1mM και 940 μL μεθανόλη και μετά από ανάδευση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 516 nm.
- Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα της ουσίας που μελετήθηκε για την αντιοξειδωτική της δράση και μετρήθηκε η κινητική της αντίδρασης στα 516 nm για 20 min και υπολογίστηκε η % ελάττωση της απορρόφησης του DPPH στα 516 nm παρουσία του αντιοξειδωτικού.

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο προέκυψε η καμπύλη προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας της πρότυπης πολυφαινόλης 4-MC της εικόνας 17, σύμφωνα με την οποία η τιμή EC₅₀ της πολυφαινόλης αυτής βρέθηκε κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες 1,51 μg/ml.



Εικόνα 17. : Τιτλοδότηση του αντιδραστηρίου DPPH με το αντιοξειδωτικό 4-μεθυλοκατεχόλη. Η τιμή EV₅₀ αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί ελάττωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50%.

4.11. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΖΗΜΑ ΘΕΙΙΚΟΥ ΑΜΜΩΝΙΟΥ ΜΕ ΥΔΡΟΦΟΒΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ SDS

Κατά την διαδικασία της απομόνωσης των πρωτεϊνών από το παρθένο ελαιόλαδο μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και την φυγοκέντρηση στις 10000 rpm (3^η Μέθοδος) προέκυψε ίζημα το οποίο πιθανόν να περιείχε και υδρόφοβες πρωτεΐνες. Για τον λόγο αυτό έγινε προσπάθεια ανάκτησης των πρωτεϊνών αυτών με διαλυτοποίηση τους σε ορισμένους υδρόφοβους διαλύτες (μεθανόλη, ακετόνη) και σε διάλυμα του επιφανειοενεργού δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS).

4.11.1 A) Διαλυτοποίηση σε 60% μεθανόλη

- Σε ποσότητα ιζήματος μετά από κατεργασία με θειικό αμμώνιο (από 120ml αρχική ποσότητα ελαίου) προστέθηκαν 0,5 ml 60% μεθανόλη.
- Ακολούθησε ανάδευση.
- Μετά την ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 10 min και ανακτήθηκε το υπερκείμενο.
- Στο υπερκείμενο αυτό πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πρωτεϊνικών και πολυφαινολικών ενώσεων.

4.11.2 B) Διαλυτοποίηση με SDS

- Στο ίζημα που δεν διαλυτοποιήθηκε σε 60% μεθανόλη προστέθηκαν 0,5 ml 1mM SDS .
- Ακολούθησε ανάδευση.
- Μετά την ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 10 min και ανακτήθηκε το υπερκείμενο, στο οποίο προσδιορίστηκαν πρωτεΐνες και πολυφαινόλες.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για δεύτερη φορά στο ίζημα με τις εξής διαφορές:

- Προστέθηκαν 0,2 ml 1 mM SDS και στο δείγμα αυτό (χωρίς να γίνει φυγοκέντρηση) έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης και πολυφαινολών.

4.11.3 Γ) Διαλυτοποίηση σε παγωμένη ακετόνη

- Σε ποσότητα ιζήματος μετά από κατεργασία με θειικό αμμώνιο (από 120 ml αρχική ποσότητα ελαίου) προστέθηκε 1ml παγωμένης ακετόνης. Το μείγμα αναδεύτηκε και μετά φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm για 10 min.
- Ανακτήθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε ξανά στο ίζημα 1ml παγωμένης ακετόνης με ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min.
- Επίσης ανάκτηση υπερκείμενου και προσθήκη 1ml 80% παγωμένης ακετόνης με ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min.
- Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με
- 1ml 80% παγωμένης ακετόνης.
- 0,5 ml 60% μεθανόλης.
- 0,5 ml μεθανόλης.

- Για το ίζημα που δεν διαλυτοποιήθηκε από την παραπάνω διαδικασία προστέθηκαν 400 μl NaOH 1N ακολούθησε θέρμανση στους 90°C και φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 10 min.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .

5.1.1. Πρώτη εφαρμογή της μεθόδου

Στον πίνακα 2 δίνονται συγκεντρωτικά τα αποταλέσματα σε μg / ml εκχυλίσματος, των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών – πολυφαινολών-υδατανθρακων, πριν (ΠΔ) και μετά την διαπίδυση (ΜΔ) :

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών – πολυφαινολών – υδατανθράκων στα δείγματα της πρώτης μεθόδου απομόνωσης πρωτεϊνών ΠΔ και ΜΔ

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΕ μg/ml		ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΕ μg/ml		ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΣΕ μg/ml	
ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ
30,6	16,0	181,8	10	81,1	30,8

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 2, η συγκέντρωση πρωτεϊνών πολυφαινολών και σακχάρων ελαττώθηκε μετά την διαπίδυση.

5.1.2. Δευτερη εφαρμογή της μεθόδου

Στον πίνακα 3 δίνονται συγκεντρωτικά τα αποταλέσματα σε μg / ml εκχυλίσματος, των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών – πολυφαινολών-υδατανθρακων, πριν (ΠΔ) και μετά την διαπίδυση (ΜΔ) :

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών – πολυφαινολών – υδατανθράκων στα δείγματα της δεύτερης μεθόδου απομόνωσης πρωτεϊνών ΠΔ και ΜΔ

ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΣΕ μg/ml		ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΕ μg/ml		ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΣΕ μg/ml	
ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ
221,2	105,5	182,9	40,2	25,0	26,6

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 3, η συγκέντρωση πρωτεϊνών, πολυφαινολών και σακχάρων ελαττώθηκε μετά την διαπίδυση.

5.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ ΣΕ ΣΤΗΛΗ SEPHACRYL S-300

Με σκοπό να εξεταστεί η κατανομή των Μοριακών Βαρών των κλασμάτων πρωτεϊνών, πολυφαινολών και σακχάρων του εκχυλίσματος της 2^{ης} μεθόδου πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S-300.

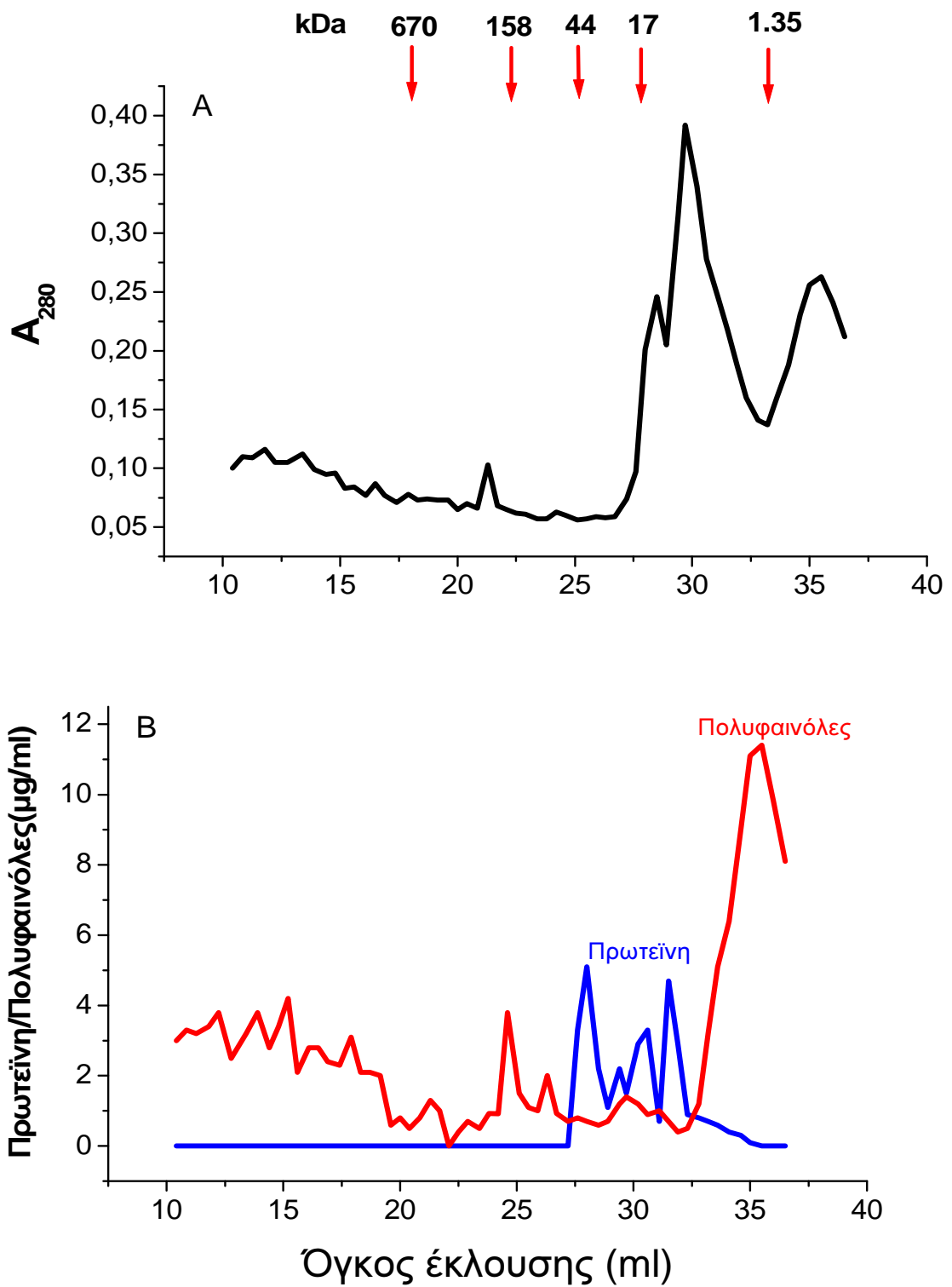
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Η φόρτωση της στήλης πραγματοποιήθηκε με 500(μl) δείγματος αρχικής συγκέντρωσης:

Πίνακας 4. Αρχική συγκέντρωση πρωτεϊνών – πολυφαινολών – υδατανθράκων στο δείγμα που χρωματογραφήθηκε στην στήλη Sephacryl S-300

ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	221,2 μg / ml εκχυλίσματος
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	182,8 μg / ml εκχυλίσματος
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	25 μg / ml εκχυλίσματος

- Ροή υγρού στη στήλη 0,54 ml/ min.
- Μαζεύτηκαν 60 κλάσματα



Εικόνα 18. Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης εκχυλίσματος παρθένου ελαιολάδου σε στήλη Sephacryl S-300. (A): Απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm και μέγιστο έκλουσης των μαρτύρων Μοριακού Βάρους. (B): Συγκέντρωση πρωτεΐνης και πολυφαινόλων στα κλάσματα. Η έκλουση έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 50 mM , pH 6.0, παρουσία 0.1 M NaCl.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 18. τα κύρια πρωτεϊνικά κλάσματα έχουν Μοριακά Βάρη μεταξύ 17000 και 2000. Στην περιοχή αυτή παρουσιάζεται μόνο ένα μικρό μέρος των πολυφαινολών πιθανόν ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο όμως ποσοστό των πολυφαινολών παρουσιάζεται σε μεγαλύτερα και μικρότερα Μοριακά Βάρη. Οι μεγάλοι Μοριακού Βάρους πολυφαινόλες πιθανόν αντιπροσωπεύουν πολυμερή πολυφαινολών, ενώ οι μικρού Μοριακού Βάρους πολυφαινόλες αντιπροσωπεύουν ελεύθερες πολυφαινόλες, ολιγομερή πολυφαινολών ή πολυφαινόλες συνδεδεμένες ομοιοπολικά σε μικρού Μοριακού Βάρους ολιγοπεπτίδια. Από τα αποτελέσματα της εικόνας 18 φαίνεται ότι τόσο οι μικρού όσο και οι πολύ μεγάλου ΜΒ πολυφαινόλες δεν δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα με το αντιδραστήριο Bradford, δεν δίνουν δηλαδή αντίδραση πρωτεΐνης (Whiffen et al, 2007; Kilkowsi & Gross, 1999).

Η συγκέντρωση των σακχάρων ήταν πολύ μικρή σε όλο το εύρος των κλασμάτων και δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια.

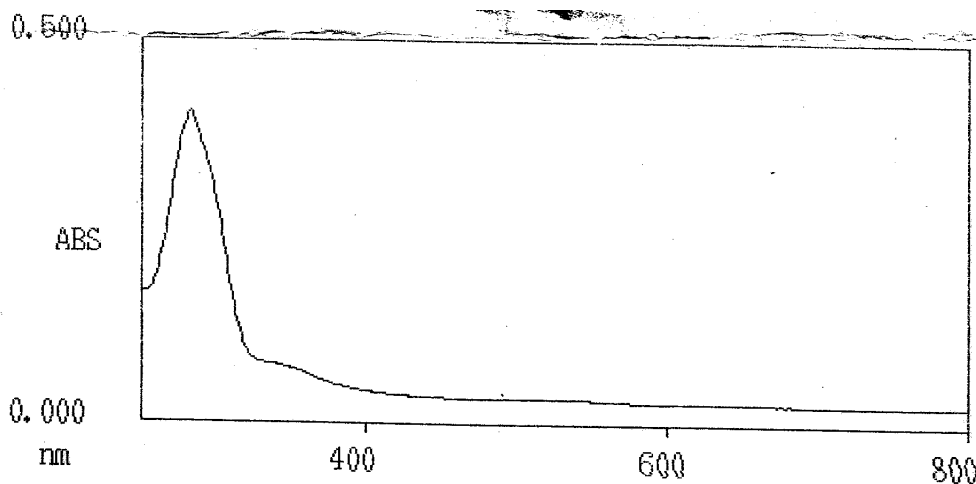
5.3. 3^η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .

Στον πίνακα 5 δίνονται συγκεντρωτικά τα αποταλέσματα σε $\mu\text{g} / \text{ml}$ εκχυλίσματος, των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών – πολυφαινολών-υδατανθρακων, πριν (ΠΔ) το στάδιο της διαπύδισης

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις πολυφαινολών-πρωτεϊνών-υδατανθράκων κατά την τρίτη μέθοδο απομόνωσης πρωτεϊνών .

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	189,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ εκχυλίσματος
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	138 $\mu\text{g} / \text{ml}$ εκχυλίσματος
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	43,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ εκχυλίσματος

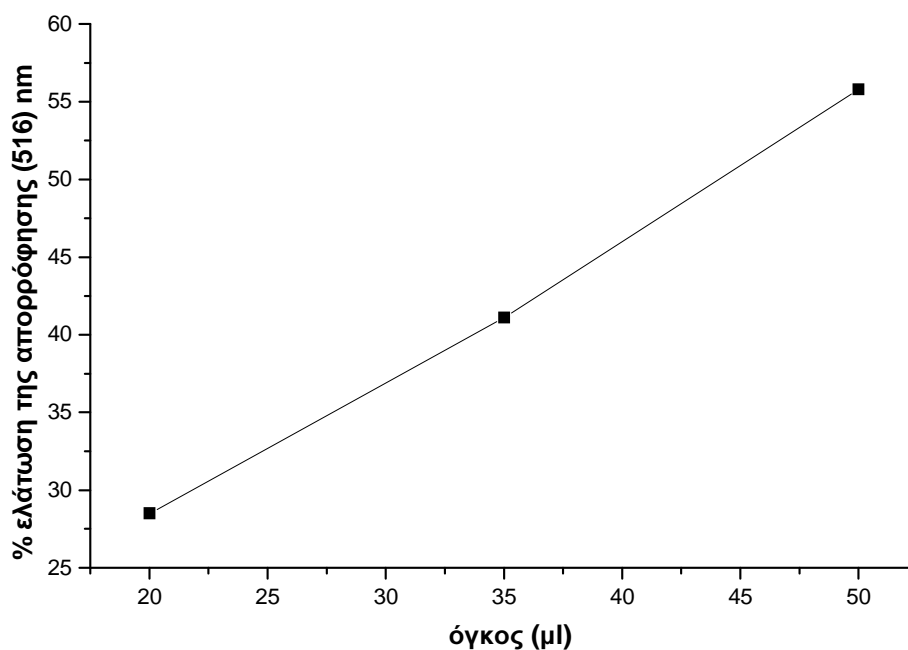
Με αραιώση 1/20 του παραπάνω δείγματος συλλέχθηκε το φάσμα απορρόφησης (εικόνα 19), το οποίο παρουσιάζει μέγιστο στα 280 nm και ώμο στα 340 nm, που πιθανόν να οφείλονται τόσο στην παρουσία πολυφαινολών όσο και πρωτεϊνών .



Εικόνα 19. Φάσμα απορρόφησης του δείγματος εκχυλίσματος της 3^{ης} μεθόδου (αραίωση 1:20). Οι απορροφήσεις στα 260, 280 και 340 nm είναι 0,193, 0,396 και 0,076 αντίστοιχα

5.3.1 Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του κλάσματος

Το κλάσμα πρωτεΐνης/πολυφαινολών που παρασκευάστηκε σύμφωνα με την τρίτη μέθοδο παρουσιάζει ικανότητα αναγωγής της ρίζας DPPH. Ο όγκος του κλάσματος αυτού που απαιτείται για ελάττωση της ρίζας DPPH κατά 50% βρέθηκε περίπου 44 μ l . Σύμφωνα με τον Πίνακα 5, στον τελικό όγκο της αντίδρασης υπήρχαν 8,3 μ g/ml πολυφαινολών και 6,1 μ g/ml πρωτεϊνών (εικόνα 20). Δεν προσδιορίστηκε η τιμή EC₅₀ για τις πολυφαινόλες ή τις πρωτεΐνες του δείγματος επειδή αυτές συνητήρχαν στο δείγμα. Έτσι, η αντιοξειδωτική ικανότητα του κλάσματος πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία στο δείγμα, τόσο των πολυφαινολών όσο και των πρωτεϊνών.



Εικόνα 20. Ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH σε συνάρτηση με τον όγκο του δείγματος της 3^{ης} απομόνωσης σε Tris-HCl για την εύρεση του όγκου δείγματος που προκαλεί ελάττωση του DPPH κατά 50% .

5.3.2 Μέθοδος απορρόφησης των πολυφαινολικών ουσιών με προσθήκη polyclar σε ποσοστό 5% .

Στην κατεργασία του κλάσματος της 3^{ης} μεθόδου με polyclar ελαττώθηκε σε μεγάλο βαθμό το πολυφαινολικό όσο και το πρωτεϊνικό φορτίο του δείγματος (8.9- και 26- φορές αντίστοιχα) (Πίνακας 6). Η πολύ μεγάλη ελάττωση των πρωτεϊνών πιθανόν να οφείλεται στην ομοιοπολική σύνδεση πολυφαινολών στα πρωτεϊνικά μόρια .

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών – πολυφαινολών στο κλάσμα της 3^{ης} μεθόδου απομόνωσης πρωτεϊνών μετά την κατεργασία με polyclar.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	21,2 μg / ml εκχυλίσματος
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	5,3 μg / ml εκχυλίσματος

5.3.3. Εκχύλιση των πρωτεϊνών από το ίζημα θειικού αμμωνίου με διαλύτες και SDS

A. Σε ποσότητα ιζήματος που προέκυψε από κατεργασία με θειικό αμμώνιο από αρχική ποσότητα ελαίου 120 ml έγινε η διαδικασία εκχύλισης με 60% μεθανόλη και SDS όπως αναφέρεται στις Μεθόδους, για να διαπιστωθεί εάν οι πολυφαινόλες και

πρωτεΐνες του ιζήματος μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε μεθανόλη και στα μικκύλια του SDS. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών πολυφαινολών και πρωτεΐνης παρουσιάζονται στον Πίνακα. 7.

Πίνακας 7. Εκχύλιση πρωτεϊνών /πολυφαινολών από το ίζημα θειικού αμμωνίου με μεθανόλη και SDS. Προσδιορισμός πολυφαινολών-πρωτεϊνών

60% ΜΕΘΑΝΟΛΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	1185µg/100 ml ελαιολάδου
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	1588 µg/100ml ελαιολάδου
SDS ΜΕ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	127 µg/100 ml ελαιολάδου
SDS ΧΩΡΙΣ ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΗΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	50 µg/100 ml ελαιολάδου

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 7 παρουσία 60% μεθανόλης εκχυλίστηκε μεγάλη ποσότητα πολυφαινολών και πρωτεϊνών πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που εκχυλίστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (περίπου 10-φορές και 18-φορές μεγαλύτερο ποσό πολυφαινολών και πρωτεϊνών αντίστοιχα) (βλ. Αποτελέσματα 3^η Μέθοδος, Πίνακα 12). Αντίθετα, η ποσότητα των πολυφαινολών που εκχυλίστηκε από το ίζημα είναι περίπου 6-φορές μικρότερη από αυτήν που εκχυλίστηκε απ'ευθείας από το ελαιόλαδο με μεθανόλη, ενώ , η ποσότητα των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκε από το ίζημα είναι περίπου 1,5-φορά μικρότερη από αυτήν που εκχυλίστηκε απ'ευθείας από το ελαιόλαδο με μεθανόλη (βλ. Αποτελέσματα Πίνακα 12). Σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών εκχυλίστηκε επίσης και παρουσία SDS (Πίνακας 7) (παρόμοια με αυτήν που εκχυλίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα (βλ. Αποτελέσματα Πίνακα 12,3^η Μέθοδος).

B. Σε ποσότητα ιζήματος που προέκυψε από κατεργασία με θειικό αμμώνιο από αρχική ποσότητα ελαίου 120 ml έγινε η διαδικασία εκχύλισης με 60% μεθανόλη, 100% μεθανόλη και 1N NaOH, μετά την εκχύλιση του ιζήματος με ακετόνη, όπως

αναφέρεται στις Μεθόδους. Αυτό έγινε για να διαπιστωθεί εάν μέρος πολυφαινολών και πρωτεϊνών του ιζήματος είναι διαλυτά στον υδρόφοβο αυτό διαλύτη και στο NaOH. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών πολυφαινολών και πρωτεΐνης παρουσιάζονται στον Πίνακα.8.

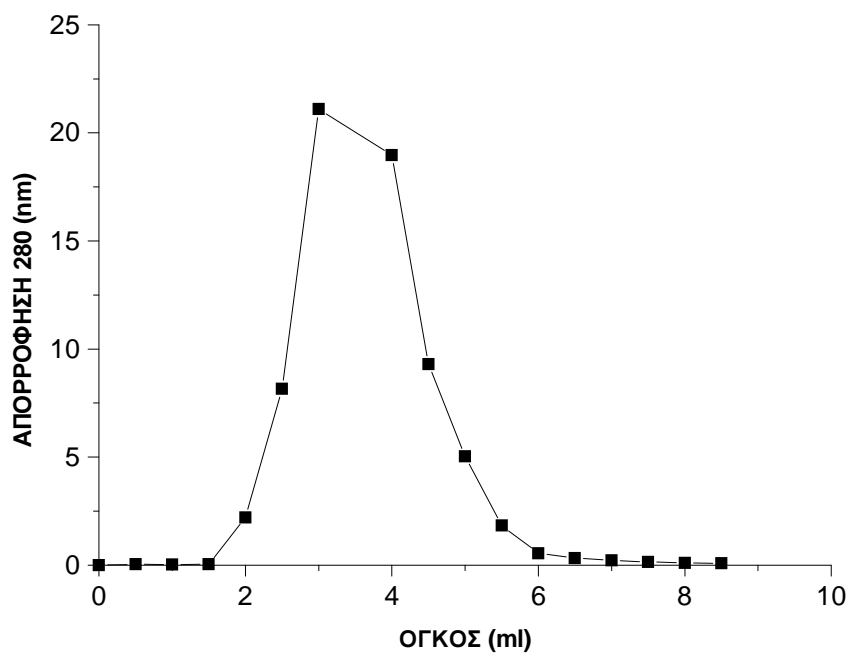
Πίνακας 8. Εκχύλιση πρωτεϊνών /πολυφαινολών από το ίζημα θεικού αμμωνίου με μεθανόλη και NaOH μετά την εκχύλιση του ιζήματος με ακετόνη.

	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ (μg/ 100ml ελαιολάδου)
60% ΜΕΘΑΝΟΛΗ	25
100% ΜΕΘΑΝΟΛΗ	14,4
1N ΝΑΟΗ	14,8
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ (μg/ 100 ml ελαιολάδου)
60% ΜΕΘΑΝΟΛΗ	6,7
100% ΜΕΘΑΝΟΛΗ	1,4
1N ΝΑΟΗ	17,5

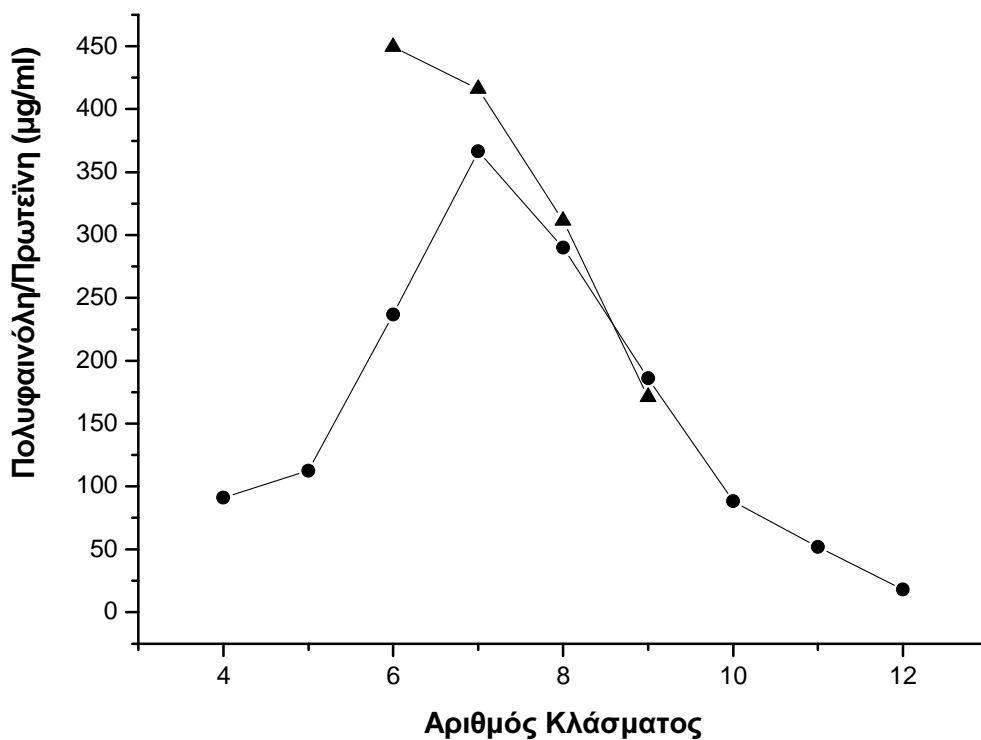
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 8 με αυτά του Πίνακα 7 συμπεραίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών και πρωτεϊνών στο ίζημα του θεικού αμμωνίου είναι αρκετά υδρόφοβο ώστε να απομακρύνεται σε μεγάλο βαθμό μετά από εκχύλιση με ακετόνη.

5.3.4. Χρωματογραφία στήλης Sephadex G-25 δείγματος μεθανολικού εκχυλίσματος ιζήματος θεικού αμμωνίου

Με σκοπό να διαχωριστούν τα πρωτεϊνικά και πολυφαινολικά συστατικά του δείγματος ιζήματος που διαλυτοποιήθηκε σε 60% μεθανόλη, το δείγμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη Sephadex G-25 που ισορροπήθηκε με 60% μεθανόλη και στα κλάσματα που συλλέχθηκαν προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 280 nm (εικόνα 21), καθώς και οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και πολυφαινολών (εικόνα 22) .



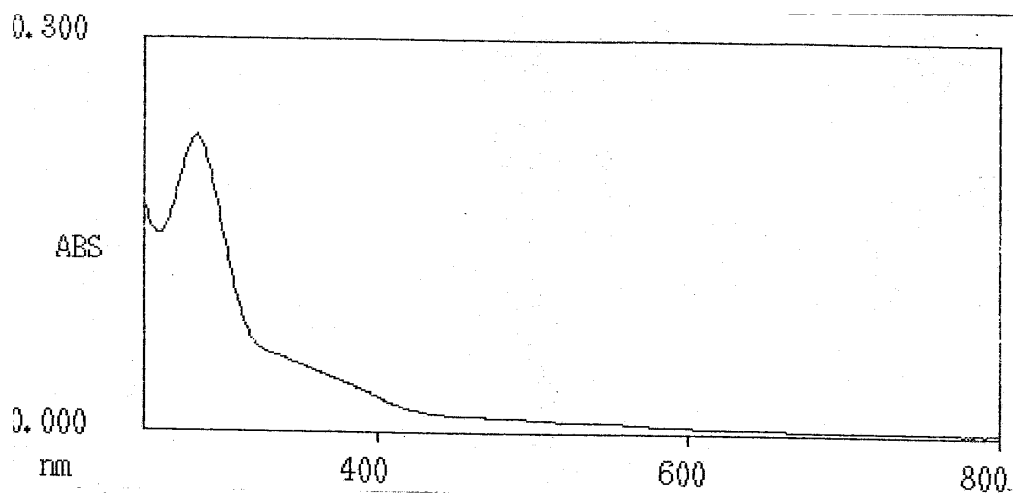
Εικόνα 21. Απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm μετά την διόδο από την στήλη Sephadex G-25 δείγματος 0.3 ml μεθανολικού εκχυλίσματος ιζήματος θεικού αμμωνίου. Έκλουση με 60% μεθανόλη



Εικόνα 22. Προσδιορισμός πρωτεϊνών (▲) και πολυφαινολών (●) στα κλάσματα χρωματογραφίας της εικόνας 21. Έγινε έκλουση με 60% μεθανόλη. Κάθε κλάσμα έχει όγκο 0.5 ml

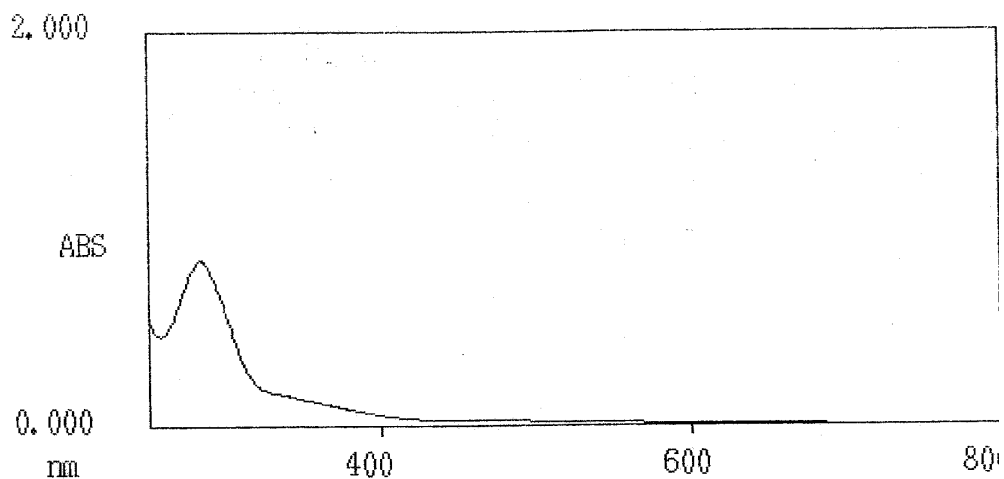
Εξετάστηκαν περαιτέρω τα φάσματα απορρόφησης ορισμένων κλασμάτων της χρωματογραφίας της εικόνας 21 που εμφανίζουν υψηλές απορροφήσεις στα 280 nm.

ΚΛΑΣΜΑ 4



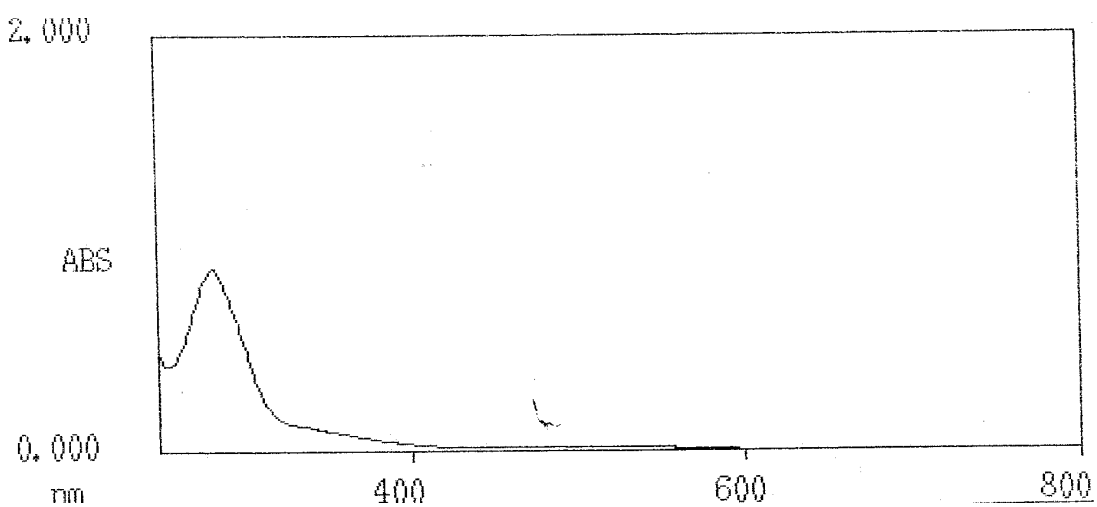
Εικόνα 23. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 4 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 5



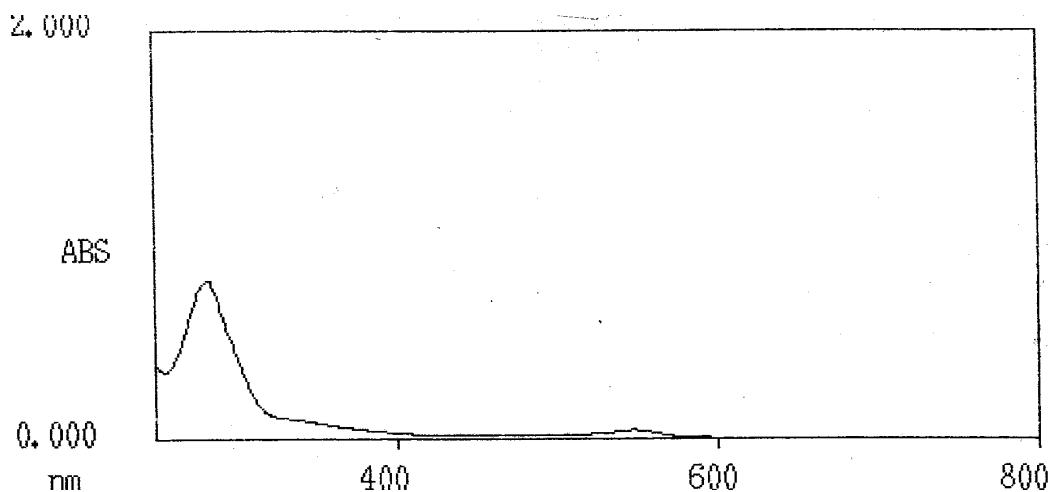
Εικόνα 24. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 5 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 6



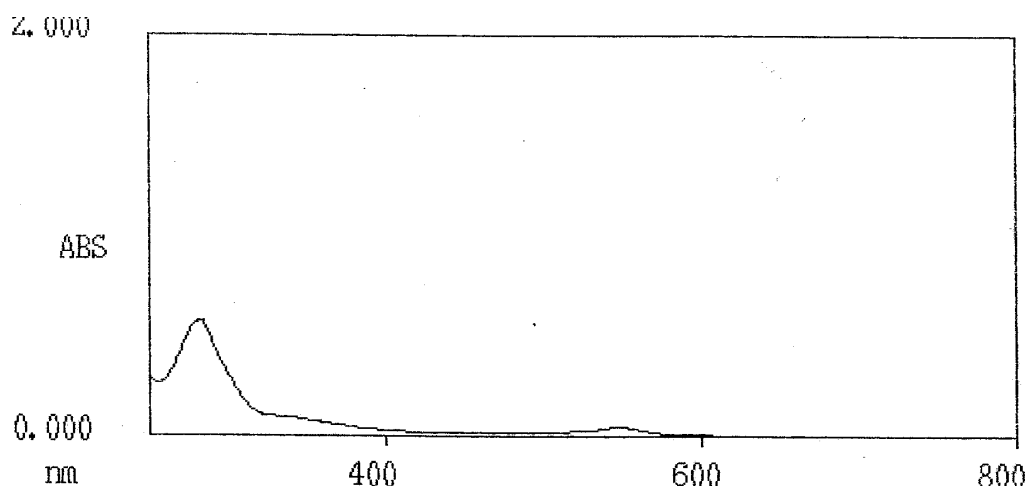
Εικόνα 25. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 6 (αραίωση 1:25) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη. .

ΚΛΑΣΜΑ 8



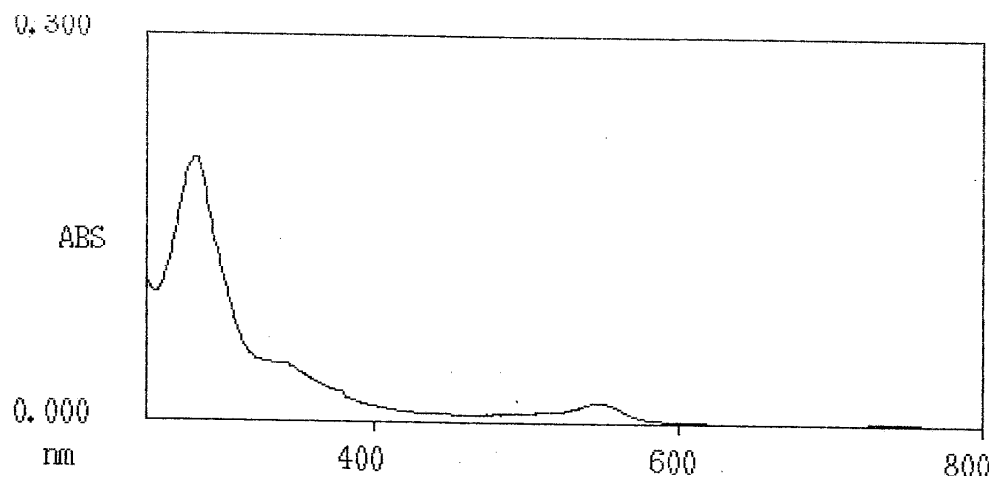
Εικόνα 26. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 8 (αραίωση 1:25) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 9



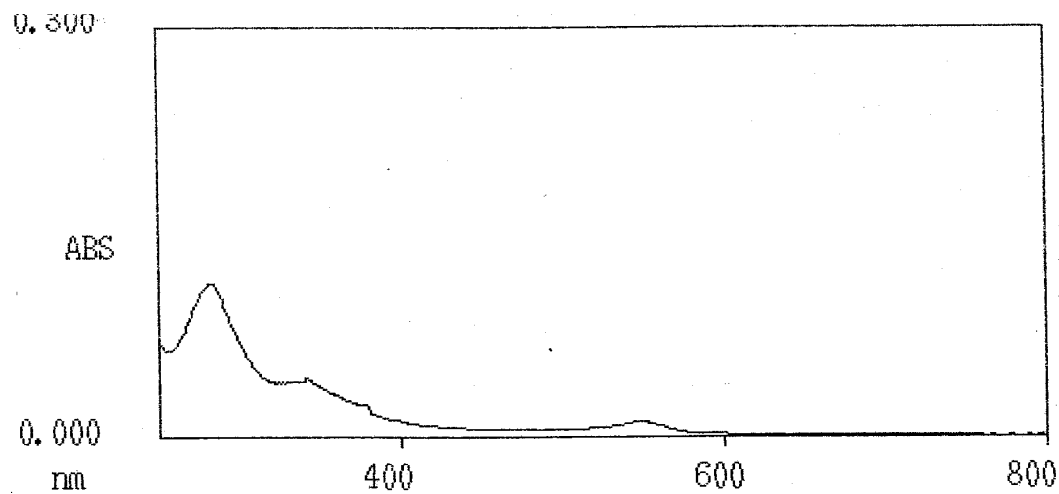
Εικόνα 27. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 9 (αραίωση 1:16.6) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη. .

ΚΛΑΣΜΑ 10



Εικόνα 28. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 10 (αραίωση 1:25) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 11



Εικόνα 29. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 11 (αραίωση 1:16.6) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 ιζήματος της 3^{ης} μεθόδου διαλυτοποιημένου σε 60% μεθανόλη.

Παρακάτω, στους Πίνακες 9 και 10 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των κλασμάτων

Πίνακας 9. Απορρόφηση των κλασμάτων του Σχήματος 22 στα 260, 280, 340 και 546 nm

A/A ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 260 (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 280 (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 340 (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 546 nm
4	1,51	2,20	0,57	0
5	7,77	8,16	1,77	0
6	10,57	21,1	3,15	0
8	8,80	18,97	2,67	1,1
9	4,65	9,29	1,62	0,96
10	2,62	5,02	1,10	0,41
11	1,08	1,82	0,66	0,184

Πίνακας 10. Λόγοι απορροφήσεων 280/260 και 340/280 του πίνακα 9

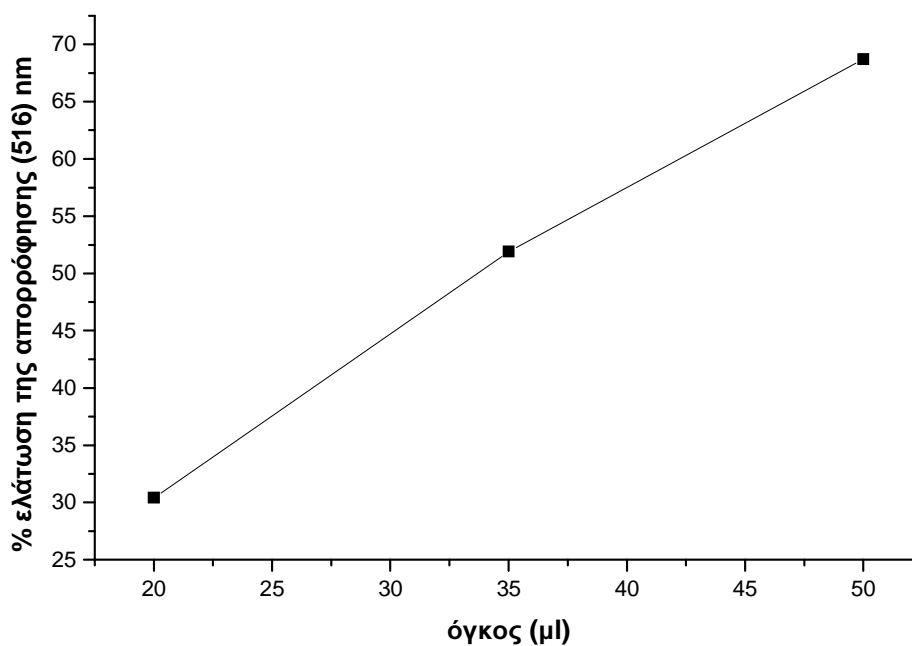
A/A ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	280/260	340/280
4	1,46	0,26
5	1,05	0,22
6	2,0	0,15
8	2,2	0,14
9	2,0	0,17
10	1,91	0,22
11	1,69	0,36

Από τα παραπάνω χρωματογραφικά αποτελέσματα (Πίνακες 9 και 10) παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες εκκλύονται σε μικρότερο όγκο (μέγιστο συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο κλάσμα 6 απ'ότι οι πολυφαινόλες (μέγιστο συγκέντρωσης πολυφαινολών στο κλάσμα 7. Η ισχυρή επικάλυψη όμως των πολυφαινολικών κλασμάτων με αυτά των πρωτεϊνών οφείλεται πιθανόν στην μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών και πολυφαινολών. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν επιτρέπει τον πλήρη διαχωρισμό πρωτεϊνών και απλών πολυφαινολών (όπως έγινε κατά την χρωματογραφία με την στήλη Sephacryl S-300) λόγω του μικρού μεγέθους της στήλης. Είναι επίσης δυνατόν οι ελεύθερες πολυφαινόλες να έχουν πολυμερισθεί λόγω οξείδωσης και έτσι να παρουσιάζουν μεγάλο Μοριακό Βάρος. Στην περίπτωση αυτή βεβαίως πρόκειται για πολυμερή πολυφαινολών (τα οποία μπορεί να περιέχουν συνδεδεμένη πρωτεΐνη), τα οποία είναι πολύ υδρόφοβα αφού εκχυλίζονται με διάλυμα μεθανόλης από το ίζημα του θεικού αμμωνίου. Παράλληλα, όλα τα κλάσματα εμφανίζουν κύριο μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm και ώμο στα 340 nm, ενώ τα μικρού Μοριακού Βάρους κλάσματα (8-11) παρουσιάζουν και μεγάλη απορρόφηση σε ένα μέγιστο περίπου 546

nm, που πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία οξειδομένων πολυφαινολών (Tzika et al.,2008) ή συμπλόκων πολυφαινολών με ολιγοπεπτίδια του ελαιολάδου. Η τιμή απορρόφησης για τα 546 nm είναι μέγιστη περίπου στο κλάσμα 8, ενώ στα επόμενα κλάσματα ελαττώνεται σημαντικά. Παρατηρείται επίσης ότι ο λόγος των απορροφήσεων 280/260 παρουσιάζει μέγιστο στο κλάσμα 8, και στη συνέχεια ελαττώνεται στα επόμενα κλάσματα. Αντίθετα ο λόγος 340/260 ελαττώνεται αρχικά με την ελάττωση του Μοριακού Βάρους των κλασμάτων με ελάχιστο στο κλάσμα 8 και στη συνέχεια αυξάνεται στα επόμενα κλάσματα (Πίνακες 9,10). Οι φασματοσκοπικές αυτές διαφορές των κλασμάτων πιθανόν να οφείλονται στην παρουσία διαφορετικών συμπλόκων πρωτεϊνών-πολυφαινολών, ή/και στην οξείδωση των πολυφαινολικών συστατικών .

5.3.5 Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του κλάσματος 9

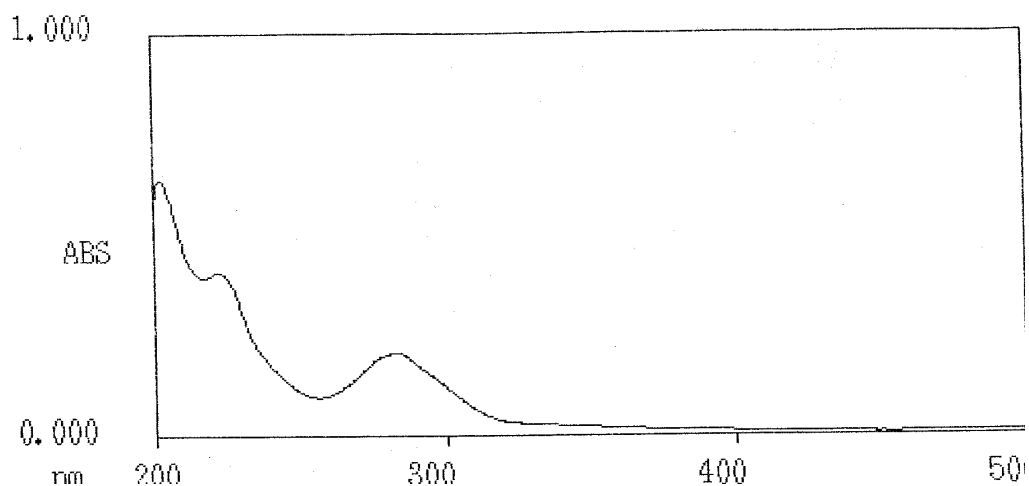
Εξετάζοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός κλάσματος (9) από την χρωματογραφία της εικόνας 21, το οποίο παρουσιάζει απορρόφηση και σε μεγάλα μήκη κύματος βρέθηκε ότι το κλάσμα 9 παρουσιάζει ισχυρή αναγωγική δράση έναντι του DPPH, με μία τιμή όγκου δείγματος που προκαλεί ελάττωση της ρίζας κατά 50% περίπου 34μl. Στον τελικό όγκο αντίδρασης υπήρχαν λοιπόν 5,8 μg/ ml πρωτεΐνης και 6,3 μg /ml πολυφαινολών, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις τιμές της εικόνας 22 .



Εικόνα 30. Ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH σε συνάρτηση με τον όγκο του κλάσματος 9 του Σχήματος 22.

5.3.6 Υπερδιήθηση του κλάσματος 7

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η υπερδιήθηση του κλάσματος 7 μεταβάλλει τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά. Για την μέθοδο της υπερδιήθησης χρησιμοποιήθηκαν 350 μl από το κλάσμα 7. Όπως φαίνεται στην εικόνα 31, το κατακράτημα του κλάσματος 7 μετά την υπερδιήθηση εξακολουθεί να παρουσιάζει την υψηλή απορρόφηση στα 340 nm, ενώ οι λόγοι 280/260 (2.01) και 340/280 (0.16) είναι παρόμοιοι με αυτούς των κλασμάτων 6 και 8 πριν από υπερδιήθηση (Πίνακας 10). Το κλάσμα που κατακρατείται μετά την υπερδιήθηση (άρα με $MB \geq 10.000$) αποτελεί ένα μικρό μόνο ποσοστό (περίπου 1%) του αρχικού κλάσματος.



Εικόνα 31. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 7 του Σχήματος 23, που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25, μετά την διαδικασία υπερδιήθησης. Οι τιμές απορρόφησης στα 260, 280 και 340 nm, είναι 0.098, 0.197 και 0.032 αντίστοιχα

5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ-ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Στον πίνακα 11 δίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των τριών εφαρμογών της μεθόδου προσδιορισμού πολυφαινόλων Folin-Ciocalteu σε $\mu\text{g} / \text{ml}$ εκχυλίσματος,

Πίνακας 11. Αποτελέσματα για τις τρεις εφαρμογές της μεθόδου προσδιορισμού πρωτεϊνών – πολυφαινόλων στο μεθανολικό εκχύλισμα παρθένου ελαιολάδου .

	Πρώτο εκχύλισμα	Δεύτερο εκχύλισμα	Τρίτο εκχύλισμα
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	811,5	686,9	676,7
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	185,1	281,2	229,3

Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 11 παράλληλα με τις πολυφαινόλες, προσδιορίστηκαν στα εκχυλίσματα και σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών.

5.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ/ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Με σκοπό να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα των μεθόδων εκχύλισης/απομόνωσης πρωτεϊνών και πολυφαινολών από το παρθένο ελαιόλαδο που παρουσιάστηκαν παραπάνω (1^η, 2^η και 3^η μέθοδος εκχύλισης με ρυθμιστικό διάλυμα και μέθοδος εκχύλισης με μεθανόλη), πριν και μετά από διαπίδυση, παρουσιάζονται στον Πίνακα 12 τα συνολικά αποτελέσματα εκφρασμένα σε µg πρωτεΐνης, πολυφαινόλης και σακχάρου/100 ml ελαιολάδου.

Πίνακας 12. Σύγκριση εκχύλισης πρωτεϊνών, πολυφαινολών και σακχάρων από το παρθένο ελαιόλαδο με τη βοήθεια των διαφορετικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν στο τμήμα «Υλικά και Μέθοδο», πριν (ΠΔ) και μετά (ΜΔ) την διαπίδυση του τελικού παρασκευάσματος. Οι τιμές εκφράζονται σε µg/100 ml ελαιολάδου. Οι τιμές του εκχυλίσματος με μεθανόλη αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή για 3 μετρήσεις±σταθερή απόκλιση (Standard Deviation)

	<u>Πολυφαινόλες</u>		<u>Πρωτεΐνη</u>		<u>Σάκχαρα</u>	
	ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ	ΠΔ	ΜΔ
1 ^η Μέθοδος	155,9	8,6	26,2	13,7	69,5	26,4
2 ^η Μέθοδος	109,7	24,1	132,7	63,3	15	15,9
3 ^η Μέθοδος	118,2		86,3		27,4	
Εκχύλιση Με Folin- Ciocalteu	7029±370		2268±556			

Ένα περίεργο αποτέλεσμα του Πίνακα 12 είναι η πολύ υψηλή περιεκτικότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων του ελαιολάδου σε πρωτεΐνες, περίπου 13-65-φορές υψηλότερη από αυτήν που υπολογίζεται στα κλάσματα που προέχονται από εκχύλιση του ελαιολάδου με υδατικά διαλύματα και καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Αυτό μάλλον οφείλεται στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων μεγαλομοριακών πολυφαινολών (ταννινών), ελεύθερων ή συνδεδεμένων με πρωτεΐνες, στο μεθανολικό εκχύλισμα, οι οποίες δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα με το αντιδραστήριο Bradford (Whiffen et al, 2007; Kilkowsi & Gross, 1999).

Όπως παρατηρείται επίσης από τον Πίνακα 12, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μικρότερη στο κλάσμα της πρώτης μεθόδου σε σχέση με αυτήν που προσδιορίστηκε στο κλάσμα της δεύτερης μεθόδου. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο ότι κατά την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, οι πρωτεΐνες

που εκχυλίστηκαν μπορεί να πολυμερίστηκαν παρουσία πολυφαινολών και να καθίστανται αδιάλυτες. Παράλληλα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 ενώ η συγκέντρωση πρωτεϊνών και πολυφαινολών ελαττώθηκε μετά την διαπίδυση και στις δύο μεθόδους (πρώτη και δεύτερη), η συγκέντρωση των σακχάρων δεν ελαττώθηκε στο κλάσμα της δεύτερης μεθόδου. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανόν ότι κατά την μικρότερη διάρκεια της εκχύλισης λαμβάνεται μεγαλύτερο ποσοστό υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών και μεγάλου Μοριακού Βάρους σάκχαρα τα οποία και δεν μπορούν να διαπεράσουν την μεμβράνη διαπίδυσης. Το μεγάλο Μοριακό Βάρος των σακχάρων αυτών, είτε οφείλεται σε ελεύθερους πολυσακχαρίτες, είτε σε σάκχαρα συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες ή πολυμερή πολυφαινολών (ελεύθερα ή συνδεδεμένα με πρωτεΐνες).

5.6. Κατεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου με polyclar

Από το πρώτο εκχύλισμα του ελαιολάδου με μεθανόλη και μετά την κατεργασία με polyclar υπολογίστηκαν οι παρακάτω τιμές συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και πολυφαινολών (Πίνακας 13). Η σύγκριση των τιμών του Πίνακα 13 με αυτές του Πίνακα 11 δείχνει ότι η κατεργασία με polyclar ελαττώνει την συγκέντρωση πολυφαινολών και πρωτεΐνης κατά περίπου 2- και 8,3-φορές αντίστοιχα. Η πολύ μεγάλη ελάττωση των πρωτεϊνών πιθανόν να οφείλεται στην ομοιοπολική σύνδεση πολυφαινολών στα πρωτεϊνικά μόρια ή και στην παρουσία μεγάλου MB πολυμερών πολυφαινολών τα οποία μπορεί να συνδέονται ισχυρά με το polyclar.

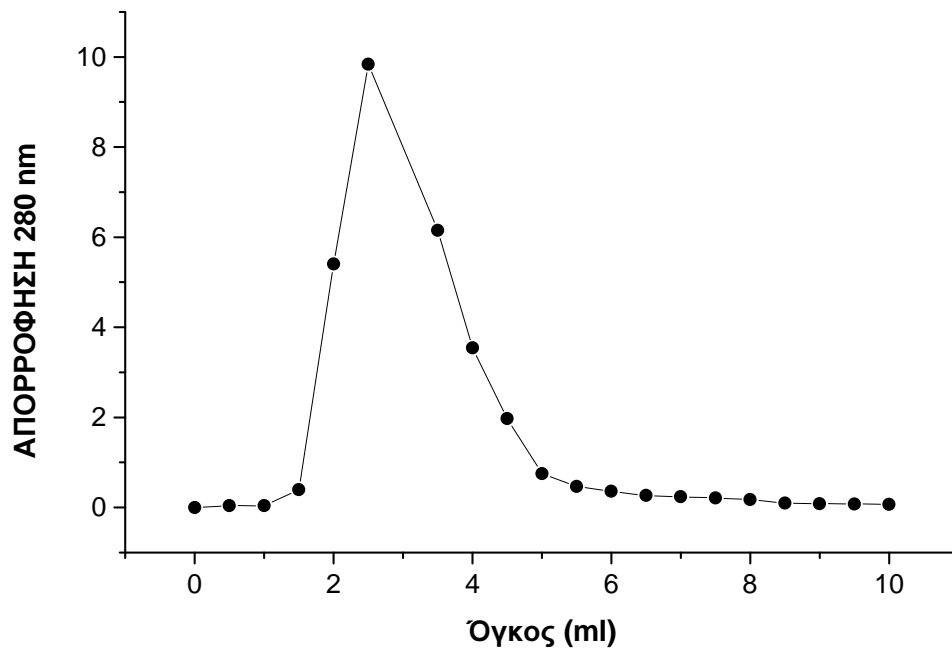
Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και πολυφαινολών του πρώτου μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου μετά την κατεργασία με polyclar

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ	394,9 µg / ml εκχυλίσματος
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	22,4 µg / ml εκχυλίσματος

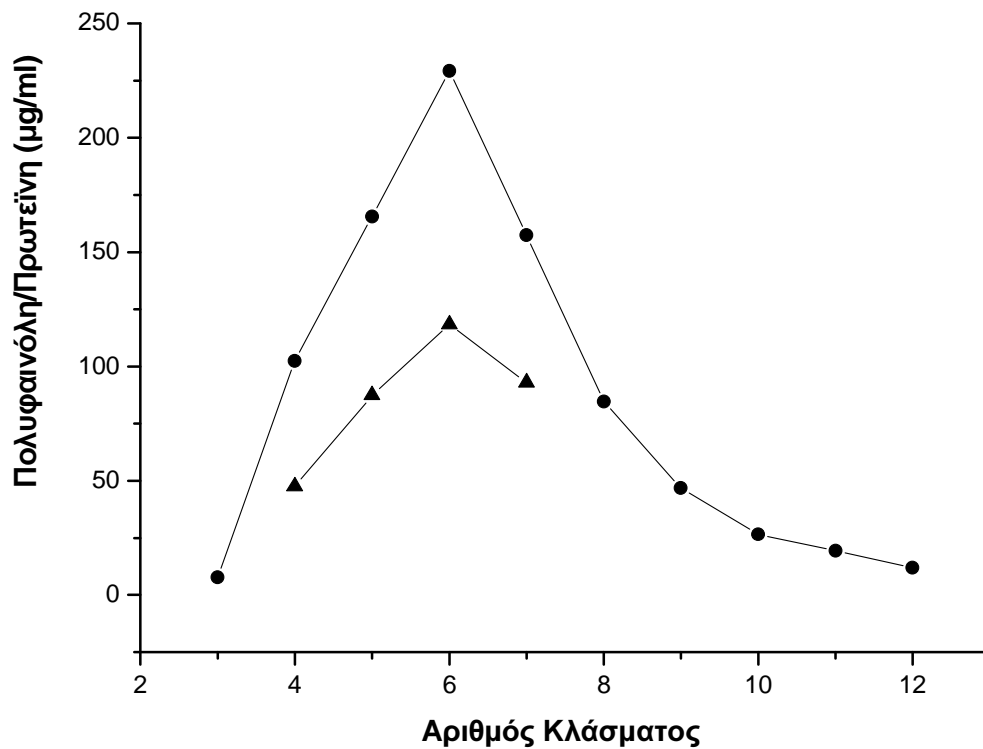
5.7 Χρωματογραφία στήλης Sephadex G-25 δείγματος μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου

Με σκοπό να διαπιστωθεί ο διαχωρισμός πολυφαινολών και πρωτεϊνών του δείγματος μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη, εξετάστηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά του δείγματος του δευτέρου εκχυλίσματος σε στήλη Sephadex G-25

Συλλέχτηκαν κλάσματα και καταγράφηκε η απορρόφηση τους στα 280 nm σύμφωνα με την γραφική παράσταση της εικόνας 32, καθώς και η συγκέντρωσή τους σε πρωτεΐνη και πολυφαινόλες (εικόνα.33).



Εικόνα 32. Απορρόφηση των κλασμάτων στα 280 nm, μετά από χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25, που ισορροπήθηκε σε μεθανόλη, δείγματος (0.5 ml) μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη. Έγινε έκλυση με μεθανόλη



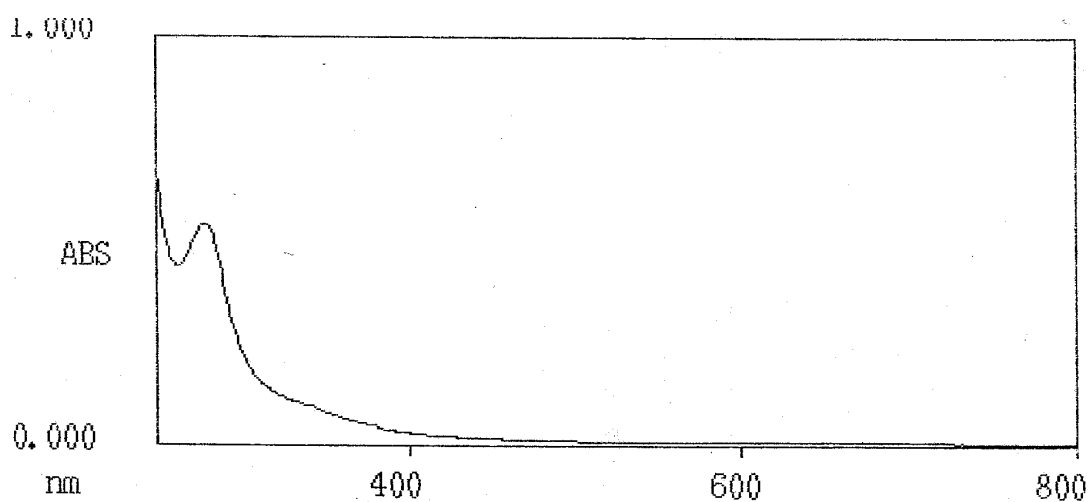
Εικόνα 33. : Προσδιορισμός πρωτεϊνών (▲) και πολυφαινόλων (●) στα κλάσματα χρωματογραφίας της εικόνας 32. Κάθε κλάσμα έχει όγκο 0.5 ml

Μετά από μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης και πολυφαινόλων στα κλάσματα της εικόνας 33 προκύπτει ότι το μέγιστο πρωτεΐνης και πολυφαινόλων συμπίπτει (κλάσμα 6) γεγονός που μάλλον οφείλεται στην παρουσία πολυμερών πολυφαινόλων τα οποία παρουσιάζουν θετική αντίδραση Bradford (είτε περιέχουν συνδεδεμένη πρωτεΐνη είτε όχι) (Whiffen et al.2007; Kilkowski & Gross, 1999).

5.7.1 Λήψη φασμάτων στα κλάσματα που εμφανίζουν υψηλή απορρόφηση.

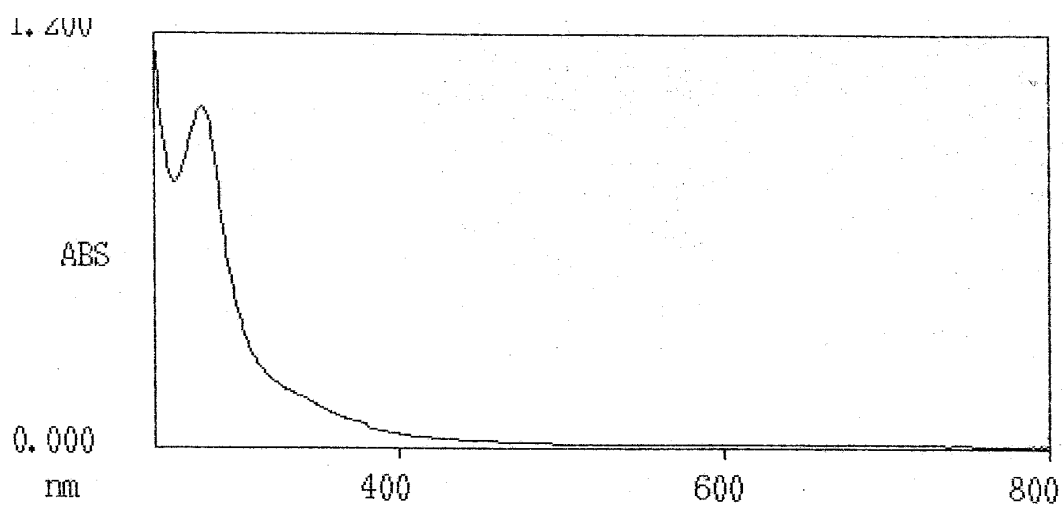
Με σκοπό να καταγραφούν τα κύρια χαρακτηριστικά των φασμάτων απορρόφησης των κλασμάτων της εικόνας 32 με τις μεγαλύτερες απορροφήσεις στο υπεριώδες, καταγράφηκαν τα φάσματα των κλασμάτων 4-9 (παρουσιάζονται τα φάσματα των κλασμάτων 4,5 και 7-9).

ΚΛΑΣΜΑ 4



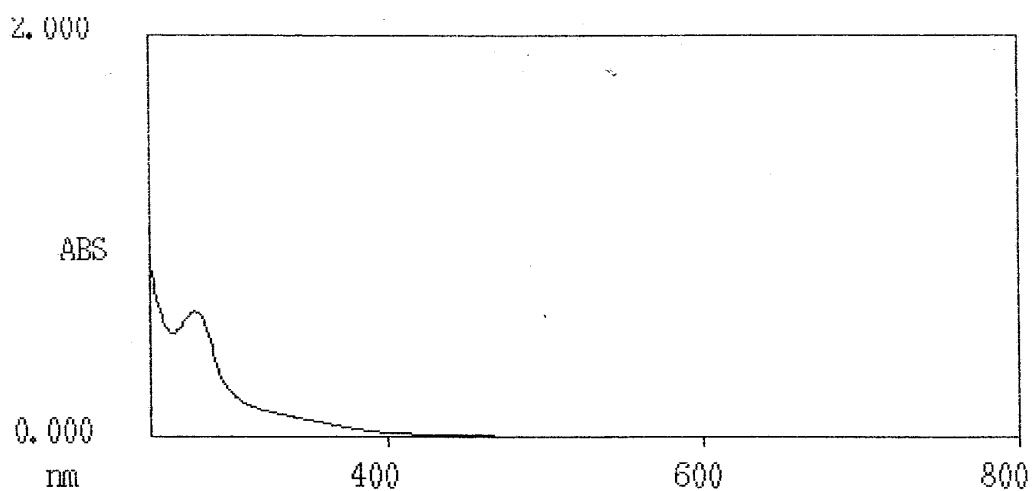
Εικόνα 34. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 4 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 5



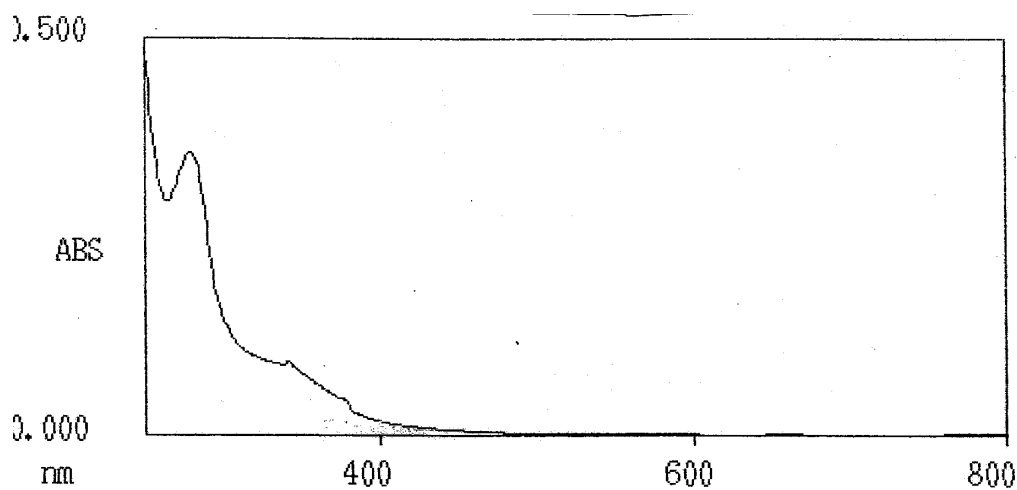
Εικόνα 35. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 5 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 7



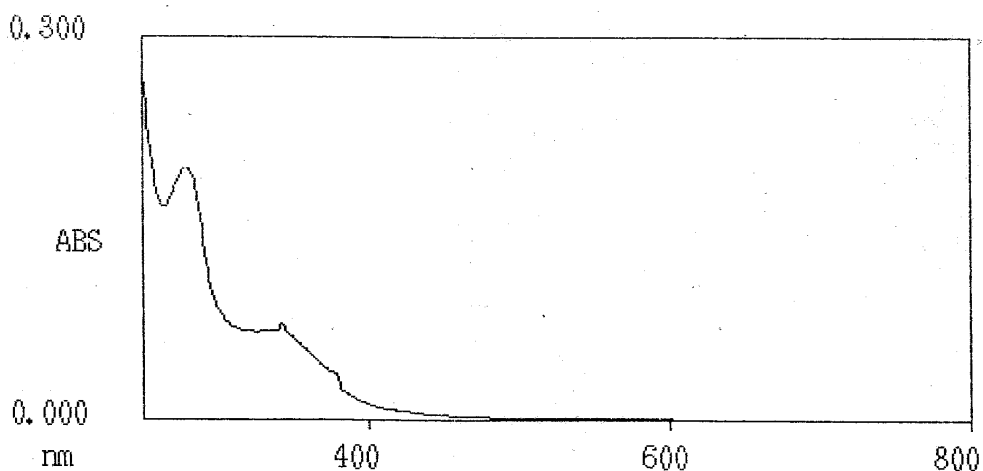
Εικόνα 36. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 7(αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 8



Εικόνα 37. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 8 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη.

ΚΛΑΣΜΑ 9



Εικόνα 38. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 9 (αραίωση 1:10) που προήλθε μετά από την χρωματογραφία σε στήλη Sephadex G-25 μετά την διαδικασία εκχύλισης ελαιολάδου με μεθανόλη.

Όλα τα κλάσματα παρουσίασαν μέγιστο στα 280 (η 260) nm. Τα μικρότερου Μοριακού Βάρους κλάσματα παρουσίασαν επίσης αυξανόμενη απορρόφηση στα 340 nm. Έτσι ενώ ο λόγος των απορροφήσεων 280/260 παρέμεινε ουσιαστικά σταθερός, ο λόγος 340/260 αυξήθηκε με την ελάττωση του Μοριακού Βάρους των κλασμάτων, γεγονός που αποδεικνύει ότι το μεθανολικό κλάσμα που χρωματογραφήθηκε είναι πραγματικά ετερογενές μείγμα διαφορετικών μοριακών ειδών

πολυφαινολών/πρωτεϊνών. Δεν παρουσιάστηκε κορυφή στα μεγάλα μήκη κύματος που παρατηρήθηκε σε κλάσματα της εικόνας 32 (Πίνακες 14, 15). Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε μεγαλύτερο βαθμό αυτοξειδωσης των κλασμάτων χρωματογραφίας του μεθανολικού εκχυλίσματος του ιζήματος θειικού αμμωνίου, λόγω του μεγαλύτερου χρόνου εκχύλισης του ελαιολάδου στη διαδικασία αυτή, καθώς και του μέσου εκχύλισης και κατεργασίας (ρυθμιστικό διάλυμα, θειικό αμμώνιο).

Πίνακας 14. Απορρόφηση κλασμάτων του Σχήματος 32 σε 260, 280 και 340 nm.

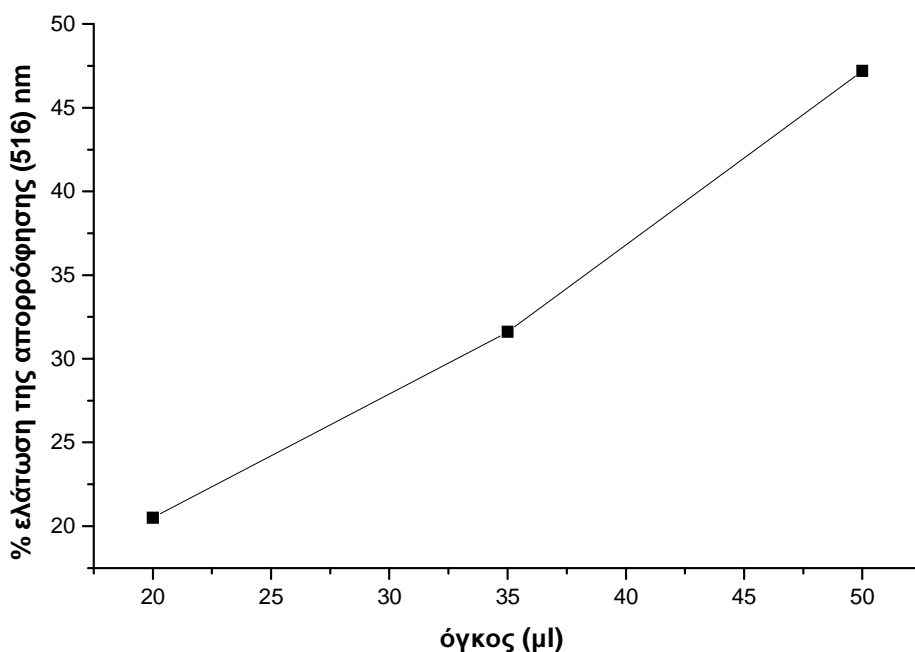
A/A ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 260 (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 280 (nm)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 340 (nm)
4	4,46	5,40	1,07
5	7,86	9,84	1,53
7	5,39	6,15	1,09
8	3,09	3,54	0,93
9	1,75	1,97	0,71

Πίνακας 15. Λόγοι απορροφήσεων 280/260 και 340/280 κλασμάτων του Πίνακα 14

A/A ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	280/260	340/260
4	1,21	0,2
5	1,25	0,16
7	1,14	0,18
8	1,15	0,26
9	1,13	0,36

5.7.2 Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του κλάσματος 7

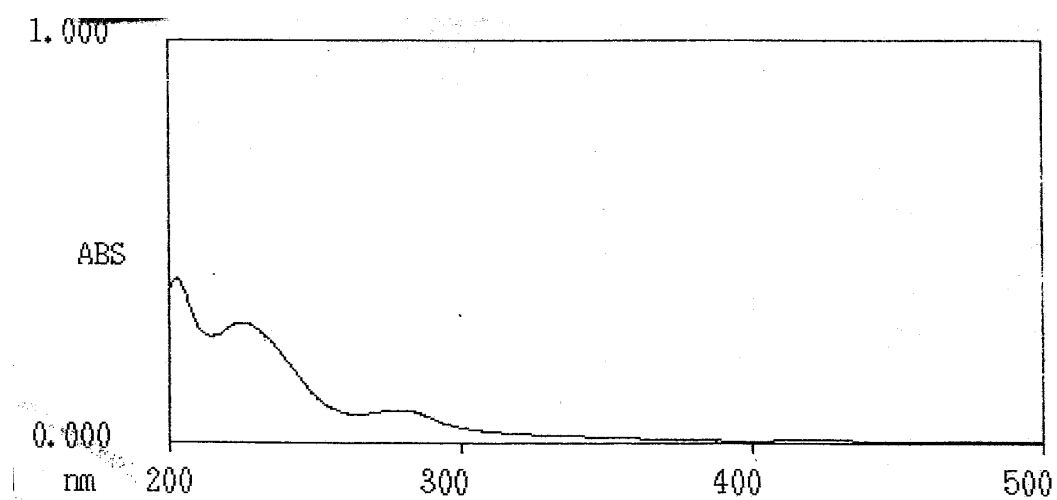
Με σκοπό να εξεταστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων της χρωματογραφίας της εικόνας 36 εξετάστηκε η ικανότητα του κλάσματος 7 να ανάγει την ρίζα DPPH. Όπως φαίνεται στην εικόνα 39, ο όγκος του κλάσματος 7 που απαιτείται για μείωση της ρίζας κατά 50% είναι περίπου 53 μl. Από τις τιμές της εικόνας 33 υπολογίζεται ότι στο τελικό μείγμα της αντίδρασης του κλάσματος 7 που προκαλεί μείωση 50%, περιέχονται 8,3 μg/ml πολυφαινολών και 4,9 μg/ml πρωτεϊνών.



Εικόνα 39. Ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH σε συνάρτηση με τον όγκο του δείγματος από το κλάσμα 7 που προήλθε από την εκχύλιση των πολυφαινολών του παρθένου ελαιόλαδου με μεθανόλη.

5.7.3. Υπερδιήθηση του κλάσματος 6

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η υπερδιήθηση του κλάσματος 6 της εικόνας 33 μεταβάλλει τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά. Για την μέθοδο της υπερδιήθησης χρησιμοποιήθηκαν 350 μl από το κλάσμα 6. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 το κατακράτημα του κλάσματος 6 έχει πολύ μικρή απορρόφηση στα 280 nm (περίπου 125-φορές μικρότερη από αυτήν του κλάσματος 6 πριν την υπερδιήθηση) γεγονός που σημαίνει ότι τόσο οι πολυφαινόλες όσο και οι πρωτεΐνες που εκχυλίστηκαν με μεθανόλη από το ελαιόλαδο είχαν Μοριακό Βάρος μικρότερο των 10.000. Το κατακράτημα αυτό εξακολουθεί να παρουσιάζει υψηλό λόγο 340/260 (0.19) αλλά έχει μικρότερη απορρόφηση στα 280 nm έναντι των 260 nm ($280/260=0.94$).



Εικόνα 40. Φάσμα απορρόφησης του κλάσματος 6 που προήλθε μετά από το στάδιο της υπερδιήθησης με τιμές απορρόφησης στα 260, 280 και 340 nm, 0.086, 0.081 και 0.016 αντίστοιχα.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης πρωτεϊνών από το παρθένο ελαιόλαδο, οι οποίες περιελάμβαναν (α) εκχύλιση με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο και (β) εκχύλιση με μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα αυτά διαχωρίστηκαν στη συνέχεια με χρωματογραφίες μοριακής διήθησης (Sephacryl S-300 και Sephadex G-25) και υπερδιήθηση και σε κλάσματα τους προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και πολυφαινολών με τις μεθόδους Bradford και Folin αντίστοιχα. Σε ορισμένα κλάσματα προσδιορίστηκαν επίσης, τα φασματοσκοπικά τους χαρακτηριστικά στο ορατό και υπεριώδες φάσμα απορρόφησης, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με το αντιδραστήριο DPPH. Σε ορισμένα κλάσματα έγινε επίσης κατεργασία με polyclar για την απομάκρυνση πολυφαινολών. Τα κύρια συμπεράσματα της μελέτης αυτής συνοψίζονται ως ακολούθως:

1. Η εκχύλιση με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος θειικού αμμωνίου εκχυλίζει πολύ μικρότερες ποσότητες πρωτεϊνών και πολυφαινολών σε σχέση με την εκχύλιση παρθένου ελαιολάδου με μεθανόλη. Αυτό μάλλον οφείλεται στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων μεγαλομοριακών πολυφαινολών (ταννινών), ελεύθερων ή συνδεδεμένων με πρωτεΐνες, στο μεθανολικό εκχύλισμα, οι οποίες δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα με το αντιδραστήριο Bradford.

2. Η κατεργασία ιζήματος θειικού αμμωνίου με διαλύτες όπως μεθανόλη και ακετόνη εκχυλίζει μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και πολυφαινολών. Σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών και πολυφαινολών εκχυλίζονται επίσης με SDS και NaOH, πιθανόν με σχηματισμό μικτών μικκυλίων ή διαλυτοποίηση αδιάλυτων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων πρωτεΐνης-πολυφαινόλης αντίστοιχα.

3. Χρωματογραφία υδατικού εκχυλίσματος σε στήλη Sephacryl S-300 αποδεικνύει την ύπαρξη συμπλόκων πρωτεϊνών-πολυφαινολών καθώς και μεγαλομοριακών πολυμερών πολυφαινολών επιπλέον των μικρού MB πολυφαινολικών ενώσεων.

4. Η κατεργασία με polyclar του κλάσματος θειικού αμμωνίου διαλυτοποιημένου σε ρυθμιστικό διάλυμα ελαττώνει σε μεγάλο βαθμό το πολυφαινολικό όσο και το πρωτεϊνικό φορτίο του δείγματος.

5. Η κατεργασία με polyclar μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου ελαττώνει τόσο την συγκέντρωση πολυφαινολών όσο και αυτή των πρωτεϊνών, η οποία συνοδεύεται με εκλεκτική απομάκρυνση των πρωτεϊνών.

6. Κλάσματα χρωματογραφίας στήλης Sephadex G-25 μεθανολικού εκχυλίσματος ιζήματος θειικού αμμωνίου χαρακτηρίζονται από χαρακτηριστικές απορροφήσεις σε μεγάλα μήκη κύματος (546 nm). Οι απορροφήσεις αυτές δεν παρουσιάζονται στα φάσματα απορρόφησης κλασμάτων χρωματογραφίας στήλης Sephadex G-25 μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου, πιθανόν λόγω ύπαρξης διαφορετικών μοριακών ειδών πρωτεϊνών/πολυφαινολών ή/και σε διαφορετικό βαθμό αυτοξειδωσης.

7. Κλάσματα χρωματογραφίας στήλης Sephadex G-25 μεθανολικού εκχυλίσματος ιζήματος θειικού αμμωνίου και μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου παρουσιάζουν ισχυρή ικανότητα αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH, η οποία μπορεί να οφείλεται τόσο σε ελεύθερες πολυφαινόλες όσο και σε σύμπλοκα πολυφαινολών-πρωτεϊνών.

8. Υπερδιήθηση κλασμάτων χρωματογραφίας στήλης Sephadex G-25 μεθανολικού εκχυλίσματος ιζήματος θειικού αμμωνίου και μεθανολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου με μεμβράνη με όριο Μοριακού Βάρους τα 10.000 αποδεικνύει ότι το σύνολο σχεδόν των μορίων πολυφαινολών, πρωτεϊνών ή συμπλόκων πρωτεϊνών-πολυφαινολών παρουσιάζουν MB < 10.000.

Ως γενικό συμπέρασμα θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλα τα κλάσματα εκχυλισμάτων παρθένου ελαιολάδου παρατηρείται η παρουσία τόσο πρωτεϊνικών όσο και πολυφαινολικών μορίων τα οποία δεν ήταν δυνατόν να διαχωρισθούν με την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην ισχυρή σύνδεση των πολυφαινολών με πρωτεϊνικά μόρια είτε/και στην ύπαρξη μεγάλου MB πολυμερών πολυφαινολών.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A)

- Alaiz, M., Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (1997b). Comparative antioxidant activity of Maillard- and oxidized lipid-damaged bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3250–3254.
- Alter, M., and Gutfinger, T., Phospholipids in Several Vegetable Oils, *Riv. Ital. Sost. Grasse.*, 56, 14-18 (1982).
- Ames B.N., Carcinogens and Anticarcinogens. *Science*, 221, 1256-1264, 1983.
- Angerosa, F., Basti, C., and Vito, R., Virgin Olive Oil Volatile Compounds from Lipoxygenase Pathway and Characterization of Some Italian Cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 836-839 (1999).
- Andrewes, P., Busch, J.L., De Joode, T., Groenewegen, A., and Alexandre, H., Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside aglycon as a key Contributor to Pungency, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1415-1420 (2003).
- Anastasios Koidis, Dimitrios Boskou (2006) The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 323-328.
- Aparicio, R., Morales, M.T., and Alonso, V., Authentication of European Virgin Olive Oil by their Chemical Compounds, Sensory Attributes and Consumers' Attitudes, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1076-1083 (1997).
- Aparicio R., Roda M.A., Albi M.A., Gutierrez F., Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 4150, (1999).

- Aruoma O.I., Deiana M., Jenner A., Halliwell B., Kaur H., Banni S., Corongiu F.P., Dessi M.A., Aeschbach R., Effect of Hydroxytyrosol found in Extra Virgin Olive Oil on Oxidative DNA damage and on Low-density Lipoprotein Oxidation, *J. Agric. Food. Chem.* 46, 5181, (1998).

B)

- Ben-Salah A., Marzouk B., Cherif A., Evolution of lipids during over-ripening of olives., *Olivae.*, 3, 14, 14-17, (1986).
- Belitz H., Grosch W., in *Food Chemistry*, Springer-Verlong (ed.), Berlin, (1987).
- Beveridge, T., Haze and Cloud in Apple Juices, *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition*, 37, 75-91 (1997).
- Bianco, A.D., and Uccella, N., Biophenolic Components of Olives, *Food Res. Int.*, 33, 475-485 (2000).
- Bianco, A., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G., and Uccella, N., Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3531-3534 (1999).
- Bianco, A., Mazzei, R. A., Meichioni, C., Scarpati, M. L., Romeo, G., Uccella N., *Olea europea. Food Chem.* 62, 343-346 (1998)

C)

- Capasso, R., De Martino, A. and Arienzo, M. (2002) Recovery and Characterization of the Metal Polymeric Organic Fraction (Polymerin) from Olive Oil Mill Wastewaters, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2846-2855.
- Castillo Gomez, J., Minguez-Mosquera, M.I., Fernandez Diez, M.J., Presencia de Poligalacturonasa (PG) en la Aceituna Negra Madura. Factores que Influencian la Actividad de dicha Enzima, *Grasas y Aceites*, 29, 333-338 (1978).

- Chamulitrat W., Hugles M.F., Eling T.E., Mason R.P., Superoxide and Peroxyl Radical Generation of Polyunsaturated Fatty Acid Hydroperoxides by Soybean Lipoxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 290 (1), 153-159, (1991).
- Chamulitrat W., Iwahashi H., Kelman D.J., Mason R.P., Evidence Against the 1:2:2:1 Quarter DMPO Spectrum as the Radical Adduct of the lipid Alkoxy Radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 296 (2), 645-649, (1990).
- Chazau-Gillig, S, The civilization of the olive tree and cereals. *Olivae*. 53-12(1994)
- Chan H.W.S., Photo-sensitized Oxidation of Unsaturated Fatty Acid Methyl Esters. The Identification of Different Pathways. *Jaocs*. 54, 100-104, (1976).
- Cheng, G.W.W., and Crisosto, C.H., Iron-polyphenol Complex Formation and Skin Discoloration in Peaches and Nectarines, *J. of the American Society for Horticultural Sci.*, 122, 95-99 (1997).
- Cinquanta, L., Esti, M., and La Notte, E., Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil during Storage, *JAOCS*, 74, 1259-1264 (1997).
- Gopal, C. & Rehmanji, M. (2000) PVPP-The rote to effective beer stabilization. *Brewers' Guardian*, May 2000, I-VI.
- Cortesi, N., and Fedeli, E., Polar Components of Virgin Olive Oil, Note 1, *Riv. Ital. Sost. Grasse.*, 60, 341-351 (1983).
- Coupland, J. N., McClements, D. J., Lipid oxidation in food emulsions, *Trends in food science & technology*, 7, 83-91, (1996)

- Crovetti, A., Plant Protection. Development of Methodologies and Protection of Production and Environment, World Olive Encyclopedia (Luchetti, F., ed), Int. Olive Oil Council, Spain, 225-232 (1996).
- Cuendet M., Pezzuto J.M., The role of Cyclooxygenase and Lipoxygenase in Cancer Chemoprevention. *Drug Metab. Drug Interact*, 17, 109, (2000).

D)

- Dela Puerta R., Gutierrez V.R., Hault J.R.S., Inhibition of Leucocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgin Olive Oil, *Biochem Pharmacol.*, 57, 445, (1999).
- De la Puerta R., Martinez-Dominguez M.E., Ruiz-Gutierrez V., Flavill J.A., Hault J.R., Effects of Virgin Olive Oil Phenolics on Scavenging of Reactive Nitrogen Species and upon Nitrenergic Neurotransmission, *Life Sci.*, 69, 1213, (2001).
- Deiana M., Aruoma O.I., Bianchi M.P., Spencer J.P.E., Kaur H., Halliwell B., Aeschbach R., Banni S., Dessi M.A., Corongiu F.P., Inhibition of Peroxynitrite Dependent DNA Base Modification and Tyrosine Nitration by the Extra Virgin Olive Oil derived Antioxidant Hydroxytyrosol., *Free Rad. Biolog. Med.* 26, 762, (1999).
- Di Giovachino, L., Fedeli, E., Di Gregorio, P., Solinas, M., Kiritsakis, A.K., Ποιοτικά χαρακτηριστικά του Ελαιόλαδου και Παράγοντες που επιδρούν σ' αυτά, Πρακτικά Γ' Διεθνούς Συνεδρίου για την Βιολογική Αξία του Ελαιόλαδου, σελ. 545-638 (1980).
- Dickinson, E., An introduction to food colloids, *Oxford University Press*, (1992)
- Dickinson, E., McClements, D. J., *Advances in food colloids*, Blackie, (1995)

- Donaire, J.P., Belver, A., Rodriguez-Garcia, M.I., and Megias, L., Lipid Biosynthesis, Oxidative Enzyme Activities and Cellular Changes in Growing Olive Fruit, *Rev. Esp.Fisiol.*, 40(2), 191-203 (1984).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356 (1956).

F)

- Fiorino, P. and F. Nizzi Griffi, The spread of olive farming. *Olivae*. 44-9 (1992)
- Foxhall L., Οι Ανάγκες Κατανάλωσης Ελαιόλαδου στα Σπίτια των Πλουσίων της Αρχαίας Ελλάδας, Ελιά και Λάδι, Δ' Τριήμερο Εργασίας, Καλαμάτα, 7-9 Μαΐου, Πολιτιστικό Τεχνολογικό Ίδρυμα ETBA (Εκδ.), Σελ. 105 (1993).
- Francisco J. Hidalgo, Manuel Alaiz, and Rosario Zamora (2001) Determination of Peptides and Proteins in Fats and Oils, *Anal. Chem.*, 2001, 73 (3), pp 698–702
- Francisco J. Hidalgo and Rosario Zamora (2006) Peptides and proteins in edible oils: Stability, allergenicity, and new processing trends, *Trends in Food Science & Technology* 17, 56–63
- Frankel E.N., Lipid Oxidation : Mechanisms, Products and Biological Significance. *JAOCS*, 61 (12), 1908-1916,(1984).
- Frankel E.N., Neff W.E., Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography- Mass Spectrometry : V. Photosensitized Oxidation. *Lipids*. 14, 12, 961-967 (1979).
- Frankel E.N., Neff W.E., Selke E., Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography- Mass Spectrometry : VII. Volatile Thermal Decomposition

Products of Pure Hydroperoxides from Autoxidized Methyl Oleate, Linoleate. *Lipids*, 16, 5, 279-285, (1981).

- Frega, N., Mozzon, M., Belelli, V., Fontanazza, G., and Patumi, M., Quality Evolution in Olive Oil from *Bactrocera olea* Infested Fruits, *Olivo & Olio*, 3, 52-59 (2000).
- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., and Moutounet, M., An Oxidised Tartaric Acid Residue as New Bridge Potentially Competing with Acetaldehyde in Flavan-3-ol Condensation, *Phytochem.*, 46, 223-227 (1997).

G)

- Garcia, J.M., Seller, S., and Perez-Camino, M.C., Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3516-3520 (1996).
- Georgalaki, M.D., Sotiroudis, T.G. and Xenakis, A. (1998a) The presence of oxidizing enzyme activities in virgin olive oil. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 75, 155-159.
- Georgalaki, M.D., Bachmann, A., Sotiroudis, T.G, Xenakis, A., Porzel, A. and Feussner, I. (1998b) Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Fett/Lipid*, 100, 554-560.
- George S., Brat p., Alter p., and Amiot J. M.(2005). Rapid Determination of polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373.
- Gutfinger, T., Polyphenols in Olive Oils, *Journal of American Oil Chemist's Society*, 966-968 (1981).
- Gutierrez- Rosales F., GARRIDO- Fernandez J., Gallardo-Guerrero L., Gandul-Rojas B., Minguez-Mosquera I., Action of Chlorophylls on the stability of Virgin Olive Oil. *JAACS*, 67, 192-196, (1992).

H)

- Harborne, J.B., Methods in Plant Biochemistry. In Harborne, J.B. (ed). Academic Press, London, UK. vol. 1: pp. 1-28 (1989).
- Halliwell B., Gutteridge J., Oxygen Toxicity, Oxygen Radicalw, Transition Metals and Diseases. *Biochem. J.*, 219, 1-14, (1984).
- Heredia Moreno, Fernandez-Bolanos Guzman A. y J., “Celulasas” en Aceitunaas y su Posible Influencia en los Cambios de Textura. II. Actividad Celulolitica en la Variedad Hojiblanca, *Grasas y Aceites*, 36, 130-133 (1985).
- Heinemann, W.L.T., In *Res Rustica*, (Columella, L.J.M., Ed.), Harvard University Press, Cambridge, MA USA (1968).
- Hidalgo, F. J., Alaiz,M., & Zamora, R. (2002). Low molecular weight polypeptides in virgin and refined olive oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 79(7), 685–689.
- Hsieh R.J. and Kinsella J.E., Oxidation of Unsaturated Fatty Acids : Mechanisms, Products, Inhibition with Emphasis on Fish, *Adv. Food Chem. J.*263, 129-135, (1989).

K)

- Kafatos, A., and Comas, G., Biological Effects of Olive Oil on Human Health. In: *Olive Oil*. A.K. Kiritsakis (Ed), AOCS PRESS, Campaign, Illinois, ch. 17, pp. 157-181 (1990).
- Kiritsakis, A., In: *Olive Oil*, Kiritsakis, A. (Ed), AOCS PRESS, Campaign, Illinois. ch. 3, pp. 12-21, ch.4, pp. 25-55 (1990).
- Kiritsakis A.K., in *Olive Oil*, American Oil Chemists Society (ed.), Illinois, (1991).
- Kiritsakis A., Dugan L.R., Studies in Photo-Oxidation of Olive Oil. *JAOCS*. 62, (5), 892-896, (1985).

- Kinsella J.S., Hsieh R.J., Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products and Inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food. Nutr. Res.*, 33, 233-241, (1989).
- Kilkowski, W.J. and Gross, G.G. (1999) Color reaction of hydrolysable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry*, 51, 363-366
- Kieser, M.E., Pollard, A., and Timberlake, C.F., Metallic Components of Fruit Juices. I. Copper as a Factor Affecting Sedimentation in Bottled Apple Juices, *J. Sci. Food Agric.*, 8, 151-158 (1957).
- Klurfeld, D. M., & Kritchevsky, D. (1987). Isolation and quantification of lectins from vegetable oils. *Lipids*, 22, 667–668.

L)

- Logani M.K., Davies R.E., Lipid Oxidation : Biologic Effects and Antioxidants- Review. *Lipids* , 15 (6), 485-495, (1979).
- Loukas, M. and C.B. Krimbas, History of olive cultivars based on their genetic distances. *J. Hort. Science*. 58-121(1983).

M)

- Macheix, J.J., Fleuriot, A., and Billot, J., Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1990).
- Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Moltedo O., Leone A., Zappia V., The protective Effect of the Olive Oil Polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol Counteracts Reactive Oxygen Metabolite-induced Cytotoxicity in Caco-2 cells, *J. Nutr.*, 127, 286, (1997).
- Mathew, A.G., and Parpia, H.A.B., Browning as a Polyphenol Reaction, *Advances in Food Research*, 19, 75-132 (1971).
- Mercier, J., Role of Phytoalexins and Other Antimicrobial Compounds from Fruits and Vegetables in Postharvest Disease Resistance, *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* (Tomas-Barberan, F.A., Robins, R.J., eds), Clarendon Press, Oxford, UK, 229-241 (1997).
- Minguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., and Gallado-Guerrero, L., Measurement of Chlorophyllase Activity in Olive Fruit (*Olea europaea*), *J. Biochem.*, 116, 263-268 (1994).

- Minguez-Mosquera, M.I., Evolucion de los Constituyentes Pecticos y de las Enzimas Pectoliticas durante el Proceso de Maduracion y Almacenamiento de la Aceituna Hojiblanca, *Grasas y Aceites*, 33(6), 327-333 (1982).
- Minguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sanchez-Gomez, A.H., and Garrido-Fernandez, J., Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 332-336 (1991).
- Morcio, G.R., De Anreis, R., and Fedeli, E., Investigations on Total Sterols Content in the Olive Oil and their Variation during the Refining Process, *Riv. Ital. Sost. Grasse.*, 64, 185-192 (1987).
- Morales, M.T., Alonso, M.V., Rios, J.J., and Aparicio, R., Virgin Olive Oil Aroma: Relationship between Volatile Compounds and Sensory Attributes by Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2925-2931 (1995).

N)

- Neff W.E., Selke F.E., Weisleder D., Photosensitized Oxidation of Methyl Linoleate Monohydroperoxides : Hydroperoxy Cyclic Peroxides, Dihydroperoxides, Keto Esters and Volatile Thermal Decomposition Products. *Lipids*. 18(12), 868-876, (1983).
- Nenadis N, Tsimidou M (2002) Observation on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH.) tests. *J Am Oil Chem Soc* **79**: 1191–1195.
- Nwosu, C.V., Boyd, L.C. and Sheldon, B., *J.Am.Oil Chem. Soc.* 74, 293-297, (1997)

O)

- Olias H., Perez A.G., Rios J.J., Sanz L.C., Aroma of virgin olive oil : Biogenesis of green Odor notes., *J. Agric. Food Chem.* 41, 2368-2373, (1993).
- Oszmianski, J., Cheynier, V., and Moutounet, M., Iron-catalyzed Oxidation of (+)-catechin in Model Systems, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1712-1715 (1996).
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H., Olive-oil Consumption and Health: The Possible Role Of Antioxidants, *Lancet Oncology*, 1, 107-112 (2000).
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H., The antioxidant/anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil, *Europ. J. Of Cancer*, 36, 1235-1247 (2000).
- Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder B., and Bartsch, H., Phenolic Compounds and Squalene in Olive Oils: The Concentration and Antioxidant Potential of Total Phenols, Simple Phenols,

Secoiridoids, Lignans and Squalene, *Food and Chemical Toxicology*, 38, 647-659 (2000).

- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalter B., Bartsch H., Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil., *Clin. Chem.*,46, 976, (2000c).
- Owuor E.D., Kong A.N., Antioxidant- and Oxidant- Regulated Signal Transduction Pathways, *Biochem. Pharmacol* ,64, 765, (2002).

P)

- Parr, A.J., and Bolwell, G.P., Phenols in the Plant and in the Man, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 895-1012 (2000).

- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). Antioxidants in food: Practical applications. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

- Porras, O., Carlsson, B., Fallstrom, S. P., & Hanson, L. A. (1985). Detection of soy protein in soy lecithin, margarine and, occasionally, soy oil. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 78, 30–32.

- Psomiadou E., Tsimidou M., On the role of squalence in olive oil stability. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4025, (1999).

R)

- Rahmani M., Review of the Role of Chlorophyll Pigments in the Photooxidation of Virgin Olive Oil. *Olivae*, 6, 30-35, (1989).
- Ramadan, M.F., Kroh, L.W. and Morsel, J.-T.,. *J.Agr.Food Chem.* 51, 6961-6969, (2003)

- Raws, H.R. and Santen P.J., A Possible role for Singlet Oxygen in the Initiation of Fatty Acid Autoxidation. *JAOCS* 47, 121-125, (1970).
- Rehmanji, M., Gopal, C. and Mola, A. (2005) Beer stabilization technology- Clearly a matter of choice, *MBAA Technical Quarterly*, 42, 332-338
- Rice- Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R., in *Free Radical Research*, Elsevier(ed.), 1991.
- Rota C., Barr D.P., Marin M.V., Guengerich F.P., Tomasi A., Mason R.P., Detection of Free Radicals Produced from the Reaction Cytochrome P-450 with Linoleic Acid Hydroperoxide. *Biochem J.*, 328, 565-571, (1997).
- Ryan, D., and Robards, K., Phenolic Compounds in Olives, *Analyst*, 123, 31R-44R (1998).

S)

- Saija, A., and Uccella, N., Olive Biophenols: Functional Effects on Human Wellbeing, *Trends Food Sci. Tech.*, 11, 357-363 (2001).
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R., *Free Rad.Res.* 36, 177-187, (2002).
- Siebert, K.J. (1999) Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis, *J.Agric.Food Chem.*, 47, 353-362.
- Sivinski, J., Aluja, M., Dodson, G., Freidberg, A., Headrick, D., Kaneshiro, K., and Landolt, P., Topics in the Evolution of Sexual Behaviour in the Tephritidae, Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behaviour (Aluja, M., and Norrbom A.L. eds), CRC Press, Boca Baton, FL, USA 751-792 and 822 (1999).

- Sotiroudis T.G., Kyrtopoulos S.A., Xenakis A., Sotiroudis G.T., Chemoprotective potential of minor components of olive oil against cancer., *Ital. J. Food Sci.*,15, 169-185, (2003).
 - Solinas, M., Di Giovachino, L., and Cucurachi, A., I polifenoli delle olive e dell, olio di oliva. *Annale Instituto Speimentale. Elaiotechnica. Nota I: Variazioni che subiscono alcuni polifenoli delle olive col procedere della maturazione*, 105-128 (1975, I).
 - Solinas, M., Di Giovachino, L., and Cucurachi, A., I polifenoli delle olive e dell, olio di oliva. *Annale Instituto Speimentale. Elaiotechnica. Nota II: Indagine preliminare sull' incidenza delle tecniche operative adottate per l'estrazione dell'olio*, 129-154 (1975, II).
 - Solinas, M., Di Giovachino, L., and Mascolo, A., I polifenoli delle olive e dell'olio d'oliva, *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. Nota III: Influenza della temperatura e della durata della glamolatura sul contenuto in polifenoli degli oli*, 19-23 (1978).
 - Spettoli P., Free and Lipoprotein-Bound Phospholipids in Oil and Seed Oils, *Ind. Agr.*, 10, 264-269 (1972).
 - Stupans I., Stretch G., Hayball P., Olive Oil Phenolics Inhibit Human Hepatic Microsomal Activity, *J., Nutr.*, 130, 2367, (2000).
- T)
- Tzika, E.D., Sotiroudis, T.G., Papadimitriou, V. and Xenakis. (2009) Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv.Koroneiki) *Eur.Food Res.Technol.* 228, 487-495.

- Terao J. and Matsushita M., Products Formed by Photosensitized Oxidation of Unsaturated Fatty Acid Esters. *JAOCS* 54, 234-238, (1977).
- Tzika, E.D., Papadimitriou, V., Sotiroudis, T.G. and Xenakis, A. Oxidation of oleuropein studied by EPR and spectrophotometry. *Eur.J.Lipid Sci Technol* 110, 149-157 (2008).

U)

- Uccella, N., Olive Biophenols: Biomolecular Characterization, Distribution and Phytoalexin Histochemical Localization in the Drupes, *Trends in Food Science and Technology*, 11, 315-327 (2001).
- Uccella, N., EVOO-Extra Virgin Olive Oil, DOC: Quality and Marketing, Olive Oil: Production and Nutritional Characteristics (Scarpelli, E., ed.), CCIAA, Sybaris (CS), Italy, 35-37 (1993).
- Uccella, N., Casuscelli, F., De Nino, A., Gallo, F.R., Procopio, A., and Romeo, G., Olea Europaea L. Biophenols. Applications of Modern Analytical Methodologies, Research and Innovation in Agrifood Industry, (Porretta, S., ed), Chiriotti, Pinerolo, Italy 1, 178-191 (1994).
- Uccella, N., Biomolecular Transformations of Complex Biophenols Occurring at the Processing and Storage in the Table Olive and Oil Supply Chain, *Czech. J. Food Sci.*, 18, 13-16 (2000).

V)

- Van Acker S.A.B.E., Van Balen G.P., Van de Berg D.J., Bast A., Van der Vijgh W.J.F., Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids., *Biochem. Pharmacol.*, 56, 935, (1998).

- Vaya, J. and Aviram, M., *Curr. Med. Chem.Immunol.Endocrin.Metabol. Agents.* 1, 99-117, (2001).
- Visioli F., Bellomo G., Galli C., Free- Radical Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 247, 60, (1998).
- Vitagliano, M., I Costituenti Minori degli Olii vegetali, *Riv. Ital. Sost. Grasse.*, 38, 46-55 (1961).

W)

- Whiffen, L.K., Midgley, D.J. and McGee, P.A. (2007) Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biol.Biochem.* 39, 691-694

Z)

- Zamora, R., Alaiz, M., & Hidalgo, F. J. (2001). Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit content, composition, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4267–4270.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βεκιάρης, Σ.Α., Οι Πολυφαινόλες του Ελαιόλαδου και η σημασία τους στην Ποιότητά του, *Χημικά Χρονικά*, τευχ. 2, σελ. 45-48 (2001).
- Μπαλατσούρας, Γ.Δ., Σύγχρονη Ελαιοκομία (Το Ελαιόδεντρο – Το Ελαιόλαδο – Η Επιτραπέζια Ελιά), Τόμος Δεύτερος, Το Ελαιόλαδο, Αφοί Φραγκούδη Ο.Ε. (Εκδ.), Αθήνα (1997).

- Μπουλώτης, Χ., Η Ελιά και το Λάδι στις Ανακτορικές Κοινωνίες της Κρήτης και της Μυκηναϊκής Ελλάδας: Όψεις και απόψεις, Ελιά και Λάδι, Δ΄ Τριήμερο Εργασίας, Καλαμάτα, 7-9 Μαΐου, Πολιτιστικό Τεχνολογικό Ίδρυμα ΕΤΒΑ (Εκδ.), Σελ. 105 (1993).
- Παπαϊωάννου, Γ. Θ., Μαθήματα φαρμακευτικής φυσικής και φαρμακοτεχνείας, 154-163, Δ΄ Έκδοση, (1993)