



**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΚΑΦΕΔΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΓΟΡΑΣ**

ΒΕΛΙΤΣΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΚΑΦΕΔΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΓΟΡΑΣ**

ΒΕΛΙΤΣΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

**Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων
για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων
του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.**

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2009

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον καθηγητή της σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Δρ. Τριανταφύλλου Δημήτριο για τις πολύτιμες συμβουλές του και την συμπαράστασή του σε κάθε βήμα της εργασίας αυτής, καθώς και τον Δρ. Πετρίδη Δημήτριο για τη βοήθεια της διεκπεραίωσης τμήματος της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες Κα. Βίνου Μαργαρίτα και Κα. Αγγέλη Χριστίνα για τις συμβουλές και την υπομονή τους κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΚΑΦΕΔΕΣ ΤΗΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΓΟΡΑΣ

ΒΕΛΙΤΣΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες οι οποίες μπορούν να παρεμποδίσουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, όπως των δραστικών μορφών του οξυγόνου, προστατεύοντας από την επιβλαβή δράση τους. Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι μία πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες.

Στην παρούσα εργασία, ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ελληνικοί καφέδες διαφορετικής μάρκας που υπάρχουν και καταναλώνονται ευρέως στην ελληνική αγορά. Έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS και εξετάστηκε αν με την προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού επηρεάζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ακόμα εξετάστηκε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Από την στατιστική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι οι εξεταζόμενοι ελληνικοί καφέδες με βάση την διαφορετική μάρκα διαφέρουν ως προς την συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ενώ με βάση την προσθήκη διαφορετικής ποσότητά τους στην ίδια ποσότητα νερού είναι ισοδύναμοι. Τέλος διαπιστώθηκε ότι υπάρχει σημαντική ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| Α/Α | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ | ΣΕΛ. |
|------------|--|-------------|
| 1. | Εισαγωγή | 1 |
| 2. | Βιβλιογραφική ανασκόπηση | 3 |
| 2.1. | Το δέντρο του καφέ | 3 |
| 2.2. | Κύριες ποικιλίες και ποιοτική εκτίμηση του πράσινου καφέ | 4 |
| 2.3. | Συγκομιδή και επεξεργασία | 5 |
| 2.3.1. | Συγκομιδή | 5 |
| 2.3.2. | Διαβροχή και ξήρανση | 6 |
| 2.3.3. | Ταξινόμηση | 8 |
| 2.3.4. | Καβούρδισμα | 9 |
| 2.3.5. | Αποκαφεϊνοποίηση | 11 |
| 2.3.6. | Άλεση και συσκευασία | 12 |
| 2.4. | Χημική σύσταση του καφέ | 13 |
| 2.4.1. | Χημική σύσταση πριν το καβούρδισμα του καφέ | 13 |
| 2.4.2. | Χημική σύσταση μετά το καβούρδισμα του καφέ | 13 |
| 2.4.2.1. | Πρωτεΐνες | 13 |
| 2.4.2.2. | Υδατάνθρακες | 13 |
| 2.4.2.3. | Λιπίδια | 14 |
| 2.4.2.4. | Οξέα | 14 |
| 2.4.2.5. | Καφεΐνη | 14 |
| 2.4.2.6. | Τρυγονοελλίνη, νικοτινικό οξύ | 14 |
| 2.4.2.7. | Αρωματικές ουσίες | 15 |
| 2.4.2.8. | Ιχνοστοιχεία | 16 |
| 2.4.2.9. | Άλλα συστατικά | 16 |
| 2.5. | Αντιοξειδωτικές ουσίες και η σημασία τους | 17 |
| 2.5.1. | Αντιοξειδωτικά και μηχανισμός ελεύθερων ριζών | 17 |
| 2.5.2. | Κατάταξη και μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών | 18 |
| 2.5.3. | Η δράση των αντιοξειδωτικών | 21 |
| 2.6. | Φαινολικές ενώσεις | 23 |
| 2.6.1. | Εισαγωγή | 23 |
| 2.6.2. | Δομή-κατηγορίες φαινολικών ενώσεων | 23 |
| 2.6.2.1. | Φαινολικά οξέα | 23 |
| 2.6.2.2. | Φλαβονοειδή | 25 |
| 2.6.2.3. | Στιλβένια | 27 |
| 2.6.2.4. | Λιγνάνες | 27 |
| 2.6.3. | Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων | 27 |
| 2.7. | Αντιοξειδωτικά στον καφέ | 28 |
| 2.8. | Κύριοι μέθοδοι προσδιορισμού και διαχωρισμού των φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας | 31 |
| 2.8.1. | Μέθοδος Folin-Ciocalteu | 31 |
| 2.8.2. | Μέθοδος του δείκτη υπερμαγγανικού καλίου (KmnO ₄) | 32 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.8.3. | Μέθοδος DPPH | 32 |
| 2.8.4. | Μέθοδος HPLC και μέθοδος TLC | 33 |
| 2.8.5. | Μέθοδος FRAP | 34 |
| 2.8.6. | Μέθοδος ABTS | 35 |
| 2.8.7. | Μέθοδος ORAC | 36 |
| 2.8.8. | Μέθοδος της χημειοφωταύγειας | 36 |
| 2.9. | Η επίδραση της κατανάλωσης του καφέ στον ανθρώπινο οργανισμό | 37 |
| | | |
| 3. | Σκοπός της εργασίας | 39 |
| | | |
| 4. | Πειραματικά δεδομένα | 40 |
| 4.1. | Υλικά και μέθοδοι | 40 |
| 4.1.1. | Δείγματα ελληνικού καφέ | 40 |
| 4.1.2. | Αντιδραστήρια | 40 |
| 4.1.3. | Όργανα και σκεύη | 42 |
| 4.2. | Μέθοδοι ανάλυσης | 43 |
| 4.2.1. | Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu | 43 |
| 4.2.1.1. | Διαδικασία προσδιορισμού | 44 |
| 4.2.1.1.1. | Προετοιμασία αντιδραστηρίων | 44 |
| 4.2.1.1.2. | Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς | 44 |
| 4.2.1.1.3. | Διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων | 46 |
| 4.2.2. | Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας – Μέθοδος ABTS | 47 |
| 4.2.2.1. | Διαδικασία προσδιορισμού | 49 |
| 4.2.2.1.1. | Προετοιμασία αντιδραστηρίων | 49 |
| 4.2.2.1.2. | Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς | 49 |
| 4.2.2.1.3. | Διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων | 50 |
| 4.3. | Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων | 51 |
| | | |
| 5. | Αποτελέσματα και συζήτηση | 52 |
| 5.1. | Προσδιορισμός και συσχέτιση των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα ελληνικών καφέδων και αν επηρεάζει η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού στην συγκέντρωσή τους | 52 |
| 5.1.1. | Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu | 52 |
| 5.1.1.1. | Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης | 52 |
| 5.1.1.2. | Αποτελέσματα ανάλυσης των δειγμάτων | 54 |
| 5.1.1.3. | Στατιστικός έλεγχος | 58 |
| 5.1.1.3.1. | Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA) | 58 |
| 5.1.1.3.2. | Έλεγχος κανονικότητας της στήλης των υπολειμμάτων | 58 |
| 5.1.1.3.3. | Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων | 59 |
| 5.1.1.3.4. | Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA) | 60 |
| 5.1.1.3.5. | Έλεγχος SNK (Student-Newman-Keuls) | 62 |

| | | |
|------------|--|----|
| 5.1.2. | Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο ABTS | 65 |
| 5.1.2.1. | Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης | 65 |
| 5.1.2.2. | Αποτελέσματα ανάλυσης των δειγμάτων | 67 |
| 5.1.2.3. | Στατιστικός έλεγχος | 71 |
| 5.1.2.3.1. | Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA) | 71 |
| 5.1.2.3.2. | Έλεγχος κανονικότητας της στήλης των υπολειμμάτων | 71 |
| 5.1.2.3.3. | Έλεγχος ομοιογένειας διακυμάνσεων | 72 |
| 5.1.2.3.4. | Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-Way ANOVA) | 73 |
| 5.1.2.3.5. | Έλεγχος SNK (Student-Newman-Keuls) | 75 |
| 5.1.3. | Συσχέτιση συγκέντρωσης ολικών φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής ικανότητας | 78 |
| | | |
| 6. | Συμπεράσματα | 80 |
| | | |
| 7. | Προτάσεις για μελλοντική έρευνα | 81 |
| | | |
| 8. | Βιβλιογραφία | 82 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καφές εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη από την Αφρική στα μέσα του 17^{ου} αιώνα και η σύστασή του εξαρτάται από τη ποικιλία, την περιοχή προέλευσης και τις κλιματολογικές συνθήκες (Belitz & Grosch, 1999). Δύο είναι οι κύριες ποικιλίες καφέ που κατακλύζουν την παγκόσμια αγορά, η Arabica και η Robusta. Οι καβουρντισμένοι κόκκοι των δύο αυτών ειδών για τον μέσο καταναλωτή είναι όμοιοι, στην πραγματικότητα όμως τόσο οι κόκκοι όσο και τα φυτά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Για παράδειγμα η περιεκτικότητα της καφεΐνης του καφέ της ποικιλίας Robusta είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής του καφέ της ποικιλίας Arabica, ενώ υστερεί στα αιθέρια έλαια που αρωματίζουν το χαρμάνι του καφέ (Γεράρδης, 1998).

Στις περιοχές της Αραβίας, Τουρκίας, Ελλάδας και Βαλκανίων κυρίαρχος είναι ο τρόπος παρασκευής του φρυγμένου και αλεσμένου καφέ που βράζεται με το νερό και πίνουμε τον καφέ έχοντας στον πάτο του φλιτζανιού το κατακάθι και έναν πηχτό αφρό στην επιφάνεια το καϊμάκι. Ανεξάρτητα, αν για λόγους οικονομικούς και κλιματολογίας, ο καφές που πίνουμε στην Ελλάδα είναι πιο λεπτοκομμένος και πιο ξανθός (λιγότερο ψημένος) σπάνια αναμιγνύεται με αρωματικά και όταν λέμε "ελληνικός" αυτά εννοούμε (Γεράρδης, 1998). Με τον όρο φρυγμένο καφέ εννοούμε, το καβούρδισμα των απαλλαγμένων από το κέλυφος τους κόκκων καφέ, σε θερμοκρασία 200-250°C, ώστε το τελικό προϊόν να έχει το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση (Κ.Τ.Π., 2003).

Ο καφές είναι ένα χημικό μίγμα και περιέχει πάνω από χίλια διαφορετικά χημικά συστατικά περιλαμβάνοντας υδαάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αλκαλοειδή και φαινολικές ενώσεις και σε αυτά οφείλονται οι διαφορετικές επιδράσεις του καφέ στον ανθρώπινο οργανισμό (Hidgon & Frei, 2006).

Στον καφέ υπάρχουν διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις (Borelli et al, 2002) όπως το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με την 5-OH του κινικού οξέος και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ, η κερκετίνη, η μυρικετίνη (Παπαγεωργίου, 2005), οι ταννίνες (Farah & Donangelo, 2006), οι προανθοκυανιδίνες (Parras et al., 2006), οι ανθοκυανιδίνες όπως οι κυανιδίνες, οι

πελαργονιδίνες και μία πεονιδίνη και οι λιγνάνες (Farah & Donangelo, 2006). Άλλα αντιοξειδωτικά είναι τα μελανοειδή που αποτελούν προϊόντα της αντίδρασης Maillard μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και επηρεάζουν το χρώμα και το άρωμα του καφέ (Lopez-Galilea et al, 2006; Cammerer & Kroh, 2006), η καφεΐνη (Γεράρδης, 1998), και οι τοκοφερόλες (α,β,γ) μαζί με τις τοκοτριενόλες (Gonzalez, 2001).

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα ελληνικού καφέ διαφορετικής μάρκας που υπάρχουν και καταναλώνονται ευρέως στην ελληνική αγορά, αν η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού επηρεάζει την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας και αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. ΤΟ ΔΕΝΤΡΟ ΤΟΥ ΚΑΦΕ

Το δέντρο του καφέ είναι ένας θάμνος που όταν καλλιεργείται φτάνει περίπου τα 2,5m ύψος. Αυτοφυές μπορεί να φτάσει τα 8-10m. Από τα 50 περίπου είδη του φυτού καφέα πρακτική αξία και ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο 3-4 είδη, από τους καρπούς των οποίων κατακλύζεται η παγκόσμια αγορά. Η βοτανολογία το κατατάσσει στις ρονβιΐδες, τα φύλλα του φύονται κατά ζεύγη, το σχήμα τους είναι λογχοειδές-οβάλ, έχουν έντονο, σκούρο πράσινο χρώμα και είναι σαρκώδη και λαμπερά.

Η καφέα απαιτεί εύκρατο και ζεστό κλίμα, γι'αυτό και αναπτύσσεται στην ευρύτερη ζώνη που εκτείνεται 20° βόρεια και 20° νότια του Ισημερινού. Προτιμά λοφώδη μέρη, από 300-1000m υψόμετρο. Αυτές οι συνθήκες συναντώνται αρμονικά στη Νότια Αμερική, όπου η τεράστια παραγωγή συμβαδίζει με τη σταθερά καλή ποιότητα των ποικιλιών.

Τα λουλούδια της καφέας αναπτύσσονται σε μπουκέτα στο μίσχο των φύλλων. Είναι άσπρα με πολύ έντονο και ευχάριστο άρωμα. Ο καρπός-δρύμη με κουκούτσι μοιάζει με του κερασιού. Η διάμετρος του είναι περίπου 15mm του μέτρου. Όταν ωριμάζει γίνεται κατακόκκινος.

Η παγκόσμια παραγωγή κατακλύζεται από δύο ποικιλίες καφέ, την Arabica και την Robusta. Οι ψημένοι κόκκοι των δύο αυτών ειδών για τους μη ειδικούς είναι όμοιοι, στην πραγματικότητα όμως τόσο οι κόκκοι όσο και τα φυτά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η Robusta χωρίς κλάδεμα φτάνει τα 10m ενώ η Arabica τα 6-8m. Η Arabica είναι πιο ευαίσθητη στη θερμοκρασία και προσβάλλεται ευκολότερα από τα παράσιτα. Αντίθετα, η Robusta αντέχει στις θερμοκρασίες πάνω από 30°C και γι'αυτήν της την ανθεκτικότητα άλλωστε ονομάστηκε έτσι (Robusta = εύρωστος). Ο καρπός της Arabica είναι ίσιος, επιμηκυμένος, το μεσαίο αυλάκι είναι ελικοειδές, το χρώμα συχνά πράσινο με αποχρώσεις γαλάζιου. Οι καρποί της Robusta κατά κανόνα τείνουν στο στρογγυλό, το αυλάκι δεν είναι έντονο και στα χρώματα δείχνουν γκριζοπράσινοι. Όμως, εκτός από τις μορφολογικές, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των ουσιών που περικλείουν. Η καφεΐνη στη

Robusta υπερτερεί, ενώ υστερούν τα αιθέρια έλαια που αρωματίζουν το χαρμάνι του καφέ.

Τα φυτά της καφέας αρχίζουν να παράγουν καρπούς από το τέταρτο έτος. Μεταξύ του έβδομου και όγδοου έτους βρίσκονται στην κορύφωσή τους και ζουν μέχρι 30 χρόνια (Γεράρδης, 1998).

2.2. ΚΥΡΙΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΚΑΦΕ

Μόνο 3 από τα 70 είδη καφέ καλλιεργούνται και αυτά είναι: *Coffea Arabica* το οποίο παρέχει περίπου το 75% της παγκόσμιας παραγωγής, *Coffea canephora* το οποίο παρέχει περίπου το 25% και το *Coffea liberica* και άλλα τα οποία παρέχουν λιγότερο από 1% της παγκόσμιας παραγωγής. Η ποσότητα (kg) των φρέσκων σπόρων καφέ που δίνουν 1kg εμπορεύσιμου καφέ είναι για το *Coffea Arabica* 6.38, για το *Coffea canephora* 4.35 και για το *Coffea liberica* 11.5.

Περίπου 80 ποικιλίες από τα τρία είδη καφέ που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι γνωστά. Οι πιο σημαντικές από το είδος *Coffea Arabica* είναι η *typica*, *bourbon*, *maragogips* και *mocca* και από το είδος *Coffea canephora* είναι η *robusta* (η πιο κοινή), *typica*, *uganda* και *quillon*. Όλες οι ποικιλίες από το είδος *Coffea canephora* πωλούνται κάτω από το κοινό όνομα “*robusta*”.

Τα ονόματα του πράσινου καφέ μπορεί να είναι χαρακτηριστικά του τόπου καταγωγής του. Για παράδειγμα η χώρα και το λιμάνι που εξάγεται. Σημαντικοί εξαγόμενοι καφέδες του είδους *Arabica* είναι για παράδειγμα ο Kenyan, ο Tanzanian, ο Colombian, ο Salvadorian, ο Guatemalon ή ο Mexican. Μη εξαγόμενοι καφέδες του είδους *Arabica* είναι ο ελαφρύς Santos και οι βαρύς Rio και Bahia. Οι καφέδες *robusta* που δεν εξάγονται είναι για παράδειγμα από την Αγκόλα, την Μαγαδασκάρη, την Ουγκάντα και την Ακτή του Ελεφαντοστού (Knox & Huffaker, 1997).

Οι καφέδες του είδους *Arabica* ιδιαίτερα αυτοί από την Κένυα, Κολομβία και Κεντρική Αμερική έχουν ένα απαλό, πλούσιο και καθαρό άρωμα. Ο *Arabica Santos* από την Βραζιλία είναι ένα σημαντικό συστατικό των χαρμανιών του καβουρδισμένου καφέ λόγω του ώριμου και πλούσιου αρώματός του. Ο

καφές Robusta από την άλλη είναι πιο δυνατός, αλλά τραχύς στο άρωμα (Γεράρδης, 1998).

Η ποιοτική εκτίμηση του πράσινου καφέ βασίζεται σε δοκιμές του αρώματός του και της γεύσης του, αλλά και στο μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, τη σκληρότητα και το διαγώνιο μέρος του σπόρου. Μεγάλα μειονεκτήματα ή ατέλειες οφείλονται κυρίως σε δυσάρεστα μη αρωματισμένους καρπούς, οι οποίοι απομακρύνονται με χειρονακτική διαλογή. Ελαττωματικοί σπόροι είναι κυρίως, οι αγίνωτοι σπόροι (χλωροί σπόροι) οι οποίοι κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος παραμένουν ασθενώς χρωματισμένοι, οι υπερζυμωμένοι σπόροι με την απουσία αρώματος λόγω της παρουσίας οξικού οξέος, διακετυλίου, βουτανόλης και ισοβουτανόλης, σπόροι καμένοι από το κρύο, σπασμένοι σπόροι, σπόροι που έχουν καταστραφεί από τα έντομα και τις βροχοπτώσεις και σπόροι που είναι υπερβολικά ξηροί. Ακόμα και ένας ακατάλληλος σπόρος μπορεί να καταστρέψει το μείγμα καφέ. Άλλες ατέλειες είναι το μουχλιασμένο και μπαγιάτικο άρωμα από μη ικανοποιητικά ξηραμένους και μη γινομένους σπόρους, και γεύσεις όπως αυτή του χώματος και του σανού. Οι ποικιλίες καφέ που ευδοκιμούν σε μεγάλα υψόμετρα είναι γενικά καλύτερης ποιότητας από αυτές των πεδιάδων και των χαμηλότερων υψομέτρων (Knox & Huffaker, 1997).

2.3. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

2.3.1. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ

Η συγκομιδή του καφέ λαμβάνει μέρος τους μήνες Δεκέμβριο και Φεβρουάριο στον Τροπικό του Καρκίνου, βόρεια του Ισημερινού και τους μήνες Μάιο μέχρι και τον Αύγουστο στον Τροπικό του Αιγόκερου, νότια του Ισημερινού (Belitz & Grosch, 1999).

Η ανθοφορία και η καρποφορία ακολουθούν το τόξο του χρόνου και αυτή η συνεχής φυτική δραστηριότητα απαιτεί από τους ανθρώπους μόχθο, φροντίδα και σταθερό έλεγχο. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος είναι το διαφορετικό επίπεδο ωρίμανσης στην ίδια συγκομιδή. Οι κόκκοι που δεν έχουν ωριμάσει τελείως δίνουν, όταν αναμειχθούν, ένα άρωμα πάρα πολύ έντονο και πικρό (Γεράρδης, 1998).

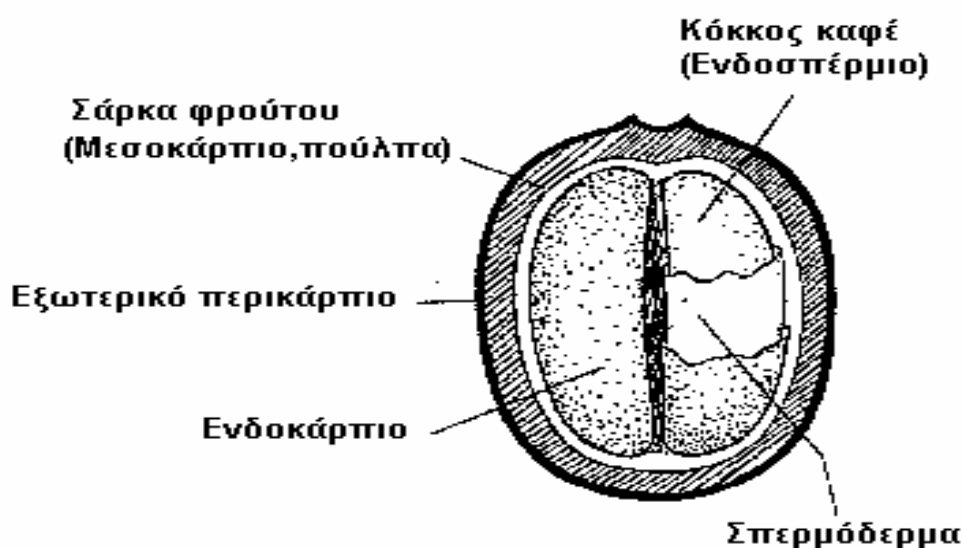
Κατά τη διάρκεια της συγκομιδής των καρπών από το καφεόδεντρο απαιτείται ιδιαίτερος χειρισμός και αυτό γιατί οι κόκκοι δεν ωριμάζουν ταυτόχρονα ακόμη και στο ίδιο δέντρο (Knox & Huffaker, 1997).

Έτσι ένας σημαντικός παράγοντας για την ιδανική ποιότητα είναι η αρχική συγκομιδή, σε σχέση με την ωρίμανση των φασολιών καφέ, που εξαρτάται από τις συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες και την επιλογή του παραγωγού (Mazzafera, 1999).

Υπάρχουν δύο τεχνικές συγκομιδής, το picking και το stripping. Στην τεχνική του picking, κατάλληλοι άνθρωποι ξεδιαλέγουν καθημερινά τους ώριμους καρπούς. Το stripping, πρακτική και γρήγορη τεχνική, συνίσταται στο να συλλέγονται οι καρποί με ένα εργαλείο που τους ξεσπειρίζει από τους μίσχους ρίχνοντας τους στη γη. Όμως με αυτόν τον τρόπο εκτός από το ότι δεν λύνεται το πρόβλημα του ξεδιαλέγματος απόλυτα, προκαλούνται και ζημιές στα φυτά (Γεράρδης, 1998).

2.3.2. ΔΙΑΒΡΟΧΗ ΚΑΙ ΞΗΡΑΝΣΗ

Μετά τη συλλογή των ώριμων καρπών του καφέ, επόμενος στόχος είναι ο διαχωρισμός των κόκκων του καρπού από τα τέσσερα στρώματα που τον περιβάλλουν και φαίνονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Φυσιολογία του καρπού του καφέ.

(Belitz & Grosch, 1999)

Δύο μέθοδοι εφαρμόζονται για αυτόν τον σκοπό που είναι η ξηρή ή αλλιώς φυσική μέθοδος και η υγρή μέθοδος (Lee, 1975).

Κατά την φυσική ή ξηρή μέθοδο, που χρησιμοποιείται κυρίως στη Βραζιλία, οι ώριμοι καρποί μεταφέρονται άμεσα σε μία κεντρική μονάδα επεξεργασίας, στην οποία οι καρποί απλώνονται σε πλατφόρμες που βρίσκονται εκτεθειμένες στο φως του ηλίου, μέχρι να συρρικνωθούν και να διαχωριστούν από την εξωτερική μεμβράνη (εξωτερικό περικάρπιο). Αφού γίνει η συρρίκνωση, ακολουθεί απομάκρυνση του εξωτερικού περικαρπίου και κάποιου μέρους του σπεροδέρματος με τη βοήθεια αποφλοιωτών (κωνικοί κοχλίες με ελικοειδές βήμα) (Belitz & Grosch, 1999). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ορισμένες φορές οι καρποί αφήνονται 3-4 ημέρες, πριν την ξήρανσή τους στον ήλιο, ώστε να ζυμωθεί η πούλπα του καρπού, προκειμένου να αποκτήσει ο καφές έντονα αρωματικά χαρακτηριστικά (Knox & Huffaker, 1997).

Κατά την υγρή μέθοδο, που χρησιμοποιείται κυρίως για τους καφέδες της ποικιλίας Arabica, οι ώριμοι καρποί συνθλίβονται μηχανικά σε ένα περιστρεφόμενο κύλινδρο που στην επιφάνειά του φέρει εγκοπές, έτσι ώστε το εξωτερικό περικάρπιο και η πούλπα να απομακρυνθούν από τον καρπό (Belitz & Grosch, 1999). Εν συνεχεία οι καρποί μεταφέρονται σε μεγάλες δεξαμενές ζύμωσης στις οποίες επιτελείται μια ελεγχόμενη ενζυματική αντίδραση που επιτρέπει την διόγκωση του καρπού και την χαλάρωση των κόκκων του καφέ που υπάρχουν στο εσωτερικό του. Αυτή η ζύμωση μπορεί να διαρκέσει από 12-36 ώρες ανάλογα με τις συνθήκες της ατμόσφαιρας και την φύση των καρπών του καφέ (Knox & Huffaker, 1997). Κατά την διάρκεια αυτής της ζύμωσης, η κολλώδης ουσία που φέρει ο καρπός, υδρολύεται από τα ένζυμα του καρπού και από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο εξωτερικό περίβλημά του και διαλύεται απευθείας με την έκπλυση των κόκκων με νερό. Τέλος, οι κόκκοι ξηραίνονται με την βοήθεια της ηλιακής ενέργειας ή με τη χρήση ζεστού αέρα (58-65°C) (Belitz & Grosch, 1999).

Συγκρίνοντας τις δύο παραπάνω μεθόδους, η ξηρή μέθοδος είναι πολύ πιο απλή σε σχέση με την υγρή, αλλά η υγρή μέθοδος, αν και πολύπλοκη, δίνει καφέ καλύτερης ποιότητας (Lee, 1975).

2.3.3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Για την ταξινόμηση των κόκκων του καφέ κατά μεγέθη, ακολουθείται η αγγλική μέθοδος η οποία τους κατατάσσει σε κατηγορίες από N°10-N°20. Ο έλεγχος του μεγέθους των κόκκων γίνεται από ειδικά κόσκινα, τα οποία είναι τοποθετημένα το ένα πάνω στο άλλο. Οι πιο χοντροί κόκκοι παραμένουν στο επάνω κόσκινο που έχει και τη μεγαλύτερη διάμετρο και οι υπόλοιποι πέφτουν μέχρι να φτάσουν στο αντίστοιχο με το μέγεθος τους κόσκινο που θα τους συγκρατήσει. Το N°10, ο μικρότερος σε μέγεθος κόκκος, είναι περίπου 4mm, ενώ το N°20 είναι 8mm. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις βρίσκονται κόκκοι ακόμα μεγαλύτερου μεγέθους οι οποίοι ονομάζονται και γίγαντες. Πιστεύεται πως η σχέση μεγέθους κόκκου και ποιότητας είναι ανάλογη, εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις, όπως του BLUE MOUNTAIN της Τζαμάικα που είναι ο ακριβότερος καφές στον κόσμο. Η περιορισμένη παραγωγή του διοχετεύεται αποκλειστικά στην Ιαπωνία.

Το μέγεθος που βρίσκει κανείς σήμερα στο εμπόριο είναι το N°17/18 (6,75-7,20mm). Έμποροι, εισαγωγείς και καφεκόπτες λένε πως οι χοντροί κόκκοι αν δεν είναι μαζεμένοι σπόρο σπόρο παρουσιάζουν πολλές πιθανότητες να έχουν προσβληθεί από σκουλήκι. Η καθαρότητα (δύναμη-οξύτητα) μίας παρτίδας καφέ καθορίζεται και από τον αριθμό των ξένων σωμάτων και των σπασμένων κόκκων σε δείγμα 300g. Το N°1 αυτής της κλίμακας χαρακτηρίζει ένα άψογο δείγμα ενώ το N°2/3 που είναι συνηθισμένο στην ελληνική αγορά περιλαμβάνει 5-10 καχεκτικούς κόκκους. Ενδεικτικά το N°6 μπορεί να είναι ένα δείγμα στο οποίο συσσωρεύονται μέχρι και 95 κόκκοι με ελαττώματα, ενώ στο N°12 θα βρεθούν γύρω στους 10 μαύρους και 12 μη αποφλοιωμένους (Γεράρδης, 1998).

Για τα δείγματα παίρνονται κόκκοι από πολλά σακιά μίας συγκεκριμένης παρτίδας με τη βοήθεια του κλέφτη. Ο κλέφτης είναι ένας σωλήνας που καταλήγει σε κυρτή, αιχμηρή λάμα με την οποία διαστέλλονται οι ίνες του σακίου χωρίς να κόβονται. Μέσα στο σωλήνα κυλούν οι κόκκοι και δειγματίζονται. Το χρώμα των κόκκων έχει μια κλίμακα χαρακτηριστικών που αρχίζει από το γαλαζωπό και καταλήγει στο ανοιχτό καφέ περνώντας από διαβαθμίσεις, όπως γαλαζοπράσινο, πράσινο, γκριζοπράσινο, κιτρινωπό κ.ά. Οι χρωματισμοί αφορούν τους κόκκους της ποικιλίας Arabica. Οι κόκκοι της

ποικιλίας Robusta εμφανίζονται από πρασινωποί προς το κίτρινο μέχρι καφετί. Στην ελληνική αγορά όλα αυτά ονομάζονται με το γενικό όρο πράσινος καφές (Knox & Huffaker, 1997).

2.3.4. ΚΑΒΟΥΡΔΙΣΜΑ

Οι χλωροί καρποί έχουν μια γήινη, φυτική μυρωδιά και γι' αυτό πρέπει να γίνει μια θερμική επεξεργασία η οποία ονομάζεται καβούρδισμα, με τη βοήθεια της οποίας θα αναδειχθεί το πραγματικό άρωμά τους. Το καβούρδισμα, σε ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 200–250°C προκαλεί έντονες αλλαγές. Ο όγκος των σπόρων αυξάνεται (50–80%) και αλλάζει η δομή και το χρώμα τους. Το πράσινο χρώμα αντικαθίσταται από το καφέ, παρατηρείται μια απώλεια βάρους της τάξεως του 13–20%, και μια σταδιακή αύξηση στην εμφάνιση του χαρακτηριστικού αρώματος των καβουρδισμένων σπόρων. Ταυτόχρονα, το ειδικό βάρος πέφτει από το 1.126–1.272g/cm³ στο 0.570–0.694g/cm³, έτσι παρατηρείται οι καβουρδισμένοι σπόροι να επιπλέουν στο νερό ενώ οι χλωροί να βυθίζονται. Οι σκληροί και άθραυστοι σπόροι γίνονται εύθραυστοι και μαλακοί μετά το καβούρδισμα.

Τέσσερις κύριες φάσεις διακρίνονται κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος που είναι το στέγνωμα, η ωρίμανση, η αποσύνθεση και τέλος το πλήρες καβούρδισμα. Οι αρχικές αλλαγές λαμβάνουν μέρος περίπου στους 50°C όταν η πρωτεΐνη στα κύτταρα των ιστών μετουσιώνεται και το νερό εξατμίζεται. Το μαύρισμα εμφανίζεται πάνω από τους 100°C κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης των οργανικών συστατικών, που συνοδεύεται από διόγκωση και μια αρχική ξηρή απόσταξη. Περίπου στους 150°C λαμβάνει χώρα μια έκλυση των πτητικών συστατικών (νερό, CO₂, CO) η οποία έχει ως αποτέλεσμα μια αύξηση στον όγκο του σπόρου. Η φάση της αποσύνθεσης, η οποία αρχίζει στους 180–200°C, είναι χαρακτηριστική γιατί οι σπόροι αναγκάζονται να σκάσουν (ανοίγουν στην εγκοπή του σπόρου), ταυτόχρονα έχουμε δημιουργία γαλαζωπού καπνού, και απελευθέρωση του αρώματος του καφέ. Τελικώς έχοντας πραγματοποιήσει άριστη καραμελοποίηση, η φάση του πλήρους καβουρδίσματος έχει επιτευχθεί, κατά τη διάρκεια της οποίας η

περιεχόμενη υγρασία των σπόρων πέφτει στο τελικό επίπεδο της τάξεως του 1.5–3.5%. Η διαδικασία του καβουρδίσματος χαρακτηρίζεται από το μετασχηματισμό των αρχικών χημικών ενώσεων σε νέες.

Η συνεχής λειτουργία της διαδικασίας καβουρδίσματος απαιτεί ικανότητα και εμπειρία για την παραλαβή ομοιόμορφου χρώματος και άριστου αρώματος, αλλά και για να ελαχιστοποιηθεί η φθορά λόγω υπερβολικού καβουρδίσματος, καψαλίσματος ή καψίματος.

Κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, η θερμότητα μεταφέρεται με την επαφή των σπόρων πάνω στα τοιχώματα της συσκευής καβουρδίσματος, ή με ζεστό αέρα ή με εύφλεκτα αέρια (μεταφορά θερμότητας). Η πρώτη περίπτωση δεν παρουσιάζει πλέον ενδιαφέρον επειδή η μεταφορά της θερμότητας δεν είναι ίση σε όλη τη μάζα του καφέ και ο χρόνος που απαιτείται είναι μεγάλος (20–30min). Στην δεύτερη και τρίτη περίπτωση (χρόνος καβουρδίσματος 6-15min) γίνονται προσπάθειες για να αυξηθεί η μεταφορά θερμότητας όσο το δυνατό περισσότερο με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων κατά τη διαδικασία. Φυγόκεντροι καβουρδιστές (περιστρεφόμενα επίπεδα ταψιά), περιστρεφόμενοι κυλινδρικοί καβουρδιστές, καβουρδιστές ρευστού στρώματος (90% μεταφορά θερμότητας) και άλλα, χρησιμοποιούνται είτε συνεχόμενα, είτε διακεκομμένα. Σε μια καινούργια διαδικασία που ονομάζεται διαδικασία σύντομου καβουρδίσματος (short-time roasting process) απαιτείται χρόνος 2–5min, και η φάση της προθέρμανσης μειώνεται σημαντικά από την καλύτερη μεταφορά θερμότητας. Η εξάτμιση του νερού προχωρά με την εκβολή ατμού, προκαλώντας έτσι μεγαλύτερη αύξηση στον όγκο του σπόρου από τις συμβατικές διαδικασίες καβουρδίσματος. Συνεπώς η πυκνότητα στη θεμελιώδη κατάσταση του καφέ που καβουρντίστηκε με αυτή τη διαδικασία είναι 15–25% χαμηλότερη.

Η διαδικασία του καβουρδίσματος ελέγχεται ηλεκτρονικά ή με τη δοκιμή καβουρντισμένων σπόρων. Το τελικό προϊόν περνάει γρήγορα σε κόσκινα για να ψυχθεί ή ψεκάζεται με νερό με σκοπό να αποφευχθεί το υπερβολικό καβούρδισμα, ή το κάψιμο και η απώλεια αρώματος. Κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, δημιουργούνται ατμοί και κυτταρικά υπολείμματα (κόκκοι σπερμοδέρματος), που απομακρύνονται είτε με αναρρόφηση με τη βοήθεια κενού είτε σε μεγαλύτερες μονάδες, με αποτέφρωση.

Ο βαθμός του επιθυμητού καβουρδίσματος διαφέρει από χώρα σε χώρα. Στις Η.Π.Α. και στην Κεντρική Ευρώπη οι σπόροι καβουρδίζονται μέχρι ενός ελαφρού χρώματος (200–220°C, 3–10min, με παρατηρούμενη απώλεια βάρους 14–17%), και στη Γαλλία, Ιταλία και χώρες των Βαλκανίων, σε ένα σκούρο χρώμα (230°C, με παρατηρούμενη απώλεια βάρους 20%) (Knox & Huffaker, 1997).

2.3.5. ΑΠΟΚΑΦΕΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Τις φυσιολογικές επιδράσεις της καφεΐνης δεν μπορούν να τις ανεχθούν όλοι οι άνθρωποι και για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές διαδικασίες για την απομάκρυνση της καφεΐνης από τον καφέ (Belitz & Grosch, 1999). Οι μέθοδοι αποκαφεϊνοποίησης είναι:

1. *Η μέθοδος Swiss Water*. Είναι μια 100% φυσική διαδικασία αποβολής της καφεΐνης από τον καφέ και χρησιμοποιεί μόνο το νερό για την αφαίρεση της καφεΐνης, παράγοντας επεξεργασμένο αποκαφεϊνοποιημένο καφέ με την χρήση νερού (Knox & Huffaker, 1997).
2. *Η παραδοσιακή-άμεση μέθοδος*. Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται θερμό νερό για την διάνοιξη των πόρων και την διόγκωση των κόκκων του καφέ. Για την απομάκρυνση της καφεΐνης χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες που είναι αρκετά εκλεκτικοί στην απομάκρυνση της καφεΐνης, καθώς και των άλλων αλκαλοειδών που εμπεριέχονται στους κόκκους του καφέ (Senol & Aydin, 2005).
3. *Η μέθοδος χρήσης υπέρθερμου ατμού υπό υψηλή πίεση*. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την αποκαφεϊνοποίηση ακαβούρδιστων κόκκων καφέ (Knox & Huffaker, 1997).
4. *Η μέθοδος χρήσης υγρού διοξειδίου του άνθρακα*. Με τη μέθοδο αυτή ο αποκαφεϊνοποιημένος καφές που παράγεται είναι καλής ποιότητας αφού οι απώλειες σε αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά είναι ελάχιστη (Gehrig & Schulmeyer, 1997).
5. *Η μέθοδος χρήσης υψηλής πίεσης*. Η υψηλή πίεση των ατμών κάτω από κανονικές συνθήκες υπόσχεται ένα προϊόν απαλλαγμένο από υπολείμματα διαλυτή (Senol & Aydin, 2005) και υψηλής ποιότητας αφού εξαλείφεται όλη

η ποσότητα της καφεΐνης χωρίς την υποβάθμιση των γευστικών και αρωματικών συστατικών του καφέ (Sebald et al., 1996).

6. *Η μέθοδος με χρήση οργανικών διαλυτών* (Belitz & Grosch, 1999).
7. *Άλλες μέθοδοι.* Άλλες μέθοδοι είναι η απομάκρυνση της καφεΐνης με ηλεκτροφόρηση, με χρήση μεμβρανών (Perez et al., 1999) και με χρήση μικροκυμάτων. Επίσης διάφορες μικροβιολογικές και ενζυμικές μέθοδοι μελετήθηκαν για την απομάκρυνση της καφεΐνης (Gokulakrishnan et al., 2005).

2.3.6. ΑΛΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

Μετά το καβούρδισμα και την αποκαΐφenoποίηση εφόσον γίνει, οι κόκκοι του καφέ ψύχονται και αλέθονται σε αλεστικές μηχανές. Εφόσον ο καφές προσδιορίζεται για μεγάλη χρονική διάρκεια συντήρησης είναι πολύ ευαίσθητος στο οξυγόνο. Για το λόγο αυτό, το υλικό συσκευασίας θα πρέπει να έχει χαμηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο ενώ και το επίπεδο του οξυγόνου μέσα στη συσκευασία θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Αυτό είναι και ο λόγος που χρησιμοποιούνται ευρύτατα θερμοσφραγιζόμενα σακουλάκια με εσωτερική επικάλυψη στρώματος αλουμινίου (Αρβανιτογιάννης κ.ά., 2001).

Εάν οι κόκκοι του καφέ έχουν προηγουμένως καβουρδιστεί τότε αυτοί απαλλάσσονται από τυχόν ελαττωματικούς σπόρους που φέρουν, είτε χειρονακτικά, είτε μηχανικά με τη βοήθεια ηλεκτρονικών αισθητήρων. Ο εμπορικά διαθέσιμος καφές αποτελείται από μίγμα 4-8 διαφορετικών ποικιλιών, οι οποίες λόγω των διαφορετικών φυσικών ιδιοτήτων που έχουν, καβουρδίζονται ξεχωριστά (Belitz & Grosch, 1999).

Ο χρόνος ζωής του καφέ εξαρτάται από την επεξεργασία του καβουρδίσματος και από την εμπορική συσκευασία του. Έτσι οι ακαβούρδιστοι κόκκοι καφέ έχουν διάρκεια ζωής 1-3 χρόνια, ενώ οι καβουρδισμένοι κόκκοι παραμένουν φρέσκοι μόνο για 8-10 εβδομάδες. Ο καφές σε συσκευασία κενού (απουσία οξυγόνου) διατηρείται για 6-8 μήνες, αλλά από τη στιγμή που θα ανοιχθεί η συσκευασία, ο χρόνος ζωής του καφέ μειώνεται σε 1-2 εβδομάδες (Charalambous, 1986).

2.4. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΦΕ

2.4.1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΙΝ ΤΟ ΚΑΒΟΥΡΔΙΣΜΑ ΤΟΥ ΚΑΦΕ

Η σύσταση των ακαβούρδιστων κόκκων καφέ εξαρτάται από την ποικιλία, την καταγωγή και το κλίμα. Μια σύνοψη αυτών των μεταβλητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 (Belitz & Grosch, 1999).

Πίνακας 1 . Χημική σύσταση ακαβούρδιστων κόκκων (% επί ξηρού).

| <u>Συστατικά</u> | <u>Εύρος περιεκτικότητας %</u> |
|------------------------|--------------------------------|
| Υδατοδιαλυτά συστατικά | 29.0-36.2 |
| Υγρασία | 5.0-12.1 |
| Πρωτεΐνες | 8.7-12.2 |
| Λιπίδια | 8.3-17.0 |

(Belitz & Grosch, 1999)

2.4.2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑ ΤΟ ΚΑΒΟΥΡΔΙΣΜΑ ΤΟΥ ΚΑΦΕ

2.4.2.1. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες υπόκεινται εκτεταμένες αλλαγές κατά την θέρμανση, παρουσία υδρογονανθράκων. Παρατηρείται μια αλλαγή στη σύσταση των αμινοξέων μετά το καβούρδισμα. Τα βασικά αμινοξέα κυρίως αλανίνη, γλουταμινικό οξύ και λευκίνη παρουσιάζουν αύξηση στον καβουρδισμένο καφέ ενώ αμινοξέα όπως αργινίνη, ασπαρτικό οξύ, κυστίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, σερίνη, θρεονίνη και μεθειονίνη μειώνονται σε κάποιο βαθμό. Επίσης ίχνη ελεύθερων αμινοξέων εμφανίζονται στον καβουρδισμένο καφέ (Belitz & Grosch, 1999; Lee, 1975).

2.4.2.2. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Οι περισσότεροι υδατάνθρακες που εμπεριέχονται στον ακαβούρδιστο καφέ, όπως κυτταρίνη και πολυσακχαρίτες είναι μη υδατοδιαλυτοί. Όμως κατά την διάρκεια του καβουρδίσματος ένα μέρος των πολυσακχαριτών διασπάται σε μικρότερα μόρια τα οποία είναι διαλυτά στο νερό (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.3. ΛΙΠΙΔΙΑ

Ο ακαβούρδιστος καφές περιέχει λιπίδια, όπως τριγλυκερίδια (75%), στερόλες (σιγμαστερόλη, σιτοστερόλη), λιπαρά οξέα (λινολειακό, λινολενικό, ολειακό, παλμιτικό, στεατικό, μπεχενικό) και πεντακυκλικά διτερπένια (μεθυλκαφεστόλη, καφεστόλη, καχγεόλη). Η δομή των λιπιδίων εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα κατά το καβούρδισμα (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.4. ΟΞΕΑ

Τα περισσότερα οξέα που περιέχονται στον καφέ ανήκουν στην κατηγορία των χλωρογενικών οξέων. Κατά την διάρκεια του μέτριου καβουρδίσματος αποικοδομείται περίπου το 30% ενώ κατά τη διάρκεια παρατεταμένου καβουρδίσματος το ποσοστό αποικοδόμησης μπορεί να φτάνει μέχρι και 70% (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.5. ΚΑΦΕΪΝΗ

Η περιεκτικότητα της καφεΐνης στους ακαβούρδιστους κόκκους καφέ της ποικιλίας Arabica είναι 0.8-2.5% ενώ της ποικιλίας Robusta το ποσοστό μπορεί να φτάσει μέχρι και 4%. Κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος το ποσοστό αυτό μειώνεται ελάχιστα. Έτσι το ποσοστό καφεΐνης για την ποικιλία Arabica μειώνεται στο 1.2% (Belitz & Grosch, 1999) και για την ποικιλία Robusta στο 2% (Lee, 1975).

2.4.2.6. ΤΡΥΓΟΝΕΛΛΙΝΗ, ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

Η τρυγονελλίνη (N-μεθυλονικοτινικό οξύ) υπάρχει στον ακαβούρδιστο καφέ σε ποσοστό 0.6% και το 50% αυτού αποσυντίθεται κατά το καβούρδισμα. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης περιλαμβάνουν νικοτινικό οξύ, πυριδίνη, 3-μέθυλο πυριδίνη, νικοτινικό οξύ μεθυλικού εστέρα και μια σειρά άλλων ενώσεων (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.7. ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η ομάδα των αλυφατικών ενώσεων περιλαμβάνει υδατάνθρακες, αλκοόλες και, κυρίως, καρβονυλικές ενώσεις οι οποίες παράγονται κατά το καβούρδισμα από τη διάσπαση των υδατανθράκων. Επίσης συναντούμε αρκετές αλικυκλικές ενώσεις όπως για παράδειγμα κυκλοπεντανόνη, κυκλοπέντε-2-όνη, κυκλοξάν-2-όνη, κυκλοπεντανιδιόνη-(1,2) και κυκλοεξανοδιόνη-(1,2).

Οι φαινόλες είναι οι επικρατέστερες στις αρωματικές ενώσεις και το πιο πιθανό είναι να παραλαμβάνονται από τη θερμική διάσπαση των χλωρογενικών οξέων. Φαινολικοί αιθέρες, καρβονύλια, εστέρες και πολυκυκλικές ενώσεις βρίσκονται επίσης.

Υπάρχει μεγάλος αριθμός ετεροκυκλικών ενώσεων, που ανάμεσά τους υπάρχουν πολλά 2- και 2,5-υποκατάστατα φουρανίου, τα οποία πιθανότατα προκύπτουν από την πυρόλυση της σακχαρόζης και άλλων σακχάρων. Επίσης βρίσκουμε πολλές πυρρόλες, πυραζίνες, θειοφίνες, θειαζόλες και οξαζόλες.

Αναλύσεις αρώματος του εκχυλίσματος (Aroma Extract Dilution Analyses) έδειξαν ότι από το μεγάλο μέρος των πτητικών ενώσεων μόνο οι 28 είναι ενεργές ως προς την οσμή και συμβάλουν σημαντικά στην οσμή και τη γεύση του καφέ. Αυτό το κομμάτι αποτελείται από 18 ενώσεις για τον καβουρδισμένο καφέ Arabica και Robusta, συν ακεταλδεΐδες, προπανάλη, μεθυλοπροπανάλη, 2- και 3-μεθυλοβουτανάλη, 2-μεθυλ-3-φουρανθιόλη, μεθανεθιόλη, διμέθυλο τρισουλφίδιο, 2-αιθενυλ-3,5-διμεθυλ-πυραζίνη και 2-αιθενυλ-3-αιθυλ-5-μεθυλ-πυραζίνη. Βασικό συστατικό του αρώματος είναι οι 2-φουρφοουλοθιόλη, 3-μεθυλ-2-βουτανοθιόλη και ο 3-μερκαπτο-3-μεθυλβουτυλομυρμηκικός εστέρας που είναι υπεύθυνοι για την καβουρδισμένη/θειούχα αίσθηση στον καφέ. Η γήινη/καβουρδισμένη αίσθηση μπορεί να προκαλείται από τις πυραζίνες, η εντύπωση της μυρωδιάς της καραμέλας από τις φουρανόνες και η φαινολική/καπνιστή μυρωδιά από την γουαϊκόλη και την 4-βινυλγουαϊκόλη.

Ο καφές Robusta διαφέρει πολύ από τον Arabica έχοντας χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις μεθιονάλη, 2-ισοβουτυλ-3-μεθοξυπυραζίνη, 4-υδροξύ-2,5-διμεθυλ-3(2H)-φουρανόνη και 2,3-πενταδιόνη αλλά και μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις των αλκυλ-πυραζινών, γουαϊκόλης, 4-αιθυλγουαϊκόλη και 4-βινυλγουαϊκόλη.

Το άρωμα του καφέ δεν παραμένει σταθερό, η αίσθηση της φρεσκάδας χάνεται γρήγορα. Οι πολύ πτητικές αρωματικές ουσίες μεθανεθιόλη και 2,3-πενταδιόνη είναι κατάλληλοι δείκτες της φρεσκάδας (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.8. ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στον καφέ είναι το κάλιο (1.1%), το ασβέστιο (0.2%) και το μαγνήσιο (0.2%). Πολλά άλλα στοιχεία υπάρχουν σε ποσότητες που δεν μπορούν να ανιχνευθούν (Belitz & Grosch, 1999).

2.4.2.9. ΑΛΛΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα μελανοειδή, ενώσεις καφέ χρώματος, βρίσκονται στο διαλυτό μέρος του καβουρντισμένου καφέ. Παραλαμβάνονται από αντιδράσεις Maillard ή καρμελοποίηση των υδρογονανθράκων. Οι δομές αυτών των ενώσεων δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα. Προφανώς, το χλωρογενικό οξύ παίρνει και αυτό μέρος σε τέτοιες αντιδράσεις αμαύρωσης αφού το καφεϊκό οξύ έχει αναγνωριστεί στις αλκάλι-υδρολυσάτες των μελανοειδών.

Δευτερογενή προϊόντα από τη θερμόλυση των μειγμάτων των υδρογονανθράκων και των πρωτεϊνών πιθανότατα να συμμετέχουν στην δημιουργία της πικρής γεύσης στον καβουρδισμένο καφέ. Το παραπάνω έχει αποδειχθεί σε συστήματα μοντέλων μειγμάτων σακχάρων και αμινοξέων. Ιδιαίτερα έντονες πικρές γεύσεις παραλαμβάνονται με τη συνθέρμανση σακχαρόζης και προλίνης. Εκχύλισμα καβουρδισμένου καφέ διαχωρίστηκε από χρωματογραφία gel σε κλάσματα με γεύση καφέ. Αυτά τα κλάσματα περιέχουν υδρογονάνθρακες, αμινοξέα και τρυγονελλίνη (Belitz & Grosch, 1999).

2.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ

2.5.1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξειδωση των συστατικών των τροφίμων (Μπόσκος, 1997) επειδή έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών (οι σημαντικότερες είναι μορφές οξυγόνου που έχουν υποστεί μερική αναγωγή) με δύο βασικούς μηχανισμούς, (1) μεταφέροντας και προσφέροντας υδρογόνο και (2) προσφέροντας μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί λειτουργούν σχεδόν παράλληλα και με κυριαρχία του ενός ή του άλλου μηχανισμού (Prior et al., 2005).

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης (‘‘ελεύθερης’’) ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς και ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Αρχικά δημιουργείται με κάποιο τρόπο μία ελεύθερη ρίζα (έναρξη). Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξειδωσης είναι τα υδρουπεροξειδία. Αυτά στην συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδρουπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογιοανθρακικό τμήμα του μορίου (διάδοση). Με τον τρόπο αυτό οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές αναγεννώντας συνέχεια νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η αντίδραση θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες. Η Αλληλουχία των αντιδράσεων μπορεί να παραταθεί ως εξής:

Έναρξη: $R\cdot$ (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση: $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ (ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO\cdot + RH\cdot \rightarrow ROOH + R\cdot$

$ROOH + RH\cdot \rightarrow RO\cdot$

Τερματισμός: $R\cdot + R\cdot \rightarrow R-R$

$ROO\cdot + R\cdot \rightarrow ROOR$

$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR + O_2$

Τα τελευταία είναι αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν έναρξη ή

διάδοση της αντίδρασης.

Με βάση των ανωτέρω μηχανισμό πιστεύεται ότι επιτελείται η αυτοξειδωση των λιπών και ελαίων, δηλαδή η αντίδρασή τους με το οξυγόνο.

Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι αρωματικές ενώσεις, που διαθέτουν μια τουλάχιστον ελεύθερη υδροξυλική ή αμινική ομάδα. Οι σημαντικότερες ενώσεις που προστίθενται στα τρόφιμα ανήκουν στις πολυκυκλικές φαινόλες με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Μπόσκος, 1997).

Γενικά η τάξη των αντιοξειδωτικών των τροφίμων περιέχει τις ενώσεις εκείνες που εμποδίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, που σχετίζονται με την οξείδωση των λιπιδίων.

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τους σταθεροποιητές και συμπλοκοποιητές. Τα μίγματα αυτά συντελούν στην ενεργοποίηση και την βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης, στη διερεύνηση της εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σε περισσότερες κατηγορίες τροφίμων, καθώς και στην ευκολότερη χρησιμοποίησή τους (Packer & Colman., 1999).

2.5.2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

➤ Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

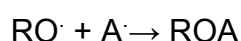
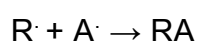
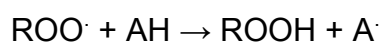
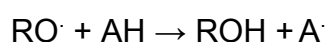
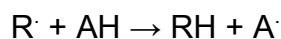
- **Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά:**

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι φαινολικές ενώσεις. Παραδείγματα πρωτογενών αντιοξειδωτικών αποτελούν η ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η ΤΒΗQ (δι-τριπ-βουτυλουδροκινόνη), ο ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φυσικές και συνθετικές τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά. (Γάλαρης και Δούλιας, 2001).

Όσον αφορά στα φαινολικά αντιοξειδωτικά δρουν μέσω του μηχανισμού ελεύθερων ριζών. Αντιδρούν με αυτές και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν

την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Η δράση τους αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό λέγεται συνέργεια ή συνεργισμός ή συνεργιστική δράση (Μπόσκος, 1997).

Συνοπτικά ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δίνεται με τις παρακάτω αντιδράσεις:



(Roberfroid & Calderon, 1990)

- **Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά:**

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κάποιες ομάδες αντιοξειδωτικών με διαφορετικές ιδιότητες και είναι:

1. Ενώσεις που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα (συνεργιστικές ενώσεις). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως αυτά του χαλκού και του σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύουν σωματίδια που δρουν ως εκκινητές της οξείδωσης. Παραδείγματα αποτελούν το κιτρικό οξύ, τα αμινοξέα, το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), κ.ά. Ωστόσο για να εκδηλωθεί η αντιοξειδωτική τους δράση, πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό (Roberfroid & Calderon, 1990).
2. Ενώσεις που απομακρύνουν το οξυγόνο. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με το οξυγόνο οπότε, σχηματίζοντας ενώσεις με αυτό, εμποδίζουν την αντίδρασή του με τα λιπίδια που αποτελεί έναρξη της αυτοοξείδωσης. Την ικανότητα αυτή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), ο παλμιτικός του εστέρας, το ερυθροβικό οξύ και τα άλατά του με νάτριο, κ.ά. (Pokorny et al., 2001).
3. Τα αναγωγικά, τα οποία αναγεννούν φαινόλες και εμφανίζουν το φαινόμενο του συνεργισμού. Το ασκορβικό οξύ, με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (για να είναι λιποδιαλυτό) πιστεύεται ότι αναγεννά τα φαινολικά

αντιοξειδωτικά, παρέχοντας υδρογόνο στις φαινόξυ-ρίζες και έτσι έχει μία έμμεση δράση ως αντιοξειδωτικό. Ως, αναγωγικό, το ασκορβικό οξύ μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες, που σχηματίζονται στην ενζυμική αμαύρωση των φαινολικών ουσιών και αυτό παρέχει μία προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών.

4. Οι αποσβεστές διηγερμένου (singlet) οξυγόνου, οι οποίοι απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο. Εδώ ανήκουν οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο.
5. Ένζυμα. Αυτά δρουν είτε απομακρύνοντας το εν διαλύσει οξυγόνο, είτε απομακρύνοντας συστατικά του τροφίμου που είναι ευοξειδωτα. Παραδείγματα για την κατηγορία αυτή αποτελούν αντίστοιχα η οξειδάση της γλυκόζης, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Roberfroid & Calderon, 1990).
6. Η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια.
7. Τέλος σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση. Τέτοια είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard (Μπόσκος, 1997).

➤ Τα αντιοξειδωτικά με βάση τη προέλευσή τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες :

• **Φυσικά αντιοξειδωτικά:**

Η πλειοψηφία των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις τοκοφερόλες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα.

Οι τοκοφερόλες είναι η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία. Διακρίνονται σε δύο ομάδες, τις τοκοφερόλες (Toc) και τις τοκοτριενόλες (Toc-3). Η κάθε ομάδα περιλαμβάνει τέσσερα ομόλογα, δηλαδή α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη και αντίστοιχα α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλη (Pokorny et al., 2001). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από το α- ομόλογο προς το δ-, εν αντιθέσει με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται (Γάλαρης & Δούλιας, 2001).

- **Συνθετικά αντιοξειδωτικά:**

Τα αντιοξειδωτικά αυτά συντίθενται βιομηχανικά. Πολλά από αυτά, αν και παρουσιάζουν ακόμη και έντονη αντιοξειδωτική δράση, δεν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, λόγω των αρνητικών επιπτώσεών τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συνθετικά αντιοξειδωτικά, που επιτρέπονται ως πρόσθετα τροφίμων είναι το BHT, το BHA, το Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E), το TBHQ και το PG (Pokorny et al., 2001).

Στις μέρες μας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά μέσα χρησιμοποιούνται σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας. Στην κατηγορία των τροφίμων και των ειδών διατροφής τα αντιοξειδωτικά επιβραδύνουν την αυτοξείδωση των λιπών και προστατεύουν μ'αυτόν τον τρόπο την επιβλαβή επίδραση του οξυγόνου στα λίπη, τα καροτινοειδή, τις λιποδιαλυτές βιταμίνες A και E και σ' άλλα συστατικά των τροφίμων.

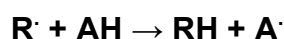
Οι συστηματικές έρευνες έχουν οδηγήσει στη διατύπωση των βασικών αρχών, που διέπουν την εφαρμογή των αντιοξειδωτικών ουσιών στη βιομηχανία των τροφίμων. Γενικά, οι ουσίες αυτές δρουν ως σταθεροποιητές της διατροφικής και φυσικής αξίας των προϊόντων. Ασφαλώς δεν χρησιμοποιούνται για την αναβάθμιση της ποιότητας στις πρώτες ύλες ή κατά τα στάδια της επεξεργασίας και συντήρησης των τελικών προϊόντων (Packer & Colman, 1999).

2.5.3. Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

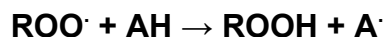
Η δράση των αντιοξειδωτικών στηρίζεται στην απομάκρυνση ή την εξουδετέρωση των ROO[·] και R[·] ελεύθερων ριζών και σε ορισμένες περιπτώσεις στη πλήρη αναστολή της οξείδωσης (στα σουλφονικά, στη διάσπαση από τα υπεροξειδία). Επειδή τα περισσότερα αντιοξειδωτικά δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις, επιταχύνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών ROO[·] και R[·], με τη δημιουργία μιας ανενεργού και αντιοξειδωτικής ελεύθερης ρίζας (Roberfroid & Calderon 1990).

Η ανενεργοποίηση και η αναστολή της δράσης της ελεύθερης ρίζας συντελεί στην άρση της αλυσιδωτής αντίδρασης και στην παραγωγή σταθερών προϊόντων, μέσω διμερισμού. Η άμεση αντίδραση του αντιοξειδωτικού (AH) μ' ένα υπόστρωμα ελεύθερης ρίζας R[·], δίνεται από την

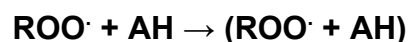
αντίδραση :



Και φαίνεται να μην έχει την παραμικρή σχέση με την αντίδραση του αντιοξειδωτικού με την ελεύθερη ρίζα ενός υπεροξειδίου ROO:



Με τον ίδιο μηχανισμό δημιουργείται και ένα σύμπλοκο μεταξύ του μορίου του αντιοξειδωτικού και της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου:



Που μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες και να οδηγήσει στην αναστολή της οξειδωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις (μερική πίεση ατμοσφαιρικού οξυγόνου-θερμοκρασία δωματίου) διασπάται η αλυσίδα της ελεύθερης ρίζας και έχουμε σύγκρουση δύο ελεύθερων υπεροξειδικών ριζών:



Επιγραμματικά αποδεικνύεται, πως όλοι οι αναστολείς της οξειδωσης πρέπει αφενός να είναι ενεργοί, ώστε να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες και να διασπασούν την αλυσίδα και αφετέρου μεταφορικά ενεργά, για να αποφευχθεί η άμεση αντίδραση του οξυγόνου με την ανταλασσόμενη ελεύθερη ρίζα. Η μεγάλη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις κατά τη φάση της διάδοσης, μπορεί για παράδειγμα να οδηγήσει στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ως μεταφορέων και κατά συνέπεια στη δράση τους ως προοξειδωτικών.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθιστούν ολοφάνερο πως η προσθήκη των αντιοξειδωτικών πρέπει να γίνεται πολύ πριν από το στάδιο της προαγωγής (διάδοση). Αν όμως στο υπόστρωμα αυξηθεί η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, τότε το προστιθέμενο αντιοξειδωτικό ανταποκρίνεται γρήγορα και θα καταναλωθεί, οπότε είναι πλέον αδύνατο να επιβραδυνθεί με παρεμβολή η πρόοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης (Μπόσκος, 1997).

2.6. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι μία πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Παπαγεωργίου, 2005).

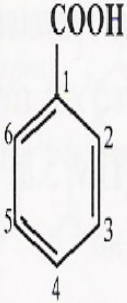
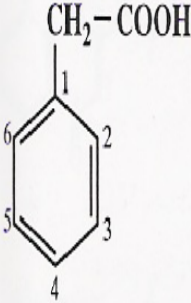
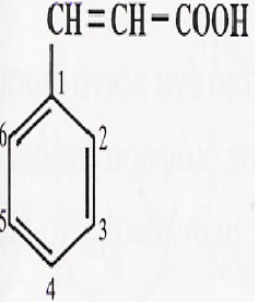
2.6.2. ΔΟΜΗ – ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η δομή των φαινολικών ενώσεων ποικίλει και έτσι μπορούμε να συναντήσουμε απλές φαινολικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα με έναν ανθρακικό σκελετό 6 ατόμων άνθρακα, μέχρι σύνθετες φαινολικές ενώσεις αποτελούμενες από πολυμερισμένα μόρια όπως είναι οι ταννίνες.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στον φαινολικό δακτύλιο και ανάλογα με την δομή του ανθρακικού σκελετού κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή, στα στυλβένια και τις λιγνάνες (Manach et al., 2004).

2.6.2.1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την δεύτερη πιο διαδεδομένη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, τα οποία ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα (Manach et al., 2004). Στην τάξη αυτή ανήκουν τα υδροξυ-παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, τα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος και τα παράγωγα του κινναμωνικού οξέος. Κυριότερος αντιπρόσωπος των παραγώγων αυτών είναι το καφεϊκό οξύ, που βρίσκεται στον καφέ εστεροποιημένο με την 5-OH του κινικού οξέος και ονομάζεται χλωρογενικό οξύ (Παπαγεωργίου, 2005). Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα είναι και το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το σιναπτικό οξύ (Manach et al., 2004). Στο Σχήμα 2 δίνεται η δομή των φαινολικών οξέων (Παπαγεωργίου, 2005).

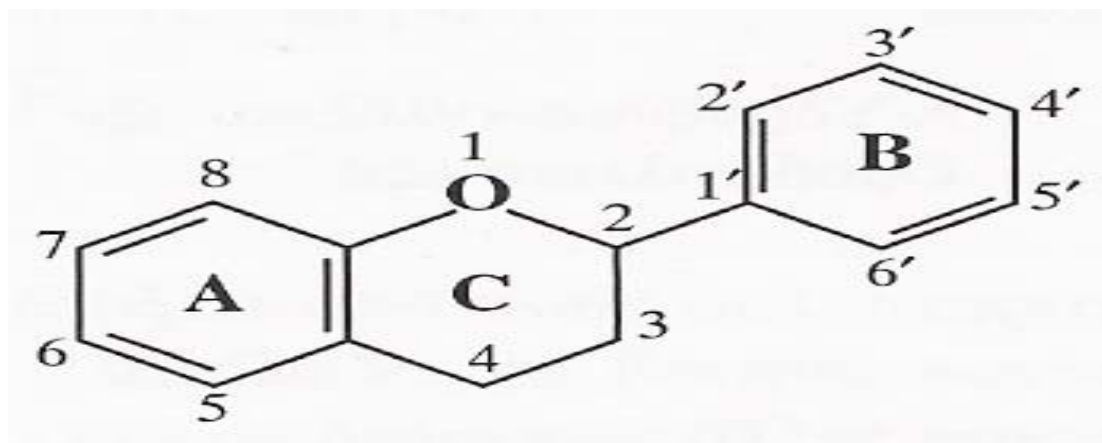
| Γενική δομή | Υδροξυ-παράγωγα | Υποκαταστάτης |
|--|---|---|
|  <p>Βενζοϊκό οξύ</p> | <p>Υδροξυβενζοϊκό οξύ Βανιλλικό οξύ Συρινγικό οξύ Πρωτοκατεχικό οξύ Γαλλικό οξύ</p> | <p>4-OH 4-OH, 3-OCH₃ 4-OH, 3,5-OCH₃ 3,4-OH 3,4,5-OH</p> |
|  <p>Φαινλοξικό οξύ</p> | <p>π-Υδροξυφαινλοξικό οξύ Ομοβανιλλικό οξύ</p> | <p>4-OH 4-OH, 3-OCH₃</p> |
|  <p>Κινναμωμικό οξύ</p> | <p>ο-Κουμαρικό οξύ π-Κουμαρικό οξύ Καφεϊκό οξύ Φερουλικό οξύ Σιναπικό οξύ Χλωρογενικό οξύ Ροσμαρινικό οξύ</p> | <p>2-OH 4-OH 3,4-OH 4-OH, 3-OCH₃ 4-OH, 3,5-OCH₃ Εστέρας του καφεϊκού με κινικό οξύ Διμερές του καφεϊκού οξέος</p> |

Σχήμα 2. Δομή των φαινολικών οξέων.

(Παπαγεωργίου, 2005)

2.6.2.2. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

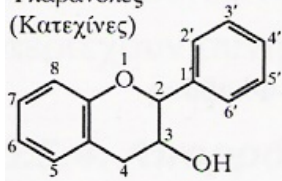
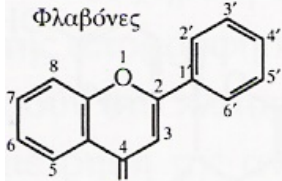
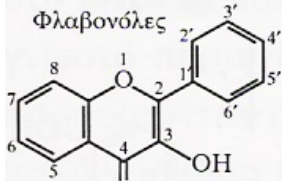
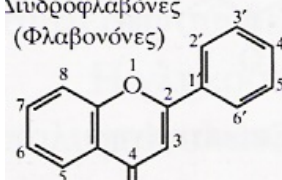
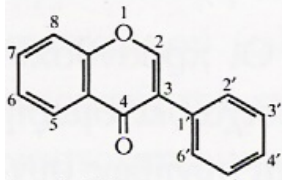
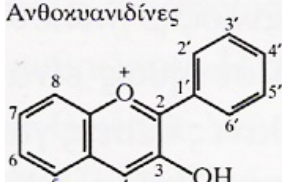
Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων (Manach et al., 2004). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν φαινολικά υδροξύλια συνδεδεμένα στους δακτύλιους A, B και C (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Γενική δομή των φλαβονοειδών.

(Παπαγεωργίου, 2005)

Η τάξη των φλαβονοειδών αποτελείται από τις παρακάτω οικογένειες: φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες και προανθοκυανιδίνες που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Heim et al., 2002). Όλες οι οικογένειες των φλαβονοειδών προέρχονται από ένα κοινό βιοσυνθετικό δρόμο. Επιπλέον μετατροπές γίνονται σε διάφορα στάδια με αποτέλεσμα μεταβολές στην έκταση της υδροξυλίωσης, της μεθυλίωσης, το διμερισμό και τη γλυκοσυλίωση. Στις φλαβονόλες ανήκει και η κερκετίνη που είναι η κυριότερη φλαβονόλη στη διατροφή μας και βρίσκεται και στον καφέ. Στον καφέ βρίσκεται και η μυρικετίνη. Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι μονομερή, διμερή ή ολιγομερή. Οι πολυμερείς ενώσεις ονομάζονται ταννίνες και ανάλογα με τη δομή τους διαχωρίζονται σε συμπυκνωμένες και υδρολυόμενες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή των φλαβονοειδών, ενώ οι υδρολυόμενες περιέχουν συνήθως γαλλικό οξύ εστεροποιημένο με υδατάνθρακα (Παπαγεωργίου, 2005). Στο Σχήμα 4 δίνεται η δομή των φλαβονοειδών (Heim et al., 2002).

| Γενική δομή | Φλαβονοειδές | Υποκαταστάτες |
|--|---|--|
| Φλαβανόλες (Κατεχίνες)  | (+)-Κατεχίνη (-)-Επικατεχίνη 3-Γαλλοϋλο-επι- κατεχίνη | 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3- γαλλικό |
| Φλαβόνες  | Χρυσίνη Απιγενίνη Λουτεολίνη 4',7-διγλυκοσίδιο- λουτεολίνης | 5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-OH 5,4'-OH, 4',7- γλυκόζη |
| Φλαβονόλες  | Καμφερόλη Κερκετίνη Μυρικετίνη Ταμαριξετίνη | 3,5,7,4',-OH 3,5,7,3', 4',-OH 3,5,7,3', 4',5',-OH 3,5,7,3',-OH, 4'-OCH ₃ |
| Λυδροφλαβόνες (Φλαβονόνες)  | Ναρινγενίνη Ναρινγίνη Ταξιφολίνη Εσπεριδίνη | 5,7,4'-OH 5, 4'-OH, 7-ραμνογλυκόζη 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH |
| Ισοφλαβόνες  | Γενιστίνη Γενιστεΐνη Δαϊδζίνη Δαϊδζεΐνη | 5,4'-OH, 7-γλυκόζη 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-γλυκόζη 7,4'-OH |
| Ανθοκυανιδίνες  | Απιγενιδίνη Κυανιδίνη | 5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH, 3,5-OCH ₃ |

Σχήμα 4. Δομή των φλαβονοειδών.

(Heim et al., 2002)

2.6.2.3. ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

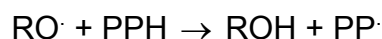
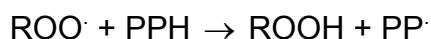
Τα στιλβένια δεν είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτικά τρόφιμα. Απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Το πιο κοινό είναι η trans-ρεσβερατρόλη, η οποία έχει απομονωθεί από το κρασί και το φλοιό των κόκκινων ποικιλιών του σταφυλιού και έχει πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων (Manach et al., 2004).

2.6.2.4. ΛΙΓΝΑΝΕΣ

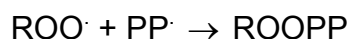
Οι λιγνάνες ενώ έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο πλάσμα όσο και από ανθρώπινα ούρα, στα τρόφιμα τα συναντάμε σε μικρά ποσοστά. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες που είναι γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων (Manach et al., 2004).

2.6.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Τα φαινολικά οξέα λειτουργούν ως ουσίες που τερματίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και σαν χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων είναι ικανά να καταλύουν την υπεροξειδάση των λιπιδίων. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (PPH) εμπλέκονται στην οξειδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων με το να δίνουν ταχύτατα ένα άτομο υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες (ROO·, RO·) όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Επιπλέον, τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας είναι σχετικά σταθερά και συνεπώς δεν μπορεί εύκολα να ξεκινήσει μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Τα ενδιάμεσα της φαινόξυ-ρίζας δρουν επίσης ως οι ουσίες που τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:



Ωστόσο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, υψηλό pH, παρουσία σιδήρου) τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εκκινήσουν μια πορεία αυτοξειδωσης και να συμπεριφερθούν ως προοξειδωτικά (Shahidi & Wanasundara, 1992).

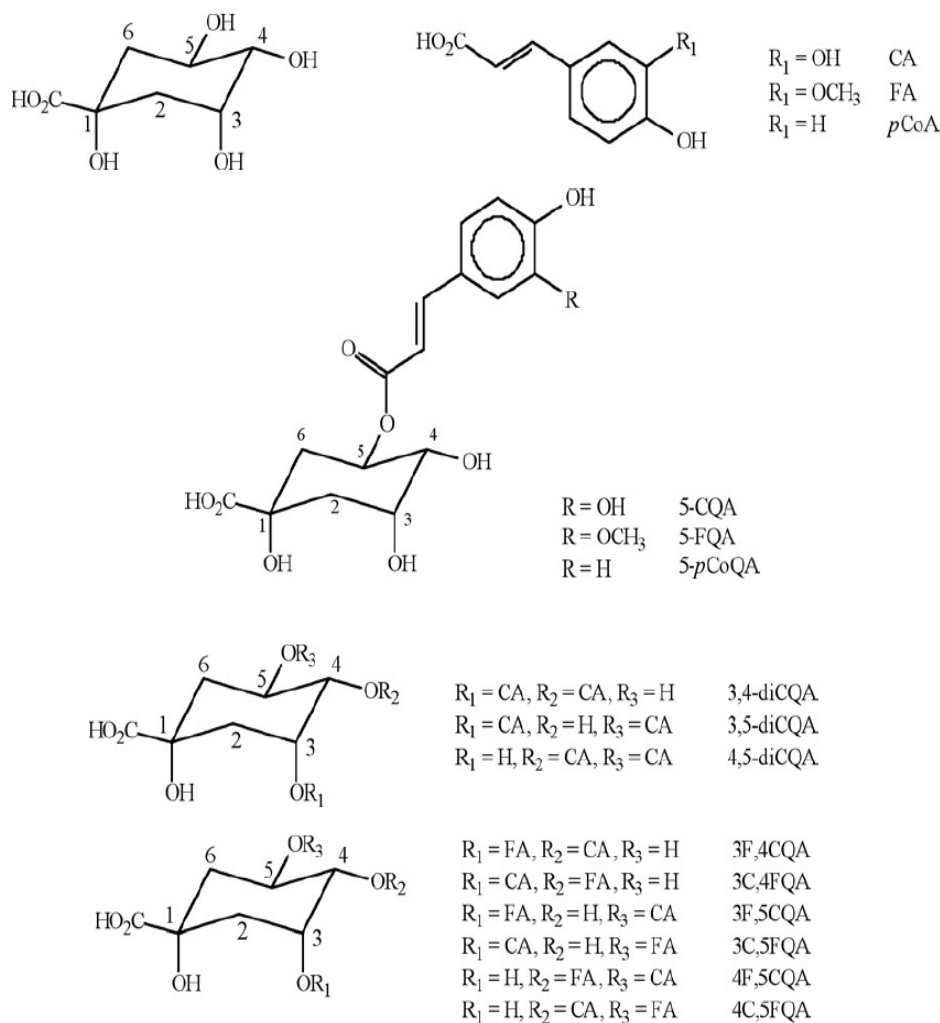
Η ικανότητα των πολυφαινολών ως αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χημική τους δομή. Η φαινόλη η ίδια είναι ανενεργή σαν αντιοξειδωτικό, αλλά τα ορθο- και παρα- διαφαινολικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αυξάνει με την αντικατάσταση ατόμων με αιθυλ- ή η-βουτυλ-ομάδες (Shahidi & Wanasundara, 1992).

Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική δράση.

1. Μία ο-διαφαινολική ομάδα στο δακτύλιο B, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων.
2. Έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξο δράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από τον B δακτύλιο και
3. Υδροξυλάσες στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξο δράση στους A και C δακτύλιους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (Ratty & Das, 1988)

2.7. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΤΟΝ ΚΑΦΕ

Στον καφέ υπάρχουν φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις (Borelli et al., 2002). Τα χλωρογενικά οξέα αποτελούν τις κύριες φαινολικές ουσίες, που υπάρχουν στον κόκκο του καφέ, και περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες ενώσεων. Τα συγγενικά ισομερή του χλωρογενικού οξέος σχηματίζονται από εστεροποίηση ενός μορίου κινικού οξέος και ένα με τρία μόρια ενός συγκεκριμένου trans-υδροξυ-κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ, το φερρουλικό οξύ και το κουμαρικό οξύ, τα οποία είναι τα πιο κοινά στον καφέ. Οι κύριες ομάδες χλωρογενικού οξέος που υπάρχουν στον καφέ παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Χλωρογενικά οξέα και συγγενικές ενώσεις.

(Farah & Donangelo, 2006)

Αυτές οι ομάδες των ενώσεων περιλαμβάνουν καφεοϋλκινικά οξέα, δι-καφεοϋλκινικά οξέα, φερρουοϋλκινικά οξέα, π-κουμαροϋλκινικά οξέα, και 6 σύμπλοκα διεστέρων των καφεοϋλφερρουοϋλκινικών οξέων.

Η ολική σύσταση σε χλωρογενικά οξέα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος, την καλλιέργεια, τον βαθμό ωρίμανσης, τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού του καφέ καθώς και το κλίμα. Γενικά, οι τιμές των ολικών χλωρογενικών οξέων στον καφέ που αναφέρονται στην βιβλιογραφία κυμαίνονται από 4-8.4% στον *Coffea arabica*, έως 7-14.4% στον *Coffea canephora*.

Στο περικάρπιο και στην σάρκα του σπόρου του καφέ οι κύριες φαιολικές ενώσεις είναι οι ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες βρίσκονται σε ποσό 0.8-2.8%. Μικρά ποσά συμπυκνωμένων ταννινών ανιχνεύονται στην σάρκα. Η

επεξεργασία της σάρκας με αλκάλια και η αποθήκευση της αποξηραμένης σάρκας προκαλεί σημαντική μείωση την σύσταση του καφέ σε ταννίνες (-39% ανά χρόνο) (Farah & Donangelo, 2006).

Άλλες φαινολικές ενώσεις στον καφέ είναι η κερκετίνη και η μυρικετίνη που ανήκουν στις φλαβονόλες και οι προανθοκυανιδίνες (Παπαγεωργίου, 2005).

Στον καφέ εκτός από τα φυσικά αντιοξειδωτικά που αντιπροσωπεύονται κυρίως από φαινολικές ενώσεις, ανιχνεύονται και άλλα αντιοξειδωτικά όπως τα μελανοειδή, που είναι ενώσεις καφέ χρώματος.

Τα μελανοειδή τα οποία βρίσκονται στο διαλυτό μέρος του καβουρδισμένου καφέ αποτελούν προϊόντα της αντίδρασης Maillard μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και επηρεάζουν το χρώμα και το άρωμα του καφέ (Lopez-Galilea et al., 2006; Cammerer & Kroh, 2006). Τα μελανοειδή είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ροφήματος του καφέ και είναι υπεύθυνα για τη ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και τη ικανότητα δέσμευσης μετάλλων που έχει το ρόφημα του καφέ (Borrelli et al., 2002). Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας οφείλεται κυρίως σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Cammerer & Kroh, 2006).

Ένα άλλο κύριο συστατικό του καφέ, η καφεΐνη, έχει αντιοξειδωτική ικανότητα και ραδιοπροστατευτική επίδραση στους ιστούς (Lee et al., 2000), Αντίθετα με το χλωρογενικό οξύ, η καφεΐνη ταχύτατα και αποτελεσματικά απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό και στην συνέχεια μεταβολίζεται στο ήπαρ (Crews et al., 2001), και παράγονται διμέθυλξανθίνες και μεθυλουρικό οξύ τα οποία θεωρούνται αντιοξειδωτικά (Lee et al., 2000; Crews et al., 2001).

Άλλα αντιοξειδωτικά του καφέ θεωρούνται και οι τοκοφερόλες (α,β,γ) μαζί με τις τοκοτριενόλες (Gonzalez, 2001).

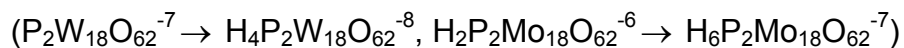
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ουσιών του καφέ μειώνεται λόγω της θερμικής του επεξεργασίας αλλά εξαιτίας των σχηματιζόμενων προϊόντων από την αντίδραση Maillard η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του καφέ διατηρείται ή ακόμη και ενισχύεται. (Lopez-Galilea et al., 2006; Cammerer & Kroh, 2006; Borrelli et al., 2002).

2.8. ΚΥΡΙΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

2.8.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN-CIOCALTEU

Είναι μία φωτομετρική τεχνική που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα και βασίζεται στην <<αναγωγική δράση>> παρουσία πολυφαινολικών ομάδων. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικών ενός φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί.

Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων:



Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (725nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (35%, w/v) που δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης αφενός, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων (Balentine et al., 1997). Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Σουφλερός, 1997).

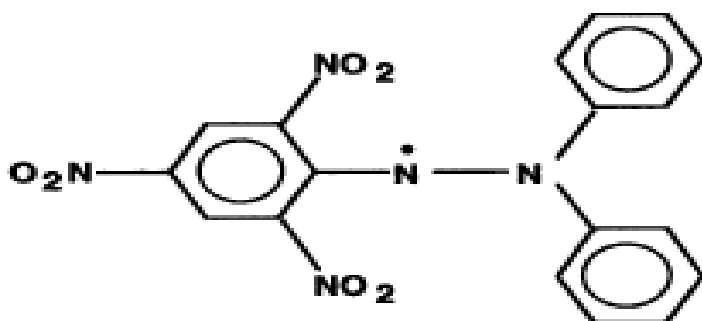
2.8.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΥΠΕΡΜΑΓΓΑΝΙΚΟΥ ΚΑΛΙΟΥ (KMnO₄)

Όπως και η μέθοδος Follin-Ciocalteu έτσι και αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ουσίες σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξειδωση των φαινολικών ουσιών από το υπερμαγγανικό κάλιο, στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη carmin-indigo, από το κυανό στο κίτρινο. Ο δείκτης αυτός οξειδώνεται πριν από ορισμένα συστατικά του δείγματος, αλλά μετά από τις φαινολικές ουσίες. Η αλλαγή του χρώματός του συμπίπτει με το τέλος της οξειδωσης των φαινολικών ουσιών, έτσι ώστε να αποφεύγεται παραπέρα κατανάλωση (KMnO₄) για οξειδωση άλλων διαφόρων συστατικών του δείγματος (Σουφλερός, 1997).

2.8.3. ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH

Η μέθοδος DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρύλουδράζυλο) είναι μία μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών 1,1-διφαινυλο-2-πικρύλουδράζυλο (DPPH). Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών, αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών. Αποτελεί *in vitro* τεχνική και πλεονεκτεί ως προς το ότι η δέσμευση των ελεύθερων ριζών του DPPH από τις πολυφαινόλες του δείγματος και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού διαλύματος αντίδρασης (π.χ. εκχύλισμα-DPPH) δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Οι φωτομετρήσεις πραγματοποιούνται περίπου μία ώρα μετά την παρασκευή του διαλύματος στα 520-700nm. Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων (κατά τα άλλα σταθερών) ριζών του DPPH, παραγωγή ανοιχτόχρωμου προϊόντος (από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο) και κατά επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στην προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Balentine et al., 1997; Roginsky & Lissi, 2004). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox

(μονάδες συγκέντρωσης) συνήθως σε mmol/l (Roginsky & Lissi, 2004).



Σχήμα 6. Η ελεύθερη ρίζα DPPH.

(Molyneux, 2004)

2.8.4. ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ TLC

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

Η HPLC ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσσκευή υγρού χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (οργανικοί, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα και άλλα) υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις. Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, ή της ιοντοανταλλαγής ή τέλος της μοριακής διήθησης. Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

Η HPLC υπερέχει της TLC επειδή επιτυγχάνονται αποτελεσματικότεροι διαχωρισμοί ώστε να είναι δυνατή μια καλύτερη ποιοτική ανάλυση. Σ'αυτή συμβάλλουν σημαντικά:

- α) οι χρησιμοποιούμενες στήλες silica για τον διαχωρισμό μη πολικών φαινολών με ισοκρατική έκλυση και αντίστροφης φάσης για τον διαχωρισμό πολικών φαινολών με την βαθμωτή έκλυση, και
- β) ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής υπεριώδους, αφού όλες οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ένα ή περισσότερα μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή από τα 230 μέχρι τα 290nm.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) είναι μια σημαντική τεχνική διαχωρισμού φαινολικών συστατικών και ανίχνευσης μεταξύ αυτών που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες με στατική φάση κυτταρίνη, πολυαμίδιο και συνηθέστερα silica gel, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης μίγματα διαφόρων διαλυτών. Για την επιλογή των καταλληλότερων από αυτά λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή ελάχιστες φαινολικές ενώσεις είναι έγχρωμες και επομένως απευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με διάφορα αντιδραστήρια. Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση (Harbome, 1997).

2.8.5. ΜΕΘΟΔΟΣ FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay)

Η δοκιμή FRAP (ferric reducing antioxidant power) είναι μία γρήγορη και άμεση φασματοφωτομετρική μέθοδος υπολογισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής δύναμης (αναγωγικής ικανότητας) ενός φυτικού εκχυλίσματος (Soobrattee et.al., 2005) και στηρίζεται στην αναγωγή, κάτω από όξινες συνθήκες, του συμπλόκου Fe^{+3} -τριπυριδυλο-τριαζίνη (Fe^{+3} -TPTZ) σε δισθενή μορφή, που αποκτά έντονο μπλε χρώμα και απορροφά στα 593 nm. Οι συνθήκες της δοκιμής ευνοούν την αναγωγή του τρισθενούς συμπλόκου από το σύνολο των αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται στο διάλυμα δοκιμής (Benzie & Strain, 1996).

Το ποσοστό της μείωσης του ferrylmetmyoglobin που καθορίζεται φασματοσκοπικά (spectroscopy) στην ορατή περιοχή, προτάθηκε για να

χαρακτηρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών. Ωστόσο, η ερώτηση για τη σχέση μεταξύ της μεθόδου FRAP και της αντιοξειδωτικής ικανότητας παραμένει ανοιχτή (Benzie & Strain, 1996).

Η μέθοδος αυτή θεωρείται μια οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν προσδιορίζει τις θειολικές ομάδες σαν αντιοξειδωτικά. Όμως επειδή δεν υπάρχουν αντιοξειδωτικές θειόλες σε διαιτητικά φυτά και στα παράγωγά τους, παρά μόνο στο σκόρδο, η μέθοδος FRAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φυτικό υλικό (Harvorsen et al, 2002). Τα αποτελέσματα συνήθως εκφράζονται ως ισοδύναμα βιταμίνης C (Huang et al., 2005).

2.8.6. ΜΕΘΟΔΟΣ ABTS

Η δοκιμή ABTS είναι πιθανώς η επικρατέστερη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μεταξύ δοκιμών για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον έλεγχο του αποχρωματισμού του ριζικού κατιόντος $ABTS^+$ που παράγεται από την οξείδωση του αντιδραστηρίου 2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) (ABTS). Η οξείδωση προκαλείται από την προσθήκη ενός χημικού οξειδωτικού παράγοντα (π.χ. $K_2S_2O_8$). Το $ABTS^+$ παρουσιάζει μια ισχυρή απορρόφηση στα 600-750nm και μπορεί να καθοριστεί εύκολα φασματοφωτομετρικά. Ελλείψει φαινολικών ουσιών, το $ABTS^+$ είναι σταθερό, αλλά όταν αντιδρά με ένα δότη χ -ατόμων, όπως οι φαινολικές ουσίες, μετατρέπεται σε μια "μη χρωματισμένη" μορφή, η οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Επομένως, όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών είναι μεγαλύτερη η μη χρωματισμένη μορφή του $ABTS^+$ θα είναι πιο έντονη, δηλαδή θα έχουμε πιο έντονο αποχρωματισμό. Η ποσότητα του $ABTS^+$ που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox (μονάδες συγκέντρωσης) ή και σε ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Villano et al, 2004).

2.8.7. ΜΕΘΟΔΟΣ ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay)

Είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Χρησιμοποιεί μία <<γεννήτρια>> ελευθέρων ριζών, μέσω θερμικής αποσύνθεσης μίας αζωτοένωσης, ώστε να δώσει μία σταθερή ροή υπεροξυλο-ριζών σε ένα κορεσμένο διάλυμα αέρα. Τα αντιοξειδωτικά συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για τις ρίζες και εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξειδωση του υποστρώματος. Σύμφωνα με την πρότυπη μορφή αυτής της μεθόδου, ο ρυθμός της υπεροξειδωσης που προκαλείται από την ένωση 2,2'-diazobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH ή ABAP) ρυθμίζεται μέσω της απώλειας του φθορισμού της β-PE είναι μία ένδειξη φθοράς από την αντίδρασή της με την υπεροξυλο-ρίζα. Συνήθως η χρονική υστέρηση που προκαλείται από το δείγμα συγκρίνεται με αυτή που προκαλείται από το διάλυμα Trolox. Η ένταση του φθορισμού (485-525nm) μετρείται για 35min σε pH=7,4 και στους 37°C (Huang et al., 2005).

2.8.8. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της λουμινόλης και συγγενών ενώσεων να εκπέμπουν φως υπό την ροή ελευθέρων ριζών. Η ένταση του παραγόμενου φωτός κατά την διάρκεια των αντιδράσεων της χημειοφωταύγειας είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης υπεροξειδίου. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών προκαλεί μία πτώση της έντασης (Huang et al., 2005).

2.9. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΦΕ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Ο καφές είναι ένα πολύπλοκο μείγμα από χημικές ουσίες που παρέχει σημαντικές ποσότητες χλωρογενικού οξέος και καφεΐνης. Ο αφιλτράριστος καφές είναι μια σημαντική πηγή καφεστόλης και καχγεόλης, οι οποίες είναι διτερπένια που εμπέκονται στην αύξηση της χοληστερόλης στον οργανισμό. Τα αποτελέσματα από επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση καφέ μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη πολλών χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων του τύπου 2 σακχαρώδη διαβήτη, της νόσου του Πάρκινσον και την ηπατική νόσο (κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα). Οι περισσότερες μελέτες για τον καφέ αναφέρουν ότι η κατανάλωση καφέ δεν συνδέεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, η κατανάλωση καφέ συνδέεται με την αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων σε διάφορους παράγοντες κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της πίεσης του αίματος και της ομοκυστεΐνης του πλάσματος. Επί του παρόντος, υπάρχουν ελάχιστες ενδείξεις ότι η κατανάλωση καφέ αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου. Για τους ενήλικες που καταναλώνουν μέτριες ποσότητες καφέ (3-4 φλιτζάνια/ημέρα παροχή 300-400 mg/d καφεΐνης), υπάρχουν λίγα στοιχεία σχετικά με τους κινδύνους για την υγεία και υπάρχουν ενδείξεις για οφέλη στην υγεία. Ωστόσο, ορισμένες ομάδες, όπως άτομα με υπέρταση, παιδιά, έφηβοι και ηλικιωμένοι, ενδέχεται να είναι πιο ευάλωτες στις αρνητικές επιδράσεις της καφεΐνης. Επιπλέον, υπάρχουν σήμερα διαθέσιμα στοιχεία που δείχνουν ότι μπορεί να είναι συνετά για τις εγκύους γυναίκες να περιορίσουν την κατανάλωση καφέ με 3 φλιτζάνια/ημέρα, παροχή που δεν υπερβαίνει τα 300mg/d καφεΐνης για να αποκλειστεί οποιαδήποτε αύξηση της πιθανότητας αποβολής ή μειωμένης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Hidgon & Frei, 2006).

Η κατανάλωση καφέ έχει συσχετιστεί με κλινικά σημαντική μείωση του κινδύνου της κίρρωσης του ήπατος και του καρκίνου του ήπατος σε διάφορους πληθυσμούς μελέτης και μπορεί να σχετίζεται με τα συστατικά του καφέ όπως φαινόλες και των συναφών ουσιών. Πιθανοί μηχανισμοί για αυτή την παρατήρηση μπορεί να είναι η χαμηλότερη δραστηριότητα των

επιλεγμένων αμινοτρανσφερασών, πιθανή παρεμπόδιση των φλεγμονωδών παραγόντων μεταγραφής, και ίσως και αυξημένη έκφραση των ενζύμων αποτοξίνωσης (Hidgon & Frei, 2006).

Η καθημερινή κατανάλωση καφέ βελτιώνει την ρύθμιση της γλυκόζης και ως αποτέλεσμα μειώνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 σε ποσοστό 35-75% κάτι το οποίο αποδίδεται στα φυσικά πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά του καφέ, στις λιγνάνες και το μαγνήσιο (Dam, 2006).

Ο καφές λόγω των αυξημένων φυσικών αντιοξειδωτικών όπως το χλωρογενικό οξύ και τα παράγωγά του, καθώς και των προϊόντων της αντίδρασης Maillard (μελανοειδή και ετεροκυκλικές ενώσεις) θεωρείται ότι έχει προστατευτικό ρόλο εναντίον του καρκίνου (Hidgon & Frei, 2006; Dam, 2006).

Πολλές άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση καφέ αυξάνει την πνευματική εγρήγορση, τις γνωστικές λειτουργίες, την αγρυπνία, και τη φυσική αντοχή, ενώ μειώνει τον κίνδυνο της νόσου του Αλτσχάιμερ και της κατάθλιψης (Dorea & Costa, 2005; Hidgon & Frei, 2006).

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να βρεθεί:

1. Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα ελληνικού καφέ διαφορετικής μάρκας που υπάρχουν και καταναλώνονται ευρέως στην ελληνική αγορά.
2. Αν η διαφορετική μάρκα καφέ επηρεάζει την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.
3. Αν η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού επηρεάζει την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.
4. Αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

4.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΚΑΦΕ

Για την διεκπεραίωση της πτυχιακής εργασίας εξετάστηκαν οχτώ διαφορετικής μάρκας ελληνικοί καφέδες (Πίνακας 2) που πωλούνται και καταναλώνονται ευρέως στην ελληνική αγορά.

Πίνακας 2. Δείγματα αξιολόγησης ελληνικών καφέδων.

| ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΑΦΕ | ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΚΑΦΕ |
|--------------|-------------------------|
| 1 | ΛΟΥΠΑΠ |
| 2 | ΒΚΛΑΣ |
| 3 | ΚΟΚ |
| 4 | ΑΝΤ |
| 5 | ΑΒ36 |
| 6 | ΜΡΓ |
| 7 | CΑR |
| 8 | ΑΒΕΛ |

4.1.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Διατίθεται στο εμπόριο και παρασκευάζεται ως εξής: 100g βολφραϊμικού νατρίου (tungstate de sodium) και 25g μολυβδαινικού νατρίου (molybdate de sodium) διαλύονται σε 700ml απεσταγμένο νερό. Προστίθενται 50ml H_3PO_4 85%, 100ml πυκνού HCL και φέρεται σε βρασμό για 10 ώρες, κάτω από κατακόρυφο ψυκτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 150g θειϊκού λιθίου, μερικές σταγόνες βρώμιου και φέρεται πάλι σε βρασμό για 15min. Το

μίγμα ψύχεται και συμπληρώνεται ο όγκος του στο 1l με απεσταγμένο νερό (Σουφλερός, 1997).

- Αντιδραστήριο ABTS, ABTS 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate) Diammonium salt ($C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$), $M=548.68g/mol$, BIOCHEMICA, προϊόν Γερμανίας.
- Πρότυπο Γαλλικό Οξύ ξηρής μορφής, Gallic acid cryst.extra pure, ($C_7H_6O_5H_2O$), $M=188.14g/mol$, MERCK, προϊόν Γερμανίας.
- Διάλυμα άνυδρου Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3), Sodium Carbonate anhydrous for analysis-ACS-ISO, (Na_2CO_3), $M=105.99g/mol$, PANREAC, προϊόν Αγγλίας.
- Διάλυμα Αιθυλικής Αλκοόλης, Ethanol absolute (Acs – for analysis Reag. Ph. Eur Reag. USP.), C_6H_5OH , GARLO ERBA REAGENTI.
- Υπερθειικό Κάλιο ($K_2S_2O_8$), Kalcium persulfuricum, $M=270.3g/mol$, N-FREI PRO ANALYSE, προϊόν Γερμανίας.
- Μονόξινο Φωσφορικό Νάτριο – Διυδατικό, di-sodium hydrogen phosphate dehydrate, ($Na_2HPO_4H_2O$), $M=156.01g/mol$, MERCK, προϊόν Γερμανίας.
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο, di-sodium hydrogen phosphate 2-hydrate, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, $M=177.99g/mol$, PANREAC, προϊόν Αγγλίας.
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Cupric sulfate Pentahydrate, $M=249.68g/mol$, Fluca-Garancie.
- Τρυγικό K-Na, Potasio Sodio Tartrato 4-hidrato, $NaK(COO)_2(CHOH)_2 \cdot 4H_2O$, $M=282.23g/mol$, PANREAC, προϊόν Αγγλίας.
- Καυστικό Νάτριο, Sodium Hydroxide pellets PA-ACS-ISO, NaOH, $M=40.00g/mol$, PANREAC, προϊόν Αγγλίας.
- Buffer solution pH 7.00 ± 0.02
- Buffer solution pH 4.00 ± 0.02
- Απεσταγμένο νερό.

4.1.3. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Κωνικές φιάλες των 50 και 100ml.
- Ογκομετρικές φιάλες των 50,100 και 1000ml.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Ποτήρια ζέσεως των 50,100 και 200ml.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 και 100ml.
- Σιφώνια μετρήσεως των 1, 5, 10 και 50ml.
- Σιφώνια πληρώσεως των 1, 5, 10 και 50ml.
- Κυψελίδα χαλαζία.
- Γυάλινοι ράβδοι.
- Υδροβολείς.
- Σπάτουλες.
- Στατό.
- Μαγνητάκια ανάδευσης.
- Γυάλινα χωνιά διήθησης.
- Διηθητικό χαρτί.
- Μικροπιπέτες των 45-200μl, 50-200μl και 200-1000μl, (Micropipette, Socorex, Swiss made).
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης, Framo-Geratechnik, M21/1.
- Συσκευή ανάδευσης, Heidolph REAX 2000.
- Υδρόλουτρο, Koitermann Labortechnik.
- Αναλυτικός ζυγός, Electronic Balance, ER-18 OA, max 180g, d=0.1mg.
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο, CRISON micropH 2001.
- Φασματοφωτόμετρο για μέτρηση στα 760nm και 734nm, UV-Vis spectrophotometer – 1202, Shimadzu.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του δείκτη Folin-Ciocalteu και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας η μέθοδος ABTS.

4.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ - ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN-CIOCALTEU.

Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων ενός εκχυλίσματος προσδιορίζεται συνήθως με χρωματομετρικές μεθόδους. Αν και κανένα αντιδραστήριο δεν δίνει με τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις προϊόντα που να εμφανίζουν το ίδιο μέγιστο μήκος απορρόφησης, η μέθοδος που στηρίζεται στο αντιδραστήριο FOLIN-CIOCALTEU είναι η πλέον αποδεκτή (Tsimidou et al., 1992).

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ενώσεις ενός δείγματος και είναι η πλέον αποδεκτή. Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβολφραιμικού ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφορομολυβδαινικού οξέος ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Κατά την αντίδραση οι φαινολικές ομάδες οξειδώνονται σε ομάδες με δομή κινόνης και τα οξέα φωσφοροβολφραιμικού και φωσφορομολυβδαινικού ανάγονται σε οξειδία βολφραιμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαινίου (MoO_{23}) μπλε χρώματος. Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη FC εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Σουφλερός, 1997).

Εκτός από το αντιδραστήριο Trolox έχει βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το Γαλλικό Οξύ. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, τα αντιδραστήρια Trolox και Γαλλικό Οξύ, σαν πρότυπα αντιδραστήρια σ' αυτή τη μέθοδο, είναι παρόμοια θεωρώντας ότι το Trolox είναι μια μονοφαινόλη και το Γαλλικό Οξύ μια τριφαινόλη (Minussi et al., 2002).

4.2.1.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

4.2.1.1.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Το αντιδραστήριο **Folin-Ciocalteu** χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο 1:1 με απεσταγμένο νερό.
- Το αντιδραστήριο **Solution 1** παρασκευάστηκε με την ανάμειξη σε μία ογκομετρική φιάλη των 1000ml των παρακάτω τριών αντιδραστηρίων:
 - A) 10ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%
(σε μία ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 1g από το $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και 99ml απεσταγμένο νερό).
 - B) 10ml Τρυγικό K-Na 2%
(σε μία ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 2g από το Τρυγικό K-Na και 98ml απεσταγμένο νερό).
 - Γ) 980ml $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaOH}$
(σε μία ογκομετρική φιάλη των 1000ml προστέθηκαν 20g Na_2CO_3 , 4g NaOH και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή).
Ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Το **πυκνό Γαλλικό Οξύ** παρασκευάστηκε προσθέτοντας σε μία ογκομετρική φιάλη των 100ml, 0.5g Γαλλικό Οξύ ξηρής μορφής, 10ml αιθυλική αλκοόλη και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση.

4.2.1.1.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Γαλλικού Οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν μετά από μία σειρά υπολογισμών και δοκιμών της αντίδρασης σε δείγματα ελληνικών καφέδων. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής:

- Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 0.5g Γαλλικού Οξέος ξηρής μορφής και 10ml αιθυλική αλκοόλη, ώστε να διαλυθεί το Γαλλικό Οξύ. Μετά από καλή ανάδευση συμπληρώθηκε η ογκομετρική φιάλη με

απεσταγμένο νερό. Έτσι παρασκευάστηκε το πυκνό διάλυμα Γαλλικού Οξέος.

- Από το πυκνό διάλυμα Γαλλικού Οξέος ελήφθησαν 0.1, 0.2, 0.5, 1 και 2ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml οι οποίες κατόπιν συμπληρώθηκαν με απεσταγμένο νερό. Από αυτά τα πέντε πρότυπα αραιωμένα διαλύματα Γαλλικού οξέος ελήφθησαν με σιφώνιο ποσότητες 0.5ml και τοποθετήθηκαν σε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα.
- Προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 2.5ml από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (αραιωμένο 1:1 με απεσταγμένο νερό) και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 2ml από το αντιδραστήριο Solution 1 και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 50°C για 5min.
- Μετά την παρέλευση των 5min έγινε ψύξη αυτών με κρύο νερό και συγχρόνως ανάδευση.
- Τέλος ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 760nm. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με την μόνη διαφορά ότι στη θέση του Γαλλικού Οξέος προστέθηκε ίδια ποσότητα απεσταγμένου νερού.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των μg Γαλλικού Οξέος που υπάρχουν στα πέντε πρότυπα διαλύματα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α). Έτσι, λοιπόν για τα πρότυπα διαλύματα των 0.1, 0.2, 0.5, 1 και 2ml Γαλλικού Οξέος υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 2.5, 5, 12.5, 25 και 50 μg γαλλικού οξέος αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν πρότυπη καμπύλη με άξονα Χ τα μg Γαλλικού Οξέος και άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις στα 760nm.

4.2.1.1.3. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

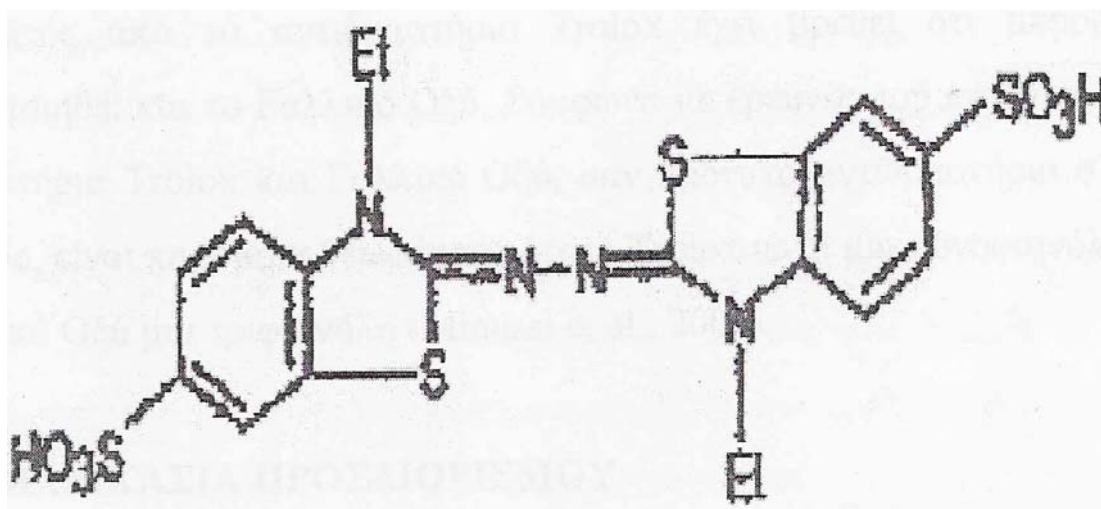
Για την ανάλυση των δειγμάτων ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα:

- Προστέθηκε 0.5ml από το αραιωμένο διάλυμα (δείγμα) καφέ και 2.5ml από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Προστέθηκε 2ml από το αντιδραστήριο Solution 1 και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Τοποθετήθηκε σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 50°C για 5min.
- Μετά την παρέλευση των 5min έγινε ψύξη αυτού με κρύο νερό και συγχρόνως ανάδευση.
- Τέλος ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 760nm. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με τυφλό δείγμα το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω με την μόνη διαφορά ότι στη θέση του δείγματος προστέθηκε ίδια ποσότητα απεσταγμένου νερού.

4.2.2.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ- ΜΕΘΟΔΟΣ ABTS

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί λεπτομερώς η αντιοξειδωτική ικανότητα σε τρόφιμα και έχει αναπτυχθεί μία ευρεία ποικιλία μεθόδων για τον προσδιορισμό της. Από τις πιο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η μέθοδος ABTS.

Το αντιδραστήριο αυτής της μεθόδου είναι το 2,2'azinobis-(3ethylbenzothiaziline-6-sulfonate). Με οξείδωση αυτού του αντιδραστηρίου παράγεται το ριζικό κατιόν ABTS⁺, το οποίο έχει έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα. Ο συντακτικός του τύπος φαίνεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7. Συντακτικός τύπος αντιδραστηρίου ABTS.

(Roginsky & Lissi , 2004)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον αποχρωματισμό του παραπάνω σχηματιζόμενου ριζικού κατιόντος ABTS⁺, ο οποίος προκαλείται με την προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει φαινολικό παράγοντα, λόγω της απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών. Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος ABTS⁺ που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται συνήθως σε ισοδύναμα Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8tetramethylchoman-2-carboxylic acid) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Roginsky & Lissi, 2004).

Σύμφωνα με τον Cano, το ABTS⁺ μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση (π.χ. με διοξειδίο μαγγανίου (MNO₂), με υπερθειικό κάλιο (K₂S₂O₈) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη). Γενικά, η χημική αντίδραση απαιτεί πολύ χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθειικού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι ταχύτερες και οι συνθήκες αντίδρασης ηπιότερες.

Η μέγιστη απορρόφηση του ABTS⁺ αποδείχτηκε ότι είναι σε μήκη κύματος 415, 645, 734 και 815nm. Τα μήκη κύματος, τα οποία επιλέχτηκαν από τους περισσότερους ερευνητές για να ελέγξουν φασματοφωτομετρικά την αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και του ABTS⁺ είναι 415 και 734nm.

Οι πιο πρόσφατες αναθεωρημένες μέθοδοι μετρούν την μείωση της απορροφητικότητας του ABTS⁺ παρουσία του προς εξέταση δείγματος ή του πρότυπου αντιδραστήριου Trolox σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα 4-6min και έπειτα η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται σε ισοδύναμα Trolox (Prior et al., 2005).

Εκτός από το αντιδραστήριο Trolox έχει βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το Γαλλικό Οξύ. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, τα αντιδραστήρια Trolox και Γαλλικό Οξύ, σαν πρότυπα αντιδραστήρια σ'αυτή τη μέθοδο, είναι παρόμοια θεωρώντας ότι το Trolox είναι μια μονοφαινόλη και το Γαλλικό Οξύ μια τριφαινόλη (Minussi et al., 2002).

4.2.2.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

4.2.2.1.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Το **πυκνό Γαλλικό Οξύ** παρασκευάστηκε προσθέτοντας σε μία ογκομετρική φιάλη των 100ml, 0.5g Γαλλικό Οξύ ξηρής μορφής, 10ml αιθυλική αλκοόλη και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος (**buffer φωσφορικών**) διαλύθηκαν 3.56g Μονόξινο Φωσφορικό Νάτριο και 3.12g Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο σε 1l απεσταγμένου νερού και έπειτα έγινε ανάμειξη. Το BUFFER πρέπει να είναι 0,02M και να έχει pH περίπου 7.
- Για την παρασκευή του διαλύματος **ABTS⁺** διαλύθηκαν 0.034g σκόνης αντιδραστηρίου ABTS⁺ και 0.0066g υπερθειϊκού καλίου (K₂S₂O₈) σε 10ml απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το διάλυμα παρέμεινε στο σκοτάδι για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την χρήση. Οι παραπάνω ποσότητες υπολογίστηκαν έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 7mmol/l αντιδραστηρίου ABTS⁺ και 2,45mmol/l υπερθειϊκού καλίου (K₂S₂O₈) (Erel, 2004).

4.2.2.1.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Γαλλικού Οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν μετά από μία σειρά υπολογισμών και δοκιμών της αντίδρασης σε δείγματα ελληνικών καφέδων. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής:

- Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 0.5g Γαλλικού Οξέος ξηρής μορφής και 10ml αιθυλική αλκοόλη, ώστε να διαλυθεί το Γαλλικό Οξύ. Μετά από καλή ανάδευση συμπληρώθηκε η ογκομετρική φιάλη με απεσταγμένο νερό. Έτσι παρασκευάστηκε το πυκνό διάλυμα Γαλλικού Οξέος.

- Από το πυκνό διάλυμα Γαλλικού Οξέος ελήφθησαν 0.1, 0.2, 0.5, 1 και 2ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml οι οποίες κατόπιν συμπληρώθηκαν με απεσταγμένο νερό. Από αυτά τα πέντε πρότυπα αραιωμένα διαλύματα Γαλλικού Οξέος ελήφθησαν με μικροπιπέτα 50ml και τοποθετήθηκαν σε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα.
- Προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 45ml από το διάλυμα ABTS⁺ και ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 3ml από το διάλυμα buffer-φωσφορικών και ακολούθησε έντονη ανάδευση και αναμονή 5min.
- Τέλος ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 734nm.

Η ποσότητα των 45ml διαλύματος ABTS⁺ υπολογίστηκε σε σχέση με το τυφλό δείγμα, το οποίο στη θέση του ABTS⁺ περιείχε απεσταγμένο νερό και ήταν τέτοια ώστε στα 734nm να δίνει απορρόφηση 0,7 (Erel, 2004). Δεν έγινε μηδενισμός του οργάνου, αλλά μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων μετά το τυφλό είχαμε μείωση της μετρούμενης απορρόφησης (Minnusi et al., 2002).

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των μg Γαλλικού Οξέος που υπάρχουν στα πέντε πρότυπα διαλύματα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β). Έτσι, λοιπόν για τα πρότυπα διαλύματα των 0.1, 0.2, 0.5, 1 και 2ml Γαλλικού Οξέος υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 και 5.0μg γαλλικού οξέος αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν πρότυπη καμπύλη με άξονα Χ τα μg Γαλλικού Οξέος και άξονα Υ τις μετρούμενες απορροφήσεις στα 734nm.

4.2.2.1.3. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την ανάλυση των δειγμάτων ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα:

- Προστέθηκε 50ml από το αραιωμένο διάλυμα (δείγμα) καφέ, 45ml διάλυμα ABTS⁺ και 3ml από το διάλυμα buffer-φωσφορικών και ακολούθησε έντονη ανάδευση και αναμονή 5min.
- Τέλος ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 734nm.

4.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ολοκληρώθηκε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab, με την βοήθεια της ανάλυσης της διακύμανσης δύο παραγόντων ή δύο κατευθύνσεων (two-factor or two-way ANOVA) όπου εξετάζεται ταυτόχρονα η επίδραση δύο παραγόντων (ή δύο κριτηρίων ή δύο κατευθύνσεων) που είναι η διαφορετική μάρκα ελληνικού καφέ και η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας ελληνικού καφέ.

Η ορολογία της ANOVA περιλαμβάνει τη σύγκριση δύο ή περισσότερων μέσων όρων με μηδενική υπόθεση, $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_k$ όπου k είναι το πλήθος των συγκρινόμενων μέσων όρων των ομάδων και εναλλακτική, H_A : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι. Το σύμβολο \neq δεν τίθεται στην εναλλακτική υπόθεση μεταξύ των μέσων όρων, γιατί απλούστατα αρκεί και μόνο ένας μέσος όρος να διαφέρει για να καταρριφθεί η μηδενική υπόθεση.

Αν οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση ξεπερνούν την άριστη πιθανότητα $p=0,05$ τότε οι μέσοι όροι που συγκρίνονται δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά και ισχύει η μηδενική υπόθεση. Αν οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση είναι μικρότερες από την άριστη πιθανότητα $p=0,05$ τότε τουλάχιστον ένας από τους μέσους όρους παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά και ισχύει η εναλλακτική υπόθεση.

Η ANOVA μας πληροφορεί απλά ότι κάποιοι μέσοι όροι διαφέρουν, ΔΕΝ μας πληροφορεί όμως που εντοπίζονται οι διαφορές αυτές, δηλαδή ποιοι μέσοι όροι διαφέρουν από ποιους και με ποια σειρά. Οι υποθέσεις αυτές τεκμηριώνονται με τη χρήση άλλων ελέγχων. Ένας από αυτούς είναι ο έλεγχος του πολλαπλού εύρους των Student-Newman-Keuls (έλεγχος SNK) και εφαρμόζεται σε όλες τις δυνατές συγκρίσεις κατά ζεύγη.

Πριν εφαρμοστεί ο έλεγχος της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων εξετάζεται αν ισχύουν οι προϋποθέσεις εφαρμογής της ανάλυσης, δηλαδή η κανονικότητα και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων (Πετρίδης, 2000).

Όλα τα παραπάνω που αναφέρθηκαν εφαρμόστηκαν για τους οχτώ ελληνικούς καφέδες διαφορετικής μάρκας και για κάθε μέθοδο (Follin-Ciocalteu & ABTS) ξεχωριστά.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΚΑΦΕΔΩΝ ΚΑΙ ΑΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ Η ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΦΕ ΣΤΗΝ ΙΔΙΑ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥΣ.

5.1.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU

5.1.1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 4.4.1.1.2.), έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων Γαλλικού Οξέος στα 760nm με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.

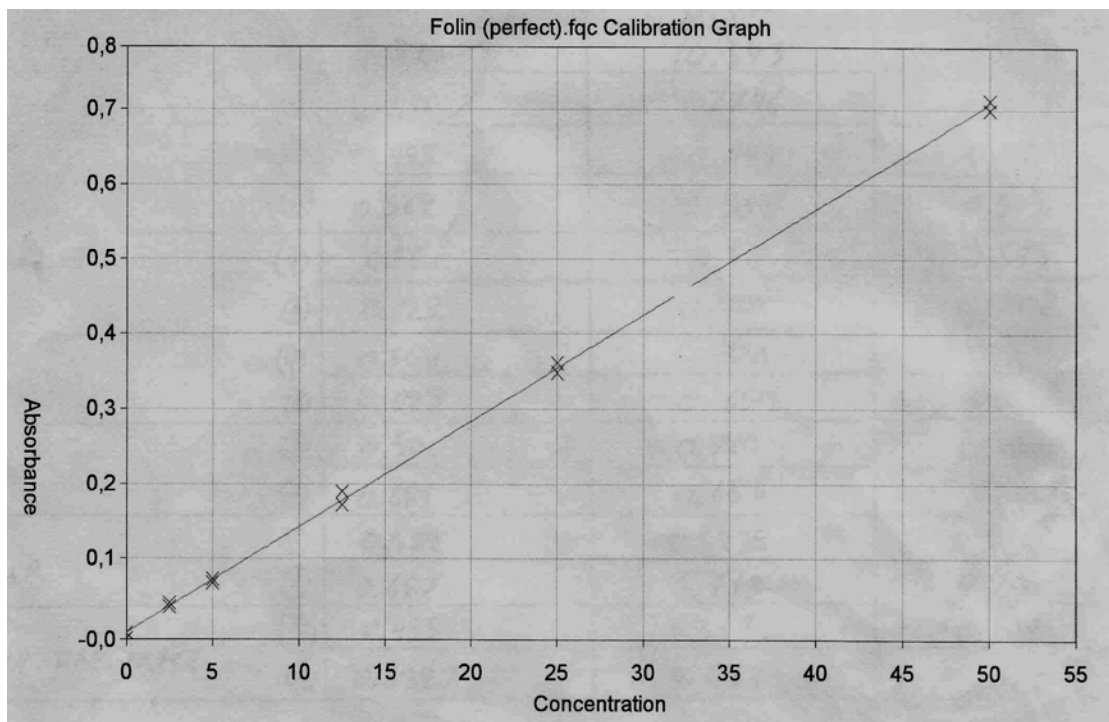
Πίνακας 3. Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

| μg Γαλλικού Οξέος | Απορρόφηση 760nm | Μ.Ο. Απορρόφησης |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2,5 | 0,040 0,035 | 0,037 |

| | | |
|------|----------------|-------|
| 5,0 | 0,073 0,068 | 0,070 |
| 12,5 | 0,190 0,171 | 0,181 |
| 25,0 | 0,348 0,361 | 0,355 |
| 50,0 | 0,700 0,713 | 0,706 |

Παίρνοντας τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε Πρότυπη Καμπύλη (Σχήμα 8) με άξονα Χ την συγκέντρωση σε μg του Γαλλικού Οξέος και άξονα Υ την μετρούμενη απορρόφηση στα 760nm.

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ FOLLIN-CIOCALTEU



Σχήμα 8. Πρότυπη Καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu.

Η Πρότυπη Καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,999384 και ακολουθεί την εξίσωση $A=0,0141C+0,0004$ (όπου A η απορρόφηση στα 760nm (άξονας Y) και C η συγκέντρωση σε μg του γαλλικού οξέος (άξονας X)).

5.1.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αξιολογήθηκαν δείγματα ελληνικού καφέ διαφορετικής μάρκας (ΛΟΥΠΑΠ, ΒΚΛΑΣ, ΚΟΚ, ΑΝΤ, ΑΒ36, ΜRΓ, CΑR και ΑΒΕΛ) και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 760nm για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα έξι φορές. Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της Πρότυπης Καμπύλης. Η αναγωγή των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $A=0,0141C+0,0004$. Κατόπιν έγινε μετατροπή των τιμών σε mg γαλλικού οξέος ανά g καφέ. Τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με τον εξής τρόπο: Από κάθε ελληνικό καφέ προστέθηκαν σε 3 ποτήρια ζέσεως των 50ml 2, 3 και 4g αντίστοιχα και 45ml νερό. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ηλεκτρικό μάτι στους 200°C. Κατόπιν έγινε απλή διήθηση με τη χρήση γυάλινου χωνιού διήθησης και διηθητικού χαρτιού. Το κάθε διήθημα αραιώθηκε 1/50 με απεσταγμένο νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 50ml και χρησιμοποιήθηκε για εξέταση.

Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας:

Πίνακας 4. Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών (mg γαλλικού οξέος/g καφέ) στους οχτώ διαφορετικής μάρκας καφέδες μετά την προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ.

| ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΦΕ | Α/Α | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (mg γαλλικού οξέος/g καφέ) | | | | | |
|---------------|-------------|---|--------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| | | ΔΕΙΓΜΑΤΑ | | | | | |
| | | 2g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | | 3g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | | 4g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | |
| | | A 760nm | mg γ.ο./ g καφέ | A 760nm | mg γ.ο./ g καφέ | A 760nm | mg γ.ο./ g καφέ |
| | | | | | | | |
| ΛΟΥΠΑΠ | 1 | 0,163 | 26,209 | 0,254 | 26,845 | 0,331 | 26,345 |
| | 2 | 0,165 | 26,531 | 0,251 | 26,527 | 0,334 | 26,584 |
| | 3 | 0,167 | 26,854 | 0,248 | 26,209 | 0,335 | 26,663 |
| | 4 | 0,168 | 27,015 | 0,247 | 26,104 | 0,339 | 26,982 |
| | 5 | 0,167 | 26,854 | 0,250 | 26,421 | 0,334 | 26,584 |
| | 6 | 0,168 | 27,015 | 0,249 | 26,315 | 0,332 | 26,424 |
| | M.O. | - | 26,746 | - | 26,403 | - | 26,597 |
| | | | | | | | |
| ΒΚΛΑΣ | 1 | 0,155 | 24,919 | 0,243 | 25,680 | 0,327 | 26,026 |
| | 2 | 0,158 | 25,403 | 0,24 | 25,363 | 0,322 | 25,628 |
| | 3 | 0,156 | 25,081 | 0,237 | 25,045 | 0,322 | 25,628 |
| | 4 | 0,155 | 24,919 | 0,233 | 24,622 | 0,319 | 25,388 |
| | 5 | 0,161 | 25,887 | 0,239 | 25,257 | 0,317 | 25,229 |
| | 6 | 0,159 | 25,564 | 0,237 | 25,045 | 0,313 | 24,910 |
| | M.O. | - | 25,296 | - | 25,168 | - | 25,468 |
| | | | | | | | |
| ΚΟΚ | 1 | 0,128 | 20,567 | 0,193 | 20,387 | 0,258 | 20,528 |
| | 2 | 0,124 | 19,923 | 0,188 | 19,858 | 0,255 | 20,288 |
| | 3 | 0,125 | 20,084 | 0,186 | 19,646 | 0,251 | 19,970 |
| | 4 | 0,123 | 19,761 | 0,189 | 19,964 | 0,253 | 20,129 |
| | 5 | 0,126 | 20,245 | 0,192 | 20,282 | 0,256 | 20,368 |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|
| | 6 | 0,129 | 20,729 | 0,190 | 20,070 | 0,257 | 20,448 |
| | M.O. | - | 20,218 | - | 20,035 | - | 20,288 |
| | | | | | | | |
| ANT | 1 | 0,157 | 25,242 | 0,229 | 24,198 | 0,303 | 24,113 |
| | 2 | 0,155 | 24,919 | 0,231 | 24,410 | 0,300 | 23,874 |
| | 3 | 0,150 | 24,113 | 0,227 | 23,986 | 0,303 | 24,113 |
| | 4 | 0,150 | 24,113 | 0,234 | 24,727 | 0,306 | 24,353 |
| | 5 | 0,151 | 24,275 | 0,236 | 24,939 | 0,308 | 24,512 |
| | 6 | 0,150 | 24,113 | 0,234 | 24,727 | 0,310 | 24,671 |
| | M.O. | - | 24,463 | - | 24,498 | - | 24,273 |
| | | | | | | | |
| AB36 | 1 | 0,146 | 23,469 | 0,220 | 23,245 | 0,290 | 23,078 |
| | 2 | 0,144 | 23,146 | 0,217 | 22,928 | 0,287 | 22,838 |
| | 3 | 0,142 | 22,824 | 0,214 | 22,610 | 0,285 | 22,679 |
| | 4 | 0,145 | 23,308 | 0,211 | 22,293 | 0,281 | 22,360 |
| | 5 | 0,139 | 22,340 | 0,215 | 22,716 | 0,285 | 22,679 |
| | 6 | 0,141 | 22,663 | 0,214 | 22,610 | 0,283 | 22,520 |
| | M.O. | - | 22,958 | - | 22,734 | - | 22,692 |
| | | | | | | | |
| MRG | 1 | 0,146 | 23,469 | 0,220 | 23,245 | 0,293 | 23,317 |
| | 2 | 0,146 | 23,469 | 0,222 | 23,457 | 0,294 | 23,396 |
| | 3 | 0,142 | 22,824 | 0,215 | 22,716 | 0,291 | 23,157 |
| | 4 | 0,143 | 22,985 | 0,218 | 23,034 | 0,296 | 23,556 |
| | 5 | 0,148 | 23,791 | 0,222 | 23,457 | 0,289 | 22,998 |
| | 6 | 0,145 | 23,308 | 0,224 | 23,669 | 0,286 | 22,759 |
| | M.O. | - | 23,308 | - | 23,263 | - | 23,197 |
| | | | | | | | |
| CAR | 1 | 0,144 | 23,146 | 0,224 | 23,669 | 0,291 | 23,157 |
| | 2 | 0,148 | 23,791 | 0,222 | 23,457 | 0,293 | 23,317 |
| | 3 | 0,150 | 24,113 | 0,223 | 23,563 | 0,295 | 23,476 |
| | 4 | 0,147 | 23,630 | 0,219 | 23,140 | 0,299 | 23,795 |
| | 5 | 0,149 | 23,952 | 0,220 | 23,245 | 0,300 | 23,874 |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|
| | 6 | 0,144 | 23,146 | 0,218 | 23,034 | 0,297 | 23,635 |
| | M.O. | - | 23,630 | - | 23,351 | - | 23,542 |
| | | | | | | | |
| ABEA | 1 | 0,139 | 22,340 | 0,221 | 23,351 | 0,290 | 23,078 |
| | 2 | 0,143 | 22,985 | 0,215 | 22,716 | 0,287 | 22,838 |
| | 3 | 0,140 | 22,502 | 0,219 | 23,140 | 0,280 | 22,281 |
| | 4 | 0,141 | 22,663 | 0,211 | 22,293 | 0,285 | 22,679 |
| | 5 | 0,144 | 23,146 | 0,219 | 23,140 | 0,283 | 22,520 |
| | 6 | 0,143 | 22,985 | 0,215 | 22,716 | 0,280 | 22,281 |
| | M.O. | - | 22,770 | - | 22,893 | - | 22,613 |

5.1.1.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

5.1.1.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΔΥΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TWO-WAY ANOVA)

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να ελεγχθούν πριν την εφαρμογή της TWO-WAY ANOVA είναι:

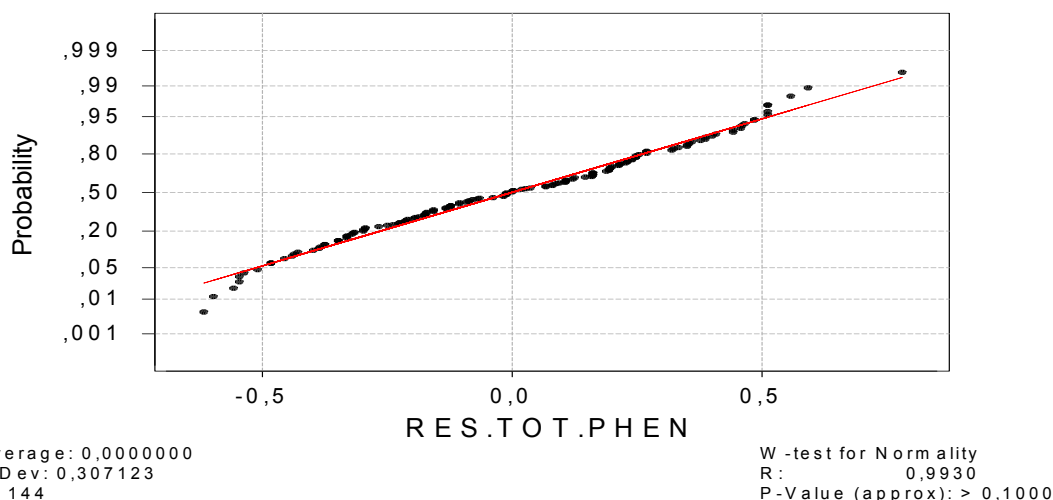
- **Να υπάρχει κανονικότητα.** Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής γίνεται με τη βοήθεια των υπολειμμάτων με τον έλεγχο Ryan- Joiner. Έτσι ο έλεγχος της κανονικότητας χρησιμοποιείται μόνο μία φορά και όχι επαναληπτικά τρεις φορές (Πετρίδης, 2000).
- **Οι διακυμάνσεις όλων των ομάδων θα πρέπει να είναι ίσες μεταξύ τους.** Οι έλεγχοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ομοιογένειας των διακυμάνσεων, είναι ο έλεγχος του Bartlett και του Levene.

5.1.1.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

H_0 : Η στήλη των υπολειμμάτων ακολουθεί την κανονική κατανομή.

H_A : Η στήλη των υπολειμμάτων δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή.

Normal Probability Plot



Σχήμα 9. Έλεγχος κανονικότητας της στήλης των υπολειμμάτων με τον έλεγχο **Ryan- Joiner**.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

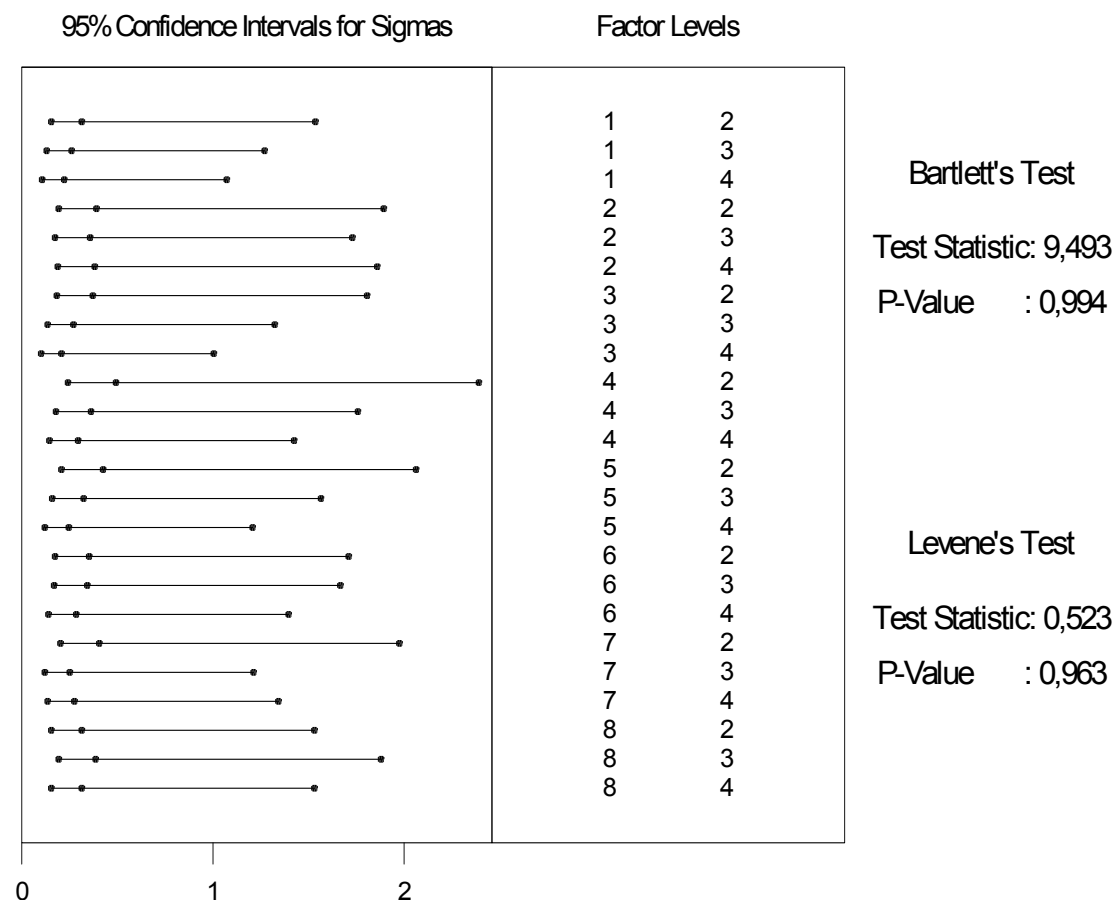
Από τον έλεγχο της κανονικής κατανομής, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των υπολειμμάτων μέσω του ελέγχου Ryan-Joiner, παρατηρούμε πως η τιμή του ελέγχου P είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,05 ($P > 0,05$), που σημαίνει ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση H_0 , δηλαδή η στήλη των υπολειμμάτων RES.TOT.PHEN των δειγμάτων, ακολουθεί κανονική κατανομή. Μένει τώρα να ελεγχθεί η ύπαρξη ομοιογένειας των διακυμάνσεων πριν να προχωρήσουμε σε two-way ANOVA.

5.1.1.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ

H_0 : Οι διακυμάνσεις είναι όλες ίσες.

H_A : Οι διακυμάνσεις δεν είναι όλες ίσες.

Test for Equal Variances for TOTAL PHENOL



Σχήμα 10. Έλεγχοι για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων συμπεραίνουμε ότι εφόσον η τιμή P του ελέγχου Bartlett είναι ίση με 0,994 και η τιμή του ελέγχου Levene είναι ίση με 0.963, δηλαδή $P > 0.05$ και ισχύει η μηδενική υπόθεση H_0 που σημαίνει ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα. Εφόσον λοιπόν, ισχύουν οι απαραίτητες προϋποθέσεις (κανονικότητα και ομοιογένεια) προχωράμε στην ανάλυση της διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA).

5.1.1.3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΔΥΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TWO-WAY ANOVA)

ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ

Μάρκα καφέ:

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8$

H_A : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Ποσότητα καφέ:

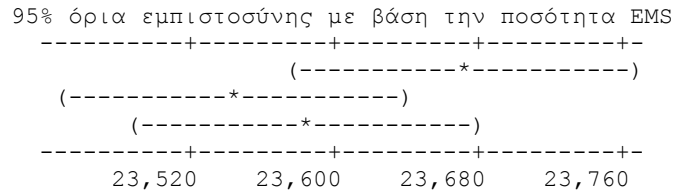
H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_A : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

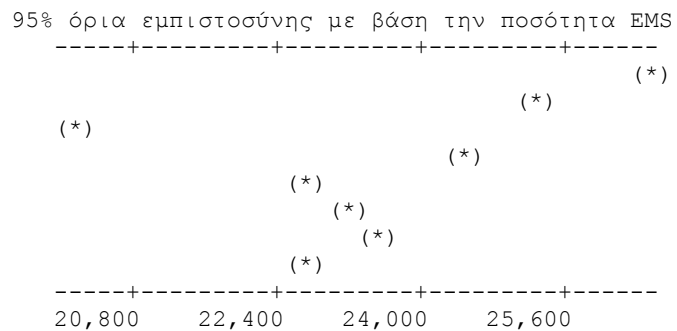
Ανάλυση της διακύμανσης της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών

| Πηγές μεταβλητότητας | DF | SS | MS | F | P |
|----------------------|-----|---------|--------|--------|-------|
| Ολική | 143 | 477,058 | | | |
| Ποσότητα καφέ (A) | 2 | 0,427 | 0,214 | 1,90 | 0,154 |
| Μάρκα καφέ (B) | 7 | 461,799 | 65,971 | 586,91 | 0,000 |
| Αλληλεπίδραση (AXB) | 14 | 1,343 | 0,096 | 0,85 | 0,610 |
| Σφάλμα | 120 | 13,488 | 0,112 | | |

| Ποσότητα καφέ | M.O. |
|---------------|--------|
| 2g | 23,674 |
| 3g | 23,543 |
| 4g | 23,584 |



| Μάρκα καφέ | M.O. |
|------------|--------|
| 1 | 26,582 |
| 2 | 25,311 |
| 3 | 20,180 |
| 4 | 24,411 |
| 5 | 22,795 |
| 6 | 23,256 |
| 7 | 23,508 |
| 8 | 22,759 |



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού δεν προκαλεί μεταβολή στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών, γιατί η πιθανότητα P είναι μεγαλύτερη από 0,05 ($P=0,154 > 0,05$) και επομένως ισχύει η μηδενική υπόθεση που λέει ότι όλοι οι μέσοι όροι είναι ίσοι. Αντιθέτως η διαφορετική μάρκα καφέ προκαλεί μεταβολή στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών, γιατί η πιθανότητα P είναι μικρότερη από 0,05 ($P=0,000 < 0,05$) και επομένως ισχύει η εναλλακτική υπόθεση που λέει ότι όλοι οι μέσοι όροι δεν είναι ίσοι (τουλάχιστον ένας διαφέρει). Δηλαδή όλοι οι καφέδες δεν έχουν την ίδια συγκέντρωση σε ολικές φαινολικές ουσίες. Για την εντόπιση των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων, αυτοί πρώτα διατάσσονται κατά φθίνουσα τάξη για να αξιολογηθούν οι κατά ζεύγη συγκρίσεις και ακολούθως εφαρμόζεται ο έλεγχος SNK. Δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της διαφορετικής ποσότητας σε καφέ και της διαφορετικής μάρκας καφέ γιατί η πιθανότητα P είναι μεγαλύτερη από 0,05 ($P=0,610 > 0,05$).

5.1.1.3.5. ΕΛΕΓΧΟΣ SNK (Student-Newman-Keuls)

Φθίνουσα διάταξη των μέσων όρων

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| \bar{X}_1 | \bar{X}_2 | \bar{X}_4 | \bar{X}_7 | \bar{X}_6 | \bar{X}_5 | \bar{X}_8 | \bar{X}_3 |
| 26,582 | 25,311 | 24,411 | 23,508 | 23,256 | 22,795 | 22,759 | 20,180 |

| Συγκρίσεις | Διαφορά των μέσων | Τυπικό σφάλμα | q | p | $q_{0,05,p,120}$ | Συμπέρασμα |
|------------|-------------------|---------------|--------|---|------------------|-------------|
| 1 vs 3 | 6,402 | 0,137 | 46,730 | 8 | 4,468 | $X_1 > X_3$ |
| 1 vs 8 | 3,823 | 0,137 | 27,905 | 7 | 4,363 | $X_1 > X_8$ |
| 1 vs 5 | 3,787 | 0,137 | 27,642 | 6 | 4,096 | $X_1 > X_5$ |
| 1 vs 6 | 3,326 | 0,137 | 24,277 | 5 | 3,917 | $X_1 > X_6$ |
| 1 vs 7 | 3,074 | 0,137 | 22,438 | 4 | 3,685 | $X_1 > X_7$ |
| 1 vs 4 | 2,171 | 0,137 | 15,847 | 3 | 3,356 | $X_1 > X_4$ |
| 1 vs 2 | 1,271 | 0,137 | 9,277 | 2 | 2,800 | $X_1 > X_2$ |
| 2 vs 3 | 5,131 | 0,137 | 37,453 | 7 | 4,363 | $X_2 > X_3$ |
| 2 vs 8 | 2,552 | 0,137 | 18,628 | 6 | 4,096 | $X_2 > X_8$ |
| 2 vs 5 | 2,516 | 0,137 | 18,365 | 5 | 3,917 | $X_2 > X_5$ |
| 2 vs 6 | 2,055 | 0,137 | 15 | 4 | 3,685 | $X_2 > X_6$ |
| 2 vs 7 | 1,803 | 0,137 | 13,161 | 3 | 3,356 | $X_2 > X_7$ |
| 2 vs 4 | 0,900 | 0,137 | 6,569 | 2 | 2,800 | $X_2 > X_4$ |
| 4 vs 3 | 4,231 | 0,137 | 30,883 | 6 | 4,096 | $X_4 > X_3$ |
| 4 vs 8 | 1,652 | 0,137 | 12,058 | 5 | 3,917 | $X_4 > X_8$ |
| 4 vs 5 | 1,616 | 0,137 | 11,796 | 4 | 3,685 | $X_4 > X_5$ |
| 4 vs 6 | 1,155 | 0,137 | 8,431 | 3 | 3,356 | $X_4 > X_6$ |
| 4 vs 7 | 0,903 | 0,137 | 6,591 | 2 | 2,800 | $X_4 > X_7$ |
| 7 vs 3 | 3,328 | 0,137 | 24,292 | 5 | 3,917 | $X_7 > X_3$ |
| 7 vs 8 | 0,749 | 0,137 | 5,467 | 4 | 3,685 | $X_7 > X_8$ |
| 7 vs 5 | 0,713 | 0,137 | 5,204 | 3 | 3,356 | $X_7 > X_5$ |

| | | | | | | |
|--------|-------|-------|--------|---|-------|-----------|
| 7 vs 6 | 0,252 | 0,137 | 1,839 | 2 | 2,800 | $X_7=X_6$ |
| 6 vs 3 | 3,076 | 0,137 | 22,453 | 4 | 3,685 | $X_6>X_3$ |
| 6 vs 8 | 0,497 | 0,137 | 3,628 | 3 | 3,356 | $X_6>X_8$ |
| 6 vs 5 | 0,461 | 0,137 | 3,365 | 2 | 2,800 | $X_6>X_5$ |
| 5 vs 3 | 2,615 | 0,137 | 19,088 | 3 | 3,356 | $X_5>X_3$ |
| 5 vs 8 | 0,036 | 0,137 | 0,263 | 2 | 2,800 | $X_5=X_8$ |
| 8 vs 3 | 2,579 | 0,137 | 18,825 | 2 | 2,800 | $X_8>X_3$ |

Τελικό συμπέρασμα

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| \bar{X}_1 | \bar{X}_2 | \bar{X}_4 | \bar{X}_7 | \bar{X}_6 | \bar{X}_5 | \bar{X}_8 | \bar{X}_3 |
| 26,582 | 25,311 | 24,411 | 23,508 | 23,256 | 22,795 | 22,759 | 20,180 |
| | | | ----- | ----- | | | |

Με τον έλεγχο SNK βρέθηκε ποιοι ελληνικοί καφέδες διαφέρουν και ποιοι είναι ίδιοι ως προς στην συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες. Στους καφέδες \bar{X}_7 και \bar{X}_6 και στους καφέδες \bar{X}_5 και \bar{X}_8 υπάρχει επικάλυψη των μέσων όρων που σημαίνει ότι η συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες είναι ίδια.

Δηλαδή ο έλεγχος μας λέει ότι ισχύει η ανισότητα:

$$\bar{X}_1 > \bar{X}_2 > \bar{X}_4 > \bar{X}_7 = \bar{X}_6 > \bar{X}_5 = \bar{X}_8 > \bar{X}_3$$

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συγκεκριμένα, ο καφές ΛΟΥΠΑΠ (26,582mg γαλλικού οξέος/g καφέ) έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές φαινολικές ουσίες από τους άλλους καφέδες, μετά είναι ο καφές ΒΚΛΑΣ (25,311mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά ο καφές ANT (24,411mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά οι καφέδες CAR (23,508mg γαλλικού οξέος/g καφέ) και MRG (23,256mg γαλλικού οξέος/g καφέ) οι οποίοι έχουν την ίδια συγκέντρωση, μετά οι καφέδες AB36

(22,795mg γαλλικού οξέος/g καφέ) και ΑΒΕΛ (22,759mg γαλλικού οξέος/g καφέ) οι οποίοι έχουν την ίδια συγκέντρωση και τέλος ο καφές ΚΟΚ (20,180mg γαλλικού οξέος/g καφέ) με την χαμηλότερη συγκέντρωση από όλους τους καφέδες.

5.1.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ABTS

5.1.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 4.4.2.1.2.), έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων Γαλλικού Οξέος στα 734nm με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 5.

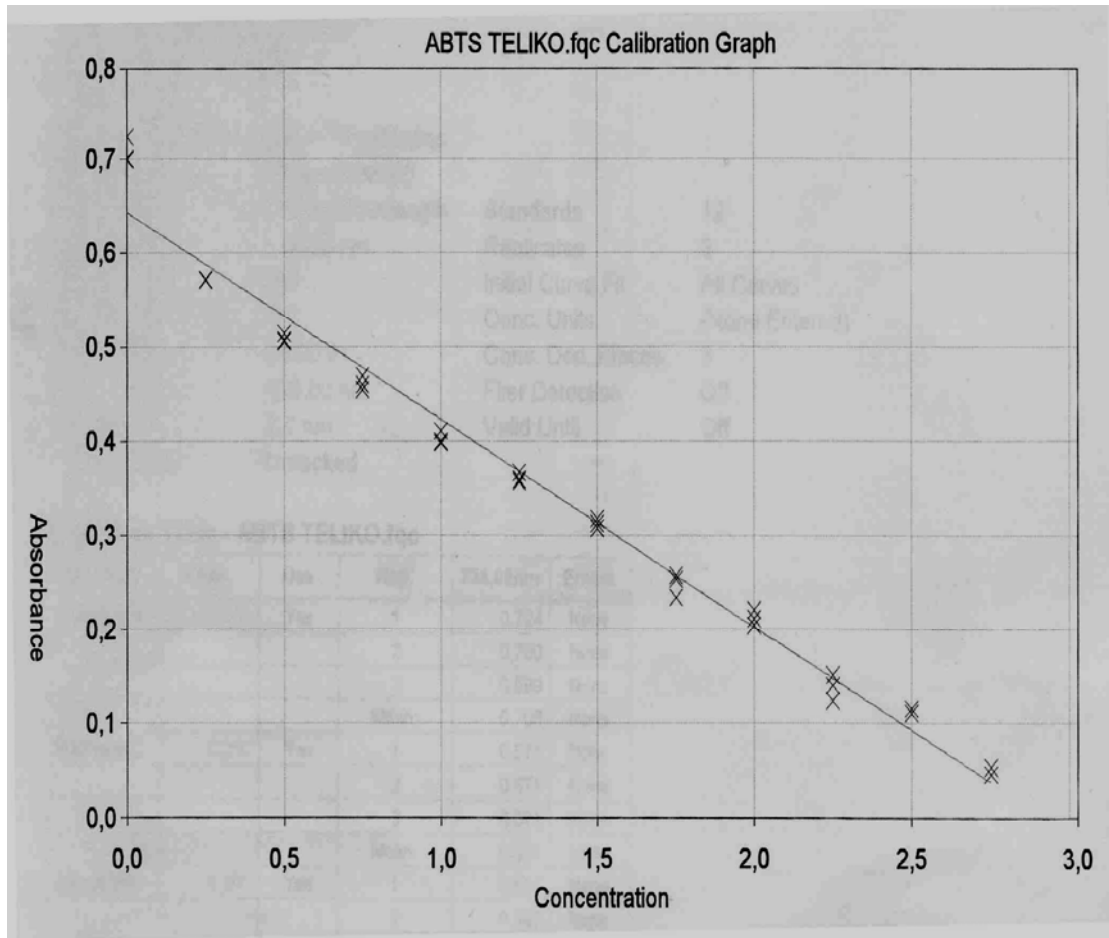
Πίνακας 5. Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS.

| μg Γαλλικού Οξέος | Απορρόφηση 734nm | Μ.Ο. Απορρόφησης |
|-------------------|-------------------------|------------------|
| 0,250 | 0,571 0,571 0,571 | 0,571 |
| 0,500 | 0,514 0,507 0,505 | 0,509 |
| 0,750 | 0,469 0,460 0,454 | 0,461 |
| 1,000 | 0,399 0,410 0,398 | 0,402 |

| | | |
|-------|-------------------------|-------|
| 1,250 | 0,359 0,366 0,357 | 0,361 |
| 1,500 | 0,307 0,312 0,317 | 0,312 |
| 1,750 | 0,258 0,234 0,254 | 0,248 |
| 2,000 | 0,221 0,204 0,211 | 0,212 |
| 2,250 | 0,124 0,140 0,151 | 0,138 |
| 2,500 | 0,115 0,111 0,111 | 0,112 |
| 2,750 | 0,053 0,046 0,046 | 0,048 |

Παίρνοντας τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε Πρότυπη Καμπύλη (Σχήμα 11) με άξονα Χ την συγκέντρωση σε μg του Γαλλικού Οξέος και άξονα Υ την μετρούμενη απορρόφηση στα 734nm.

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ABTS



Σχήμα 11. Πρότυπη Καμπύλη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS.

Η Πρότυπη Καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,983748 και ακολουθεί την εξίσωση $A = -0,2200C + 0,6427$ (όπου A η απορρόφηση στα 734nm (άξονας Y) και C η συγκέντρωση σε μg του γαλλικού οξέος (άξονας X)).

5.1.2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αξιολογήθηκαν δείγματα ελληνικού καφέ διαφορετικής μάρκας (ΛΟΥΠΑΠ, ΒΚΛΑΣ, ΚΟΚ, ΑΝΤ, ΑΒ36, ΜΡΓ, CΑR και ΑΒΕΛ) και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 734nm για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα έξι

φορές. Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της Πρότυπης Καμπύλης. Η αναγωγή των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $A = -0,2200C + 0,6427$. Κατόπιν έγινε μετατροπή των τιμών σε mg γαλλικού οξέος/g καφέ. Τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με τον εξής τρόπο: Από κάθε ελληνικό καφέ προστέθηκαν σε 3 ποτήρια ζέσεως των 50ml 2, 3 και 4g αντίστοιχα και 45ml νερό. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ηλεκτρικό μάτι στους 200°C. Κατόπιν έγινε απλή διήθηση με τη χρήση γυάλινου χωνιού διήθησης και διηθητικού χαρτιού. Το κάθε διήθημα αραιώθηκε 1/100 με απεσταγμένο νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml και χρησιμοποιήθηκε για εξέταση.

Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας.

Πίνακας 6. Συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (mg γαλλικού οξέος/g καφέ) στους οχτώ διαφορετικής μάρκας καφέδες μετά την προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ.

| ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΦΕ | Α/Α | ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (mg γαλλικού οξέος/g καφέ) | | | | | |
|---------------|-------------|--|--------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| | | ΔΕΙΓΜΑΤΑ | | | | | |
| | | 2g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | | 3g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | | 4g ΚΑΦΕ + 45ml ΝΕΡΟ | |
| | | A 734nm | mg γ.ο./ g καφέ | A 734nm | mg γ.ο./ g καφέ | A 734nm | mg γ.ο./ g καφέ |
| ΛΟΥΠΑΠ | 1 | 0,479 | 33,822 | 0,394 | 33,745 | 0,309 | 34,086 |
| | 2 | 0,471 | 35,475 | 0,392 | 34,016 | 0,305 | 34,494 |
| | 3 | 0,472 | 35,269 | 0,386 | 34,830 | 0,301 | 34,903 |
| | 4 | 0,475 | 34,649 | 0,394 | 33,745 | 0,300 | 35,005 |
| | 5 | 0,479 | 33,822 | 0,391 | 34,152 | 0,302 | 34,801 |
| | 6 | 0,471 | 35,475 | 0,386 | 34,830 | 0,309 | 34,086 |
| | M.O. | - | 34,752 | - | 34,220 | - | 34,562 |

| | | | | | | | |
|--------------|-------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|
| ΒΚΛΑΣ | 1 | 0,483 | 32,996 | 0,411 | 31,438 | 0,324 | 32,554 |
| | 2 | 0,483 | 32,996 | 0,409 | 31,710 | 0,328 | 32,145 |
| | 3 | 0,489 | 31,756 | 0,402 | 32,659 | 0,324 | 32,554 |
| | 4 | 0,483 | 32,996 | 0,405 | 32,252 | 0,335 | 31,430 |
| | 5 | 0,485 | 32,583 | 0,404 | 32,388 | 0,335 | 31,430 |
| | 6 | 0,489 | 31,756 | 0,402 | 32,659 | 0,336 | 31,328 |
| | M.O. | - | 32,514 | - | 32,185 | - | 31,907 |
| | | | | | | | |
| KOK | 1 | 0,533 | 22,665 | 0,467 | 23,840 | 0,402 | 24,586 |
| | 2 | 0,527 | 23,905 | 0,462 | 24,518 | 0,410 | 23,769 |
| | 3 | 0,523 | 24,731 | 0,468 | 23,704 | 0,409 | 23,871 |
| | 4 | 0,522 | 24,938 | 0,46 | 24,790 | 0,403 | 24,484 |
| | 5 | 0,527 | 23,905 | 0,459 | 24,925 | 0,406 | 24,178 |
| | 6 | 0,532 | 22,872 | 0,456 | 25,332 | 0,410 | 23,769 |
| | M.O. | - | 23,836 | - | 24,518 | - | 24,110 |
| | | | | | | | |
| ANT | 1 | 0,477 | 34,236 | 0,396 | 33,474 | 0,315 | 33,473 |
| | 2 | 0,477 | 34,236 | 0,405 | 32,252 | 0,320 | 32,962 |
| | 3 | 0,481 | 33,409 | 0,398 | 33,202 | 0,315 | 33,473 |
| | 4 | 0,484 | 32,789 | 0,401 | 32,795 | 0,321 | 32,860 |
| | 5 | 0,482 | 33,202 | 0,398 | 33,202 | 0,325 | 32,451 |
| | 6 | 0,484 | 32,789 | 0,400 | 32,931 | 0,317 | 33,269 |
| | M.O. | | 33,444 | | 32,976 | | 33,081 |
| | | | | | | | |
| AB36 | 1 | 0,506 | 28,244 | 0,427 | 29,267 | 0,360 | 28,876 |
| | 2 | 0,503 | 28,864 | 0,430 | 28,860 | 0,361 | 28,774 |
| | 3 | 0,500 | 29,483 | 0,428 | 29,132 | 0,367 | 28,161 |
| | 4 | 0,505 | 28,450 | 0,427 | 29,267 | 0,360 | 28,876 |
| | 5 | 0,504 | 28,657 | 0,426 | 29,403 | 0,356 | 29,285 |
| | 6 | 0,506 | 28,244 | 0,436 | 28,046 | 0,360 | 28,876 |
| | M.O. | - | 28,657 | - | 28,996 | - | 28,808 |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|
| MRG | 1 | 0,490 | 31,550 | 0,419 | 30,353 | 0,340 | 30,919 |
| | 2 | 0,491 | 31,343 | 0,417 | 30,624 | 0,343 | 30,613 |
| | 3 | 0,495 | 30,517 | 0,411 | 31,438 | 0,333 | 31,634 |
| | 4 | 0,494 | 30,723 | 0,415 | 30,896 | 0,336 | 31,328 |
| | 5 | 0,496 | 30,310 | 0,421 | 30,081 | 0,338 | 31,124 |
| | 6 | 0,498 | 29,897 | 0,419 | 30,353 | 0,340 | 30,919 |
| | M.O. | - | 30,723 | - | 30,624 | - | 31,090 |
| | | | | | | | |
| CAR | 1 | 0,498 | 29,897 | 0,430 | 28,860 | 0,363 | 28,570 |
| | 2 | 0,506 | 28,244 | 0,421 | 30,081 | 0,367 | 28,161 |
| | 3 | 0,502 | 29,070 | 0,433 | 28,453 | 0,359 | 28,979 |
| | 4 | 0,498 | 29,897 | 0,430 | 28,860 | 0,365 | 28,366 |
| | 5 | 0,500 | 29,483 | 0,433 | 28,453 | 0,355 | 29,387 |
| | 6 | 0,496 | 30,310 | 0,423 | 29,810 | 0,354 | 29,489 |
| | M.O. | - | 29,483 | - | 29,086 | - | 28,825 |
| | | | | | | | |
| ABEA | 1 | 0,491 | 31,343 | 0,418 | 30,488 | 0,349 | 30,000 |
| | 2 | 0,492 | 31,136 | 0,424 | 29,674 | 0,347 | 30,204 |
| | 3 | 0,500 | 29,483 | 0,417 | 30,624 | 0,353 | 29,591 |
| | 4 | 0,497 | 30,103 | 0,420 | 30,217 | 0,346 | 30,306 |
| | 5 | 0,497 | 30,103 | 0,425 | 29,539 | 0,355 | 29,387 |
| | 6 | 0,501 | 29,277 | 0,428 | 29,132 | 0,356 | 29,285 |
| | M.O. | - | 30,241 | - | 29,946 | - | 29,796 |

5.1.2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

5.1.2.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΔΥΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TWO-WAY ANOVA)

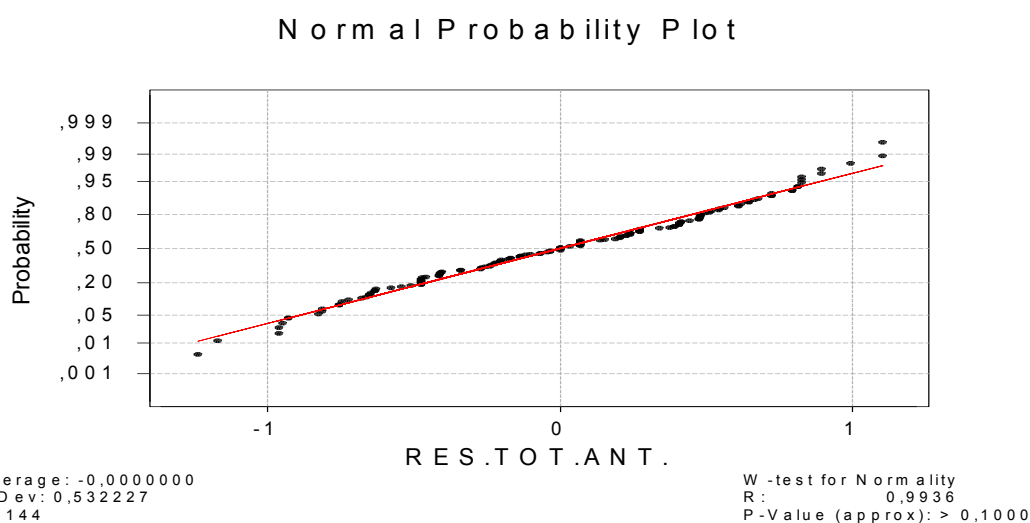
Οι απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να ελεγχθούν πριν την εφαρμογή της TWO-WAY ANOVA είναι:

- **Να υπάρχει κανονικότητα.** Ο έλεγχος της κανονικής κατανομής γίνεται με τη βοήθεια των υπολειμμάτων με τον έλεγχο Ryan- Joiner. Έτσι ο έλεγχος της κανονικότητας χρησιμοποιείται μόνο μία φορά και όχι επαναληπτικά τρεις φορές (Πετρίδης, 2000).
- **Οι διακυμάνσεις όλων των ομάδων θα πρέπει να είναι ίσες μεταξύ τους.** Οι έλεγχοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ομοιογένειας των διακυμάνσεων, είναι ο έλεγχος του Bartlett και του Levene.

5.1.2.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

H_0 : Η στήλη των υπολειμμάτων ακολουθεί την κανονική κατανομή.

H_A : Η στήλη των υπολειμμάτων δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή.



Σχήμα 12. Έλεγχος κανονικότητας της στήλης των υπολειμμάτων με τον έλεγχο Ryan-Joiner.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

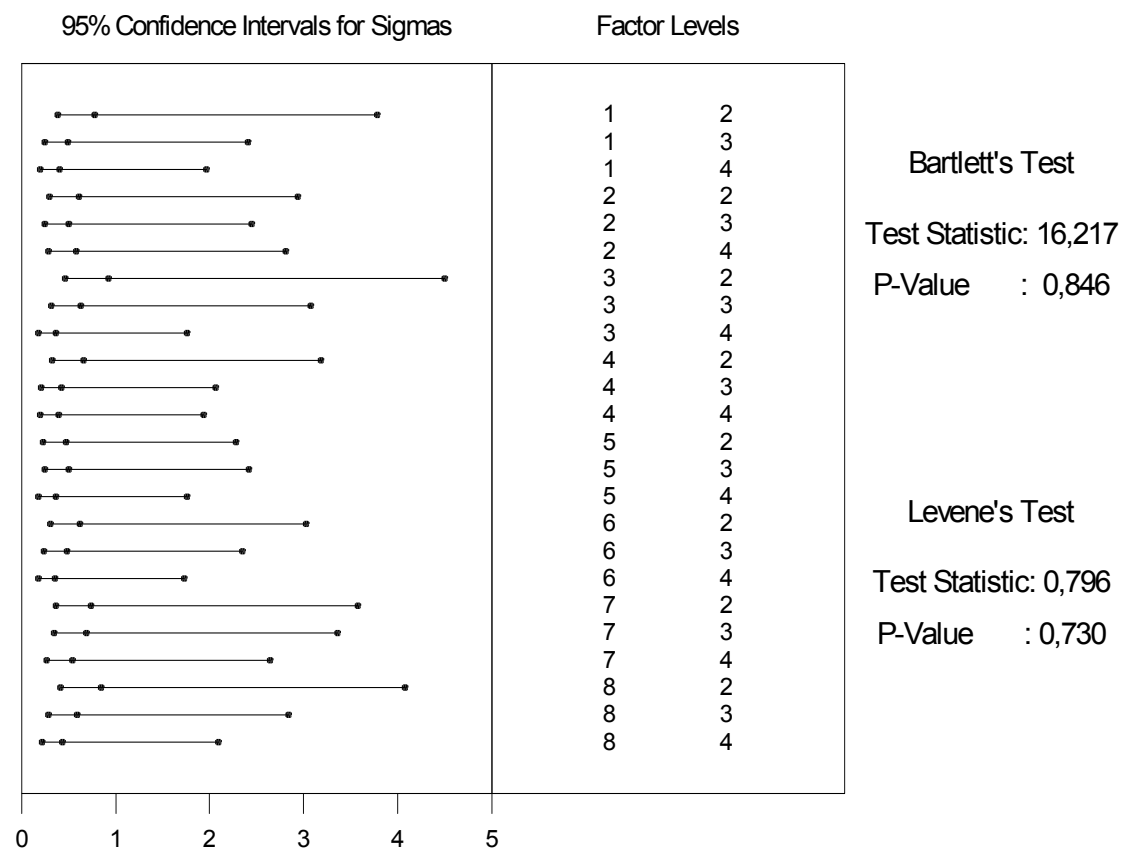
Από τον έλεγχο της κανονικής κατανομής, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των υπολειμμάτων μέσω του ελέγχου Ryan-Joiner, παρατηρούμε πως η τιμή του ελέγχου P είναι μεγαλύτερη της τιμής 0,05 ($P > 0,05$), που σημαίνει ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση H_0 , δηλαδή η στήλη των υπολειμμάτων RES.TOT.ANT. των δειγμάτων, ακολουθεί κανονική κατανομή. Μένει τώρα να ελεγχθεί η ύπαρξη ομοιογένειας των διακυμάνσεων πριν να προχωρήσουμε σε two-way ANOVA.

5.1.2.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΜΟΙΟΓΕΝΕΙΑΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΩΝ

H_0 : Οι διακυμάνσεις είναι όλες ίσες.

H_A : Οι διακυμάνσεις δεν είναι όλες ίσες.

Test for Equal Variances for TOTAL ANTIOX



Σχήμα 13. Έλεγχοι για την ομοιογένεια των διακυμάνσεων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων συμπεραίνουμε ότι εφόσον η τιμή P του ελέγχου Bartlett είναι ίση με 0,846 και η τιμή του ελέγχου Levene είναι ίση με 0.730, δηλαδή $P > 0.05$ και ισχύει η μηδενική υπόθεση H_0 που σημαίνει ότι υπάρχει ομοιογένεια των διακυμάνσεων για όλα τα δείγματα. Εφόσον λοιπόν, ισχύουν οι απαραίτητες προϋποθέσεις (κανονικότητα και ομοιογένεια) προχωράμε στην ανάλυση της διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA).

5.1.2.3.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΔΥΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (TWO-WAY ANOVA)

ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ

Μάρκα καφέ:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8$

H_A : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

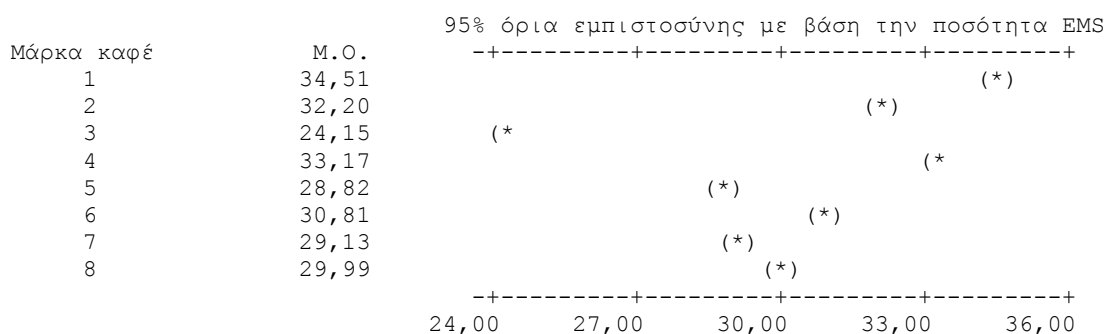
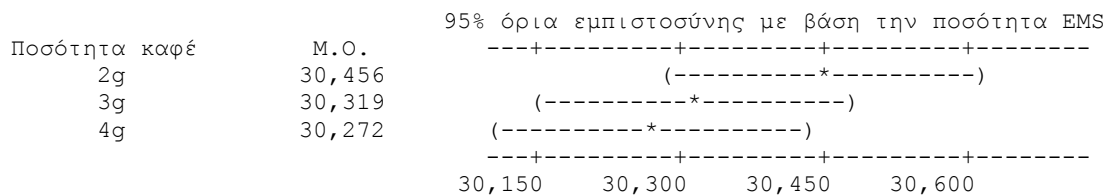
Ποσότητα καφέ:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_A : οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι

Ανάλυση της διακύμανσης της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

| Πηγές μεταβλητότητας | DF | SS | MS | F | P |
|----------------------|-----|----------|---------|--------|-------|
| Ολική | 143 | 1329,755 | | | |
| Ποσότητα καφέ (A) | 2 | 0,878 | 0,439 | 1,30 | 0,276 |
| Μάρκα καφέ (B) | 7 | 1282,129 | 183,161 | 542,61 | 0,000 |
| Αλληλεπίδραση (AXB) | 14 | 6,240 | 0,446 | 1,32 | 0,205 |
| Σφάλμα | 120 | 40,507 | 0,338 | | |



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού δεν προκαλεί μεταβολή στην αντιοξειδωτική ικανότητα, γιατί η πιθανότητα P είναι μεγαλύτερη από $0,05$ ($P=0,276 > 0,05$) και επομένως ισχύει η μηδενική υπόθεση που λέει ότι όλοι οι μέσοι όροι είναι ίσοι. Αντιθέτως η διαφορετική μάρκα καφέ προκαλεί μεταβολή στην συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, γιατί η πιθανότητα P είναι μικρότερη από $0,05$ ($P=0,000 < 0,05$) και επομένως ισχύει η εναλλακτική υπόθεση που λέει ότι όλοι οι μέσοι όροι δεν είναι όλοι ίσοι (τουλάχιστον ένας διαφέρει). Δηλαδή όλοι οι καφέδες δεν έχουν την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα. Για την εντόπιση των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων, αυτοί πρώτα διατάσσονται κατά φθίνουσα τάξη για να αξιολογηθούν οι κατά ζεύγη συγκρίσεις και ακολούθως εφαρμόζεται ο έλεγχος SNK. Δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της διαφορετικής ποσότητας σε καφέ και της διαφορετικής μάρκας καφέ γιατί η πιθανότητα P είναι μεγαλύτερη από $0,05$ ($P=0,205 > 0,05$).

5.1.2.3.5. ΕΛΕΓΧΟΣ SNK (Student-Newman-Keuls)

Φθίνουσα διάταξη των μέσων όρων

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| \bar{X}_1 | \bar{X}_4 | \bar{X}_2 | \bar{X}_6 | \bar{X}_8 | \bar{X}_7 | \bar{X}_5 | \bar{X}_3 |
| 34,51 | 33,17 | 32,20 | 30,81 | 29,99 | 29,13 | 28,82 | 24,15 |

| Συγκρίσεις | Διαφορά των μέσων | Τυπικό σφάλμα | q | p | $q_{0,05,p,120}$ | Συμπέρασμα |
|------------|-------------------|---------------|--------|---|------------------|-------------|
| 1 vs 3 | 10,36 | 0,237 | 43,713 | 8 | 4,468 | $X_1 > X_3$ |
| 1 vs 5 | 5,69 | 0,237 | 24,008 | 7 | 4,363 | $X_1 > X_5$ |
| 1 vs 7 | 5,38 | 0,237 | 22,700 | 6 | 4,096 | $X_1 > X_7$ |
| 1 vs 8 | 4,52 | 0,237 | 19,072 | 5 | 3,917 | $X_1 > X_8$ |
| 1 vs 6 | 3,7 | 0,237 | 15,612 | 4 | 3,685 | $X_1 > X_6$ |
| 1 vs 2 | 2,31 | 0,237 | 9,747 | 3 | 3,356 | $X_1 > X_2$ |
| 1 vs 4 | 1,34 | 0,237 | 5,654 | 2 | 2,800 | $X_1 > X_4$ |
| 4 vs 3 | 9,02 | 0,237 | 38,059 | 7 | 4,363 | $X_4 > X_3$ |
| 4 vs 5 | 4,35 | 0,237 | 18,354 | 6 | 4,096 | $X_4 > X_5$ |
| 4 vs 7 | 4,04 | 0,237 | 17,046 | 5 | 3,917 | $X_4 > X_7$ |
| 4 vs 8 | 3,18 | 0,237 | 13,418 | 4 | 3,685 | $X_4 > X_8$ |
| 4 vs 6 | 2,36 | 0,237 | 9,958 | 3 | 3,356 | $X_4 > X_6$ |
| 4 vs 2 | 0,97 | 0,237 | 4,093 | 2 | 2,800 | $X_4 > X_2$ |
| 2 vs 3 | 8,05 | 0,237 | 33,966 | 6 | 4,096 | $X_2 > X_3$ |
| 2 vs 5 | 3,38 | 0,237 | 14,262 | 5 | 3,917 | $X_2 > X_5$ |
| 2 vs 7 | 3,07 | 0,237 | 12,954 | 4 | 3,685 | $X_2 > X_7$ |
| 2 vs 8 | 2,21 | 0,237 | 9,325 | 3 | 3,356 | $X_2 > X_8$ |
| 2 vs 6 | 1,39 | 0,237 | 5,865 | 2 | 2,800 | $X_2 > X_6$ |
| 6 vs 3 | 6,66 | 0,237 | 28,101 | 5 | 3,917 | $X_6 > X_3$ |
| 6 vs 5 | 1,99 | 0,237 | 8,397 | 4 | 3,685 | $X_6 > X_5$ |
| 6 vs 7 | 1,68 | 0,237 | 7,089 | 3 | 3,356 | $X_6 > X_7$ |

| | | | | | | |
|--------|------|-------|--------|---|-------|-------------|
| 6 vs 8 | 0,82 | 0,237 | 3,460 | 2 | 2,800 | $X_6 > X_8$ |
| 8 vs 3 | 5,84 | 0,237 | 24,641 | 4 | 3,685 | $X_8 > X_3$ |
| 8 vs 5 | 1,17 | 0,237 | 4,937 | 3 | 3,356 | $X_8 > X_5$ |
| 8 vs 7 | 0,86 | 0,237 | 3,629 | 2 | 2,800 | $X_8 > X_7$ |
| 7 vs 3 | 4,98 | 0,237 | 21,013 | 3 | 3,356 | $X_7 > X_3$ |
| 7 vs 5 | 0,31 | 0,237 | 1,308 | 2 | 2,800 | $X_7 = X_5$ |
| 5 vs 3 | 4,67 | 0,237 | 19,705 | 2 | 2,800 | $X_5 > X_3$ |

Τελικό συμπέρασμα

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| \bar{X}_1 | \bar{X}_4 | \bar{X}_2 | \bar{X}_6 | \bar{X}_8 | \bar{X}_7 | \bar{X}_5 | \bar{X}_3 |
| 34,51 | 33,17 | 32,20 | 30,81 | 29,99 | 29,13 | 28,82 | 24,15 |

Με τον έλεγχο SNK βρέθηκε ποιοι ελληνικοί καφέδες διαφέρουν και ποιοι είναι ίδιοι ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στους καφέδες \bar{X}_7 και \bar{X}_5 υπάρχει επικάλυψη των μέσων όρων που σημαίνει ότι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ίδια.

Δηλαδή ο έλεγχος μας λέει ότι ισχύει η ανισότητα:

$$\bar{X}_1 > \bar{X}_4 > \bar{X}_2 > \bar{X}_6 > \bar{X}_8 > \bar{X}_7 = \bar{X}_5 > \bar{X}_3$$

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

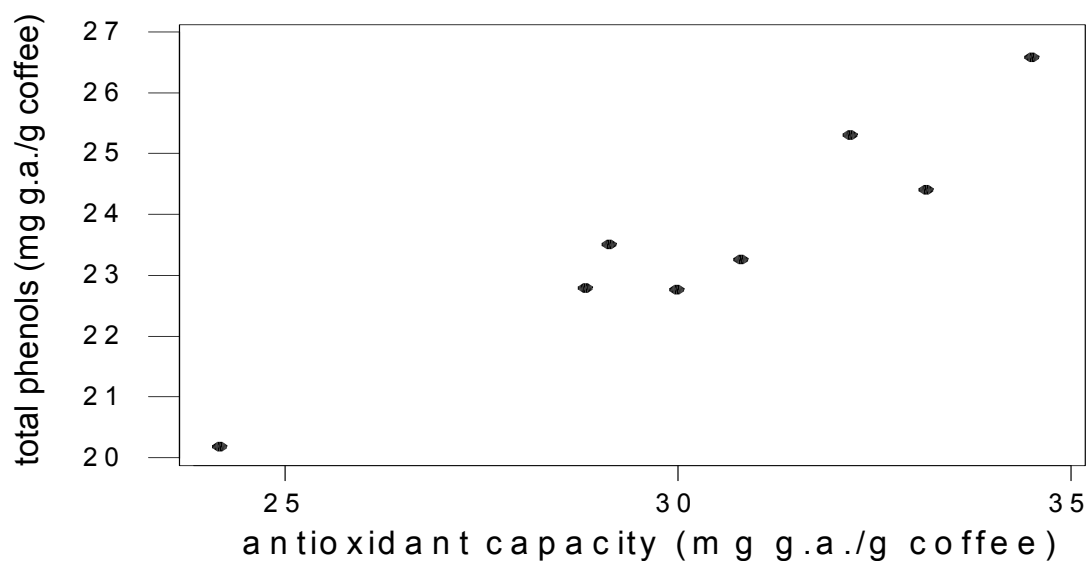
Συγκεκριμένα, ο καφές ΛΟΥΠΑΠ (34,51mg γαλλικού οξέος/g καφέ) έχει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους άλλους καφέδες, μετά είναι ο καφές ANT (33,17mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά ο καφές ΒΚΛΑΣ (32,20mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά ο καφές MRG (30,81mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά ο καφές ΑΒΕΛ (29,99mg γαλλικού οξέος/g καφέ), μετά οι καφέδες CAR

(29,13mg γαλλικού οξέος/g καφέ) και AB36 (28,82mg γαλλικού οξέος/g καφέ) οι οποίοι έχουν την ίδια συγκέντρωση και τέλος ο καφές ΚΟΚ (24,15mg γαλλικού οξέος/g καφέ) με την χαμηλότερη συγκέντρωση από όλους τους καφέδες.

5.1.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Πίνακας 7. Μέσοι όροι συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών (mg γ.ο./g καφέ) και αντιοξειδωτικής ικανότητας (mg γ.ο./g καφέ) των ελληνικών καφέδων.

| ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΦΕ | ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ (mg γ.ο./g καφέ) | ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (mg γ.ο./g καφέ) |
|---------------|------------------------------------|---|
| ΛΟΥΠΑΠ | 26,582 | 34,51 |
| ΒΚΛΑΣ | 25,311 | 32,20 |
| ΚΟΚ | 20,180 | 24,15 |
| ΑΝΤ | 24,411 | 33,17 |
| ΑΒ36 | 22,795 | 28,82 |
| ΜΡΓ | 23,256 | 30,81 |
| CΑR | 23,508 | 29,13 |
| ΑΒΕΛ | 22,759 | 29,99 |



Σχήμα 14. Συσχέτιση συγκέντρωσης ολικών φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής ικανότητας των ελληνικών καφέδων.

Correlations: total phenols (mg g.a./g coffee) and antioxidant capacity (mg g.a./g coffee)

Pearson correlation of total phenols (mg g.a./g coffee) and antioxidant capacity (mg g.a./g coffee) = 0,948

P-Value = 0,000

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τον έλεγχο που έγινε φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ελληνικών καφέδων αφού η ακριβής πιθανότητα P-Value= 0,000 είναι μικρότερη του επιπέδου 0,05. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson είναι 0,948 και δείχνει ότι η ένταση της συσχέτισης είναι ισχυρώς θετική, αφού πλησιάζει την μονάδα.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Οι ελληνικοί καφέδες που εξετάστηκαν διαφέρουν ως προς την συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες εκτός από τους ελληνικούς καφέδες CAR και MRG που είναι ισοδύναμοι ως προς την συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες και ομοίως οι ελληνικοί καφέδες AB36 και ABEΛ.
2. Οι ελληνικοί καφέδες που εξετάστηκαν διαφέρουν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα εκτός από τους ελληνικούς καφέδες CAR και AB36 που είναι ισοδύναμοι ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.
3. Στους ελληνικούς καφέδες η διαφορετική μάρκα επηρεάζει την τελική συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (υπολογιζόμενη σε mg γ.ο./g καφέ).
4. Στους ελληνικούς καφέδες η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας καφέ στην ίδια ποσότητα νερού δεν επηρεάζει την τελική συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (υπολογιζόμενη σε mg γ.ο./g καφέ).
5. Δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της διαφορετικής μάρκας ελληνικού καφέ και της προσθήκης διαφορετικής ποσότητας ελληνικού καφέ στην ίδια ποσότητα νερού.
6. Διαπιστώνεται η ύπαρξη ισχυρής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ελληνικών καφέδων.
7. Ο ελληνικός καφές αποτελεί μία σημαντική πηγή φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικών χρήσιμων για την υγεία του ανθρώπου.

7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

1. Επέκταση της συγκεκριμένης ερευνητικής δραστηριότητας με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.
2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ελληνικούς καφέδες που έχουν βράσει σε διαφορετικές θερμοκρασίες.
3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ελληνικούς καφέδες με την προσθήκη ζάχαρης σε διάφορες συγκεντρώσεις.
4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ελληνικούς καφέδες με την προσθήκη γάλακτος σε διάφορες αναλογίες.
5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ελληνικούς καφέδες με άλλες μεθόδους ανάλυσης.
6. Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών με τις διάφορες μεθόδους χρωματογραφίας.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Balentine, D.A., Wiseman, S.A. and Bouwens, L.C.M. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 693-704.

Belitz, H.D. and Grosch, W. (1999). Coffee, Tea, Cocoa. In: *Food Chemistry*, 4th Edition, pp. 874-904, Springer-Verlag, Berlin Germany.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Anal. Biochem.*, **239**, 70-76.

Borrelli, R.C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M. and Fogliano, V. (2002). Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6527-6533.

Cammerer, B. and Kroh, L.W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.*, **223**, 469–474.

Charalambous, G. (1986). Coffee. In: *Handbook of Food and Beverage Stability: Chemical Biochemical, Microbiological and Nutritional Aspects*, pp. 686-717, Clarke R., Academic Press, Inc. USA.

Crews, H.M., Olivier, L. and Wilson, L.A. (2001). Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. *Food Addit. Contam.*, **18**, 1075-1087.

Dam, R.M. (2006). Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **16**, 69-77.

Dorea, J.G. and da Costa, T.H.M. (2005). Review article: Is coffee a functional food? *Brit. J. Nutr.* **93**, 773-782.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, **37**, 277–285.

Farah, A. and Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18(1)**, 23-36.

Gehrig, M. and Schulmeyr, J. (1997). Supercritical CO₂ tea decaffeination. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 315-316, Germany.

Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K. and Gummadi S.N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 225-232, India.

Gonzalez, A.G., Pablos, F., Martin, M.J., Leon-Camacho, M. and Valdenebro, M.S. (2001). HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry*, **73**, 93–101.

Harborne, J.B. (1997). *Plant Phenolics in Methods in Plant Biochemistry*. p.p. 197-199, Academy Press, London.

Halvorsen, B., Holte, K., Myhrstad, M., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S., Wold, A., Haffner, K., Baugerd, H., Andersen, L., Moskaug, J., Jacobs, D., Jr. and Rune Blomhoff (2002). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *Journal of Nutrition*, **132**, 461-471.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.

Higdon, J.V. and Frei, B. (2006). Coffee and health: A review of recent human research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46(2)**, 101-123.

Huang, D., Ou, B., and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856.

Knox, K. and Huffaker, J.S. (1997). What is coffee pp.1-14, Roasting and Blending pp.74-80. In: *Coffee Basics a quick and easy guide*, John Wiley and Sons Inc., New York.

Lee, F.A. (1975). Coffee. In: *Basic Food Chemistry*, pp.282-303, The AVI Publishing Company, Inc., New York.

Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing, capacity and inhibition of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, **295**, 141–154.

Lopez-Galilea, I., Andueza, S., Leonardo, I. and Pena M.P. (2006). Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chemistry*, **94**, 75–80.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79(5)**, 727-747.

Mazzafera, P. (1999). Chemical composition of defective coffee beans. *Food Chemistry*, **64**, 547-554.

Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M. and Duran, N. (2003). Phenolic Compounds and Total Antioxidant Potential of Commercial Wines. *Food Chemistry*, **82**, 409-416.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **26(2)**, 212.

Packer, L. and Colman, C. (1999). *The Antioxidant Miracle*, pp. 16-18, 175-177, INC, Canada.

Parras, P., Martinez-Tome, M., Jimenez, A.M. and Murcia, M.A. (2007). Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, **102**, 582–592.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon M. (2001). *Antioxidants in Food Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited.

Prior, R.L., Wu, X.L. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(10)**, 4290–4302.

Ratty, A.K. and Das, N.P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biohem.Med.Metab.Biol.* **39**, 69-79.

Roberfroid, M. and Calderon, P. (1990). *Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological System*, 1,17-19, Belgium.

Roginsky, V. and Lissi, E.A. (2004). Review of Methods to Determine Chain-Breking Antioxidant Activity in Food. *Food Chemistry*, **92**, 235-254.

Sebald, J., Schulmeyr, J. and Foster, A. (1996). Decaffeination of black tea. *Trends in Food Science and Technology*, **7**, 99, Germany.

Senol, A. and Aydin, A. (2005). Solid-liquid extraction of caffeine from tea waste using battery type extractor: Process optimization. *Journal of Food Engineering*, Turkey.

Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992). Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **23**, 67-103.

Soobratee, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Auroma, O. and Bahorum, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research, 579, 200-213.

Tsimidou, M., Papadopoulos, G. and Boskou, D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil - Part I. Food Chemistry, **45**, 141-144.

Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Troncoso, A.M. and Garcia-Parrilia, M.C. (2004). The Antioxidant Activity of Wines Determined by the ABTS⁺ Method: Influence of Sample Dilution and Time, Talanta, **64**, 501-509.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αρβανιτογιάννης, Ι.Σ., Σάνδρου, Δ., Κούρτης, Λ. (2001). Ασφάλεια τροφίμων: Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Σελ. 338-341, Univercity Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Γαλάρης, Δ. και Δούλιας, Π.Θ. (2001). Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. Χημικά Χρονικά, **2**, 49-50.

Γεράρδης, Τ. (1998). Ο καφές ένα αραβικό παραμύθι. Πρώτη Έκδοση, σελ. 81-102, Τροχαλία, Αθήνα.

Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2003). Καφές. Τόμος Β', σελ. 247-250, Γενικό Χημείο Κράτους.

Μπόσκος, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. 4^η Έκδοση, Κεφ. ΙΧ, σελ. 230-232, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.

Παπαγεωργίου, Γ.Ε. (2005). Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδάση. University Studio Press, σελ. 114-126, Θεσσαλονίκη.

Πετρίδης, Δ. (2000). Εφαρμοσμένη Στατιστική με έμφαση στην επιστήμη των τροφίμων. Κεφ.7, σελ. 89-112,168-171, Κεφ.8, σελ. 173,209-214, Εκδόσεις Όμηρος, Θεσσαλονίκη.

Σουφλερός, Ε. (1997). Οίνος και Αποστάγματα – Μέθοδοι Ανάλυσης. Κεφ.18, σελ.116-119, Τυπογραφία Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Υπολογισμός των μg γαλλικού οξέος που υπάρχουν στα πέντε πρότυπα διαλύματα.

Για το πρότυπο διάλυμα 0.1ml γαλλικού οξέος.

Από το πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος πάρθηκαν 0.1ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml η οποία κατόπιν συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή. Από αυτή πάρθηκε ποσότητα 50ml και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Άρα:

0,5g γαλλικού οξέος στα 100ml διαλύματος
X; 0.1ml διαλύματος

$X = 0,0005\text{g} = 500\mu\text{g}$ γαλλικού οξέος

500 μg γαλλικού οξέος στα 100000ml διαλύματος
Y; 50ml διαλύματος

$Y = 0,25\mu\text{g}$ γαλλικού οξέος

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται ο υπολογισμός στα άλλα τέσσερα πρότυπα διαλύματα.