



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
Π.Μ.Σ. "Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία - Μελέτη και αξιοποίηση
φυσικών προϊόντων"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση μεθόδων τεχνητής γήρανσης στο προφίλ των δευτερογενών
μεταβολιτών του saffron»

Παρασκευή Δ. Καρασταμάτη

Επιβλέπων Αν. Καθ. Π. Α. Ταραντίλης



ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014

ΑΘΗΝΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
Π.Μ.Σ. "Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία - Μελέτη και αξιοποίηση
φυσικών προϊόντων"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Επίδραση μεθόδων τεχνητής γήρανσης στο προφίλ των δευτερογενών
μεταβολιτών του saffron»

Παρασκευή Δ. Καρασταμάτη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων: Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη: Πολυσίου Μόσχος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Παππάς Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014

ΑΘΗΝΑ

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της μεταπτυχιακής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στη διεκπεραίωση της.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Ταραντίλη Πέτρο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση το θέματος της συγκεκριμένης διατριβής. Η συνεχής και σταθερή επιστημονική του καθοδήγηση, οι πολύτιμες συμβουλές του και η ουσιαστική βοήθεια του συνέβαλαν καθοριστικά σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Επίσης του είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρουσιάσω το θέμα της διατριβής μου στο ετήσιο συνέδριο Saffronomics 2014, που πραγματοποιήθηκε στο Wageningen της Ολλανδίας, καθώς η συμμετοχή μου σε αυτό υπήρξε μοναδική εμπειρία.

Ακολουθως, ευχαριστώ ιδιαίτερως τον κ. Πολυσίου Μόσχο και Παππά Χρήστο, καθηγητές και μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, για τη φιλική τους στάση και την προθυμία τους να με συμβουλέψουν όποτε το χρειάστηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τη φίλη μου και συνεργάτιδα μου, Χριστίνα Μήτση, αρχικά για την παρακίνηση της να ενασχοληθώ με το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό και μετέπειτα για την ουσιαστική και πολύτιμη συμβολή της στο σχεδιασμό και υλοποίηση των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, συναδέλφους και συμφοιτητές, για την αρμονική συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς.

Τέλος, αλλά πάνω απ' όλα οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την συμπαράσταση και υποστήριξη τους, ηθική και υλική, όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, και τον Βαγγέλη, που όποτε το χρειάζομαι είναι εκεί και μου κρατάει το χέρι.

Καρασταμάτη Παρασκευή

Οκτώβριος 2014, Αθήνα



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Το όνομα, η προέλευση και η ιστορία του φυτού <i>Crocus sativus</i> L.	1
2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά	2
3. Καλλιέργεια, συγκομιδή και επεξεργασία	4
4. Το saffron.....	7
5. Χρήσεις του saffron	7
6. Χημική σύσταση του saffron	9
6.1. Βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron	10
6.2. Παράγοντες που επιδρούν ποιοτικά και ποσοτικά στους βασικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron.....	12
6.2.1. Συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και της συγκομιδής	13
6.2.2. Συνθήκες κατά την ξήρανση των στιγμάτων	14
6.2.3. Συνθήκες κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και συντήρησης.....	14
7. Σκοπός του πειράματος	16
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
8. Φυτικό υλικό και στάδια πειραματικής πορείας	17
9. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση	18
9.1. Επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση θερμότητας.....	18
9.2. Επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)	18
9.3. Προετοιμασία δειγμάτων για εκχύλιση	19
9.4. Παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων με την τεχνική της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (USAE)	19
10. Μέθοδοι ανάλυσης	20
10.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD)	20
10.2. Φασματοσκοπίες FT-IR και Raman.....	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29

11. Αποτελέσματα επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανση με χρήση θερμότητας.....	29
11.1. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με HPLC-DAD	29
11.2. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με FT-IR και Raman	31
12. Αποτελέσματα επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)	33
12.1. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με HPLC-DAD	33
12.2. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με FT-IR και Raman	36
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	46

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επίδραση μεθόδων τεχνητής γήρανσης στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του Saffron

Το saffron είναι το μπαχαρικό που παράγεται από τα κόκκινα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στη δυτική περιφέρεια της Μακεδονίας, στο Νομό Κοζάνης. Λόγω της χημικής του σύστασης, είναι ένα από τα λίγα μπαχαρικά που καταφέρνει να συνδυάσει χρώμα, γεύση και άρωμα, γεγονός που το καθιστά ένα δημοφιλές πρόσθετο τροφίμων στην παγκόσμια αγορά. Οι οργανοληπτικές αυτές ιδιότητες οφείλονται στις κροκίνες, στην πικροκροκίνη και στη σαφρανάλη αντίστοιχα και αποτελούν τους βασικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron, που ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στα στίγματα, καθορίζεται και η ποιότητα του. Υπάρχουν διάφοροι εξωγενείς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση των βασικών δευτερογενών μεταβολιτών, τόσο κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του φυτού, όσο και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης του saffron.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επικεντρώνεται στους παράγοντες της θερμοκρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας και αξιολογεί την επίδραση τους σε δείγματα ελληνικού saffron, μέσω δύο επιταχυνόμενων τεχνικών γήρανσης. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση θερμότητας, κατά την οποία στα δείγματα εφαρμόστηκαν οκτώ διαφορετικές θερμοκρασίες, σταδιακά αυξανόμενες (50°C, 70 °C, 90 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C, 150°C), για 2 ώρες στην κάθε μία. Η δεύτερη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας UV, κατά την οποία τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μεταχειρίσεις δύο παραγόντων, αποτελούμενες από διαφορετικού μήκους κύματος ακτινοβολίες (254nm και 365nm) και διαφορετικά επίπεδα διάρκειας (24, 48 και 72 ώρες). Τα δείγματα στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με νερό χρησιμοποιώντας λουτρό υπερήχων, για την παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών, για την αξιολόγηση του προφίλ τους, επιτεύχθηκε με τη χρήση μεθόδων χρωματογραφίας (HPLC-DAD) και φασματοσκοπίας (FT-IR και Raman).

Με την εφαρμογή της θερμικής επιταχυνόμενης γήρανσης στα εξεταζόμενα δείγματα, όλες οι μέθοδοι ανάλυσης έδωσαν ξεκάθαρα αποτελέσματα στις αλλαγές του συνολικού προφίλ των κύριων συστατικών. Κατά την σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας: 1) η συγκέντρωση της πικροκροκίνης μειώνεται, με τη μετατροπή της σε σαφρανάλη (HPLC-DAD), 2) η στερεοχημική διάταξη των κροκινών αλλάζει, με την

μετατροπή των *trans*-κροκινών σε *cis*-κροκίνες (HPLC-DAD), 3) το συνολικό προφίλ των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών, εκφρασμένο σε ποσοστό ομοιότητας του φάσματος του αμεταχείριστου δείγματος σε σχέση με τα φάσματα των αντίστοιχων μεταχειρισμένων, έδειξε φθίνουσα τάση (FT-IR και Raman). Όσον αφορά την εφαρμογή της επιταχυνόμενης γήρανσης με ακτινοβολία UV στα εξεταζόμενα δείγματα, τα αποτελέσματα εξαρτήθηκαν άμεσα από τις μεθόδους ανάλυσης: 1) η HPLC-DAD δεν έδειξε σαφή τάση για τις αλλαγές των συστατικών μεμονομένα, 2) οι FT-IR και Raman έδειξαν φθίνουσα τάση στο συνολικό προφίλ των βασικών δευτερογενών μεταβολιτών, το οποίο εκφράστηκε σε ποσοστό ομοιότητας του φάσματος του αμεταχείριστου δείγματος σε σχέση με τα φάσματα των αντίστοιχων μεταχειρισμένων, όπως και στην περίπτωση της θερμικής επιταχυνόμενης γήρανσης.

Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Οκτώβριος 2014

<u>Λέξεις κλειδιά:</u> saffron, <i>Crocus sativus</i> L., κρόκος, επιταχυνόμενη γήρανση, θέρμανση, ακτινοβολία UV, HPLC, FT-IR, Raman.
--

ABSTRACT

Influence of different accelerated ageing methods on the profile of secondary metabolites of saffron

Saffron is the spice derived from the red dried stigmas of the flower of *Crocus sativus* L. In Greece it is grown in the western region of Macedonia (Kozani). Due to its chemical composition, it is one of the few spices and popular food additives that combines color, taste and aroma. Crocins, picrocrocin and safranal, respectively, are responsible for these organoleptic properties, consisting the main secondary metabolites of saffron. Their concentration in the stigmas, determines its quality. There are several exogenous factors that are able to affect the concentration of the main secondary metabolites during the cultivation of the plant, the processing and storage of saffron.

The aim of the present study was to evaluate the influence of two accelerated ageing techniques on the profile of the main secondary metabolites (picrocrocin, safranal, *cis*- and *trans*-crocetin esters) of saffron. The techniques employed included (a) a thermal and (b) a UV accelerated ageing process. During ageing, the stigma samples were subjected to eight different treatments (i.e. 50°C, 70°C, 90°C, 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C) lasting 2 h each. Additionally, in respect of the UV ageing process, stigmas were subjected to two-factor treatments, consisting of different radiation (254nm and 365nm) and duration (24 h, 48 h and 72 h) levels. The treated stigmas were subsequently extracted with water using an ultrasound bath. The profile of saffron aqueous extracts was evaluated by means of High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection (HPLC-DAD). Furthermore, the aqueous extracts were analyzed employing both FT-IR and Raman spectroscopies.

As it concerns the thermal accelerated aging technique, all methods of analysis gave clear results about the changes on the total profile of the main components. During the gradual increase in temperature: 1) the concentration of picrocrocin decreased, transforming to safranal (HPLC-DAD), 2) *trans*-crocins decreased, transforming to *cis*-crocins (HPLC- DAD), 3) the total profile of the main secondary metabolites, expressed by the match value between control and treated samples' spectra, tends to decrease. Regarding to the accelerated aging technique using UV irradiation, the results depended on the methods of analysis: 1) HPLC-DAD showed no clear tendency of the changes on the individual (picrocrocin, safranal, *cis/trans* crocins) saffron's secondary metabolites, 2) FT-IR and Raman showed decreasing tendency of the profile of the main secondary metabolites, which was expressed by

the match value % between control and treated samples' spectra, as in the case of thermal treatment.

Chemistry Lab of Agricultural University of Athens

October 2014

<u>Keywords:</u> saffron, <i>Crocus sativus</i> L., thermal accelerated ageing, UV-irradiation, HPLC, FT-IR, Raman.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το όνομα, η προέλευση και η ιστορία του φυτού *Crocus sativus* L.

Ο *Crocus sativus* L., Κρόκος ο ήμερος, καλλιεργείται και χρησιμοποιείται ως καρύκευμα εδώ και τουλάχιστον 3,500 χρόνια στην Αίγυπτο και τη Μέση Ανατολή. Το όνομα *Crocus* προέρχεται από την Ελληνική λέξη κρόκος, η οποία με την σειρά της προέρχεται από την Σημιτική λέξη karkom, μία από τις αρχαιότερες ονομασίες που είχαν δοθεί στο φυτό. Οι περιοχές όπου πιθανολογείται ότι πρωτοεμφανίστηκε ο *C. sativus*, ποικίλλουν από συγγραφέα σε συγγραφέα. Η περιοχή που διεκδικεί την ιθαγένεια του είναι η αρχαία Μεσοποταμία. Εκεί, κοντά στην πόλη Σούσα, υπήρχε η πόλη Azurirano (σημαίνει λιβάδι με κρόκο) που περιτριγυριζόταν από μεγάλες εκτάσεις όπου καλλιεργούσαν το φυτό, γύρω στο 2300 π.Χ.



Εικόνα 1.1. *Crocus sativus* L. – Κρόκος ο ήμερος.

Στον ελληνικό χώρο η ύπαρξη του φυτού είναι γνωστή από την αρχαιότητα, γεγονός που πιστοποιείται από αρχαιολογικά τεκμήρια. Οι πρώτες αναφορές για το φυτό προέρχονται από τη μινωική εποχή. Τοιχογραφίες με άνθη κρόκου και κρίνα, τοιχογραφία με τον "κροκοσυλλέκτη πίθηκο" και καλλιεργούμενοι ζαφορόκηποι στα μινωικά ανάκτορα μας πληροφορούν για την ύπαρξη του φυτού. Βάσει των αρχαιολογικών ερευνών και μελετών, αποδεικνύεται ότι έχει ιερή σχέση με τη μινωική θεότητα, αφού σε πολλές αναπαραστάσεις θρησκευτικών σκηνών εμφανίζονται άνθη και φυτά, όπως κρίνα και κρόκοι, τα οποία φαίνεται πως είχαν αποκτήσει θρησκευτικό συμβολισμό. Ανάλογη τοιχογραφία βρέθηκε στο Ακρωτήρι της Σαντορίνης όπου αναπαριστά την "κροκοσυλλέτρια" που συλλέγει άνθη κρόκου και τα προσφέρει σε μια καθιστή θεά.



Εικόνα 1.2. Τοιχογραφίες μινωϊκής εποχής.

Σήμερα το φυτό *Crocus sativus* L. καλλιεργείται εκτεταμένα σε παραθαλάσσιες περιοχές και σε περιοχές δίπλα από βουνό στην κεντρική και νότια Ευρώπη, στη Νότιο Αφρική, και στη Μέση Ανατολή, κατά πλάτος της κεντρικής Ασίας μέχρι τη Δυτική Κίνα. Συγκεκριμένες περιοχές καλλιέργειας είναι η Ιταλία, το Μαρόκο, το Αζερμπαϊτζάν, η Ελλάδα, η Ινδία, η Ισπανία και το Ιράν (κατά σειρά αυξανόμενης παραγωγής) με τις δύο τελευταίες να παράγουν το 80%. Καλλιέργειες μικρότερου εύρους υπάρχουν επίσης στη Τασμανία, στην Κίνα, στην Αίγυπτο, στην Γαλλία, στο Ισραήλ, στο Μεξικό, στη Νέα Ζηλανδία, στην Τουρκία, στην Καλιφόρνια και στην Κεντρική Αφρική (Εικόνα 1.3.).

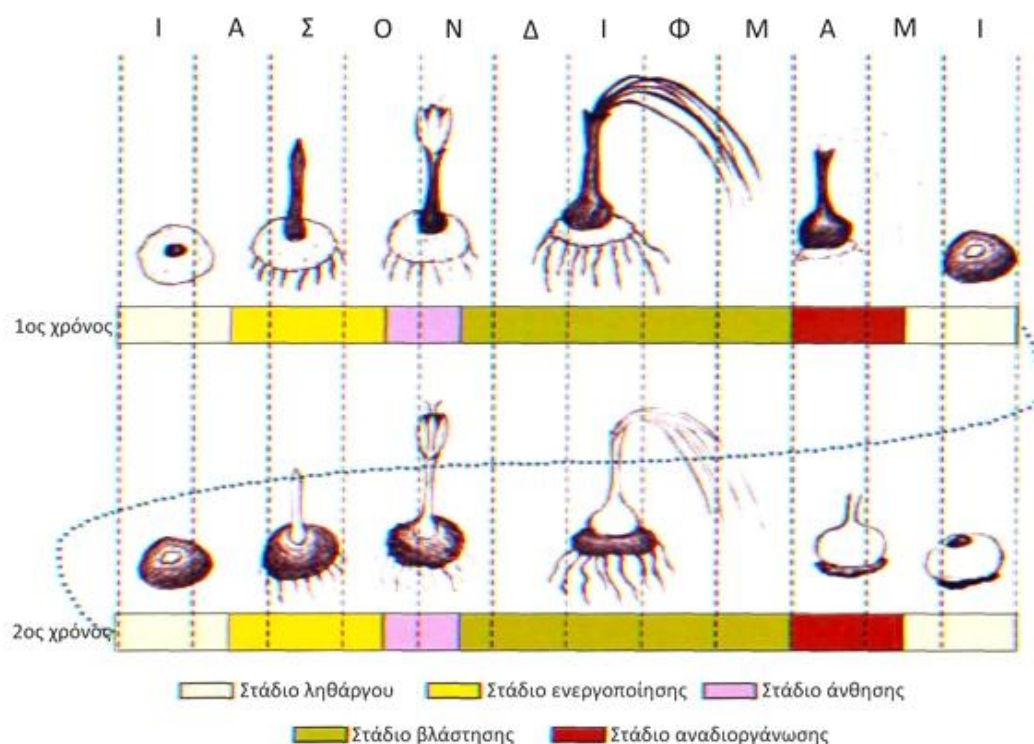


Εικόνα 1.3. Χώρες καλλιέργειας κρόκου.

2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το επιστημονικό όνομα του κρόκου είναι *Crocus sativus* Linnaeus και ανήκει στην οικογένεια *Iridaceae* της τάξης των *Liliales* (Carmona Delgado et al. 2006). Είναι ένα πολυετές, ποώδες φυτό. Είναι τριπλοειδές και ως εκ τούτου δεν παράγει σπόρο και δεν αναπτύσσει καρπούς. Πολλαπλασιάζεται αγενώς, μέσω των υπόγειων βλαστών που ονομάζονται κορμοί (Κουτσός, 2006). Οι κορμοί φυτεύονται κατά τους μήνες

Ιούλιο-Αύγουστο. Τα άνθη εμφανίζονται κατά τον Σεπτέμβριο-Οκτώβριο του επόμενου έτους. Το φυτό ανθίζει το φθινόπωρο, μειώνει την δραστηριότητα του την άνοιξη και παραμένει αδρανές το καλοκαίρι, χωρίς να παρουσιάζει κανένα απολύτως υπέργειο όργανο ή ρίζα. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται λήθαργος, κατά την οποία στο φυτό πραγματοποιείται κυτταρική διαίρεση στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού (Carmona Delgado et al., 2006).



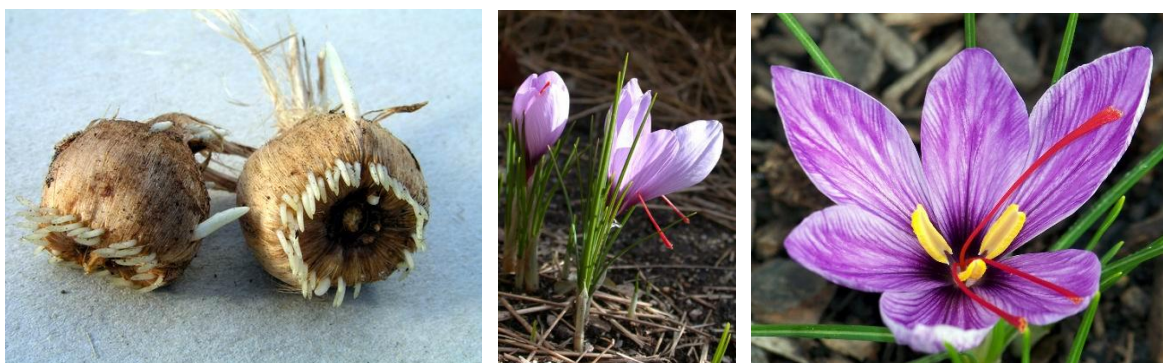
Εικόνα 2.1. Βλαστικός κύκλος του *Crocus sativus* L. (Carmona Delgado et al., 2006).

Τα ιδιαίτερα βοτανικά χαρακτηριστικά του κρόκου είναι:

- Κορμοί: είναι κατακόρυφοι υπόγειοι βλαστοί που εξωτερικά μοιάζουν με βολβούς, έχουν διάμετρο 5-7 εκατοστά, σχήμα σφαιρικό, και προστατεύονται από ινώδης δικτυωτούς χιτώνες.
- Άνθη: είναι μεγάλα, χρώματος ιώδους, με έξι χωριστά πέταλα, τρεις κίτρινους στήμονες και ωοθήκη με στύλο που χωρίζεται σε τρία στίγματα. Τα στίγματα ειδικότερα, που αποτελούν και την δρόγη του φυτού, έχουν κόκκινο προς το πορτοκαλί στιλπνό χρώμα, φέρουν ένα χαρακτηριστικό ελαφρό άρωμα και έχουν μήκος 25 με 35 χιλιοστά το οποίο είναι δυσανάλογο σε σύγκριση με τα άλλα όργανα του, έτσι πολλές φορές κρέμονται έξω από το λουλούδι. Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα

αποτελούν το μεγάλης αρτυματικής αξίας προϊόν (saffron), για το οποίο γίνεται η καλλιέργεια του κρόκου.

- Φύλλα: είναι 5-10 σε αριθμό, έχουν πράσινο χρώμα, είναι λεπτά και γραμμωτά και το μήκος τους είναι περίπου 30-50 εκατοστά.
- Ρίζες: Οι κορμοί φέρουν δύο διαφορετικά δομικά και λειτουργικά είδη ριζών, τις ινώδεις ρίζες και τις συσταλτές ρίζες (Κουτσός, 2006).



Εικόνα 2.2. Κορμοί, ρίζες, φύλλα και άνθος του *Crocus sativus* L.

3. Καλλιέργεια, συγκομιδή και επεξεργασία

Μοναδική κροκοκαλλιεργούμενη περιοχή στην Ελλάδα είναι η περιοχή της Κοζάνης και πιο συγκεκριμένα τα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα και Άνω Κόμη όπου το ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στις αρτυματικές και χρωστικές ιδιότητες των στίγμάτων του άνθους. Σήμερα καλύπτει γύρω στα 3000 στρέμματα από τα οποία 1000 στρέμματα είναι βιολογικής καλλιέργειας και βρίσκονται κατανεμημένα στις κτηματικές περιοχές της Ν. Κοζάνης. Η ετήσια παραγωγή τα τελευταία χρόνια είναι γύρω στα 1200 – 2000 κιλά κόκκινου κρόκου. Ο κρόκος Κοζάνης αποτελεί προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας και Προέλευσης (ΠΟΠ).

Η διαδικασία παραγωγής του προϊόντος περιλαμβάνει διάφορα στάδια επίπονης και χειρωνακτικής εργασίας, όπως τη συγκομιδή του φυτού, την απομάκρυνση των πετάλων, την ξήρανση του υλικού που απομένει (στίγματα-στήμονες) και το διαχωρισμό των κόκκινων στίγμάτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μικρή απόδοση παραγωγής (1-2 kg/στρμ.) καθιστούν τον κρόκο ένα από τα ακριβότερα αρτύματα του κόσμου (Ordoudi and Tsimidou, 2004). Η οικονομική αξία του διαφοροποιείται ωστόσο ανάλογα με την ποιότητα του αρτύματος. Η τελευταία πιστοποιείται, όχι μόνο από την εφαρμογή ή όχι κανόνων Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής κατά τη διαδικασία παραγωγής και επεξεργασίας του κρόκου, αλλά και από τις τιμές παραμέτρων που αφορούν κυρίως στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του

προϊόντος (χρωστική ικανότητα, άρωμα, πικάντικη γεύση). Έως σήμερα, οι προδιαγραφές ταξινόμησης διαφορετικών προϊόντων κρόκου σε εμπορικές κατηγορίες ποιότητας περιγράφονται στο πρότυπο ποιότητας του ISO (ISO/TS 3632-1, 2003) και αναθεωρούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις υπάρχουσες απαιτήσεις της αγοράς.

Η περίοδος συλλογής είναι το φθινόπωρο (Οκτώβριο), όταν τα άνθη είναι ανοιχτά και μαζεύονται από τους λεγόμενους κροκοσυλλέκτες, με τα χέρια, μέσα σε ποδιές ή καλάθια και μεταφέρονται στους χώρους που θα γίνει ο διαχωρισμός και η ξήρανση. Η κοπιαστική αυτή εργασία, πραγματοποιείται από την ανατολή μέχρι την δύση σχεδόν του ήλιου και διαρκεί 20-25 ημέρες. Μετά την ολοκλήρωση της συγκομιδής των ανθέων, αυτά υποβάλλονται σε μια λεπτή διαδικασία που θα οδηγήσει στο άρτυμα κρόκος. Η διαδικασία αυτή πρέπει να λάβει χώρα, αν είναι δυνατόν, την ίδια την ημέρα της συγκομιδής, καθώς τα στίγματα χάνουν τις ιδιότητές τους με το καιρό. Η ποσότητα των λουλουδιών που απαιτούνται για την παραγωγή 1kg κρόκου κυμαίνεται από 150.000 έως 200.000.

Ο διαχωρισμός είναι το πρώτο βήμα της διαδικασίας αυτής και συνίσταται στην απομάκρυνση του στίγματος από το υπόλοιπο άνθος. Συνήθως πραγματοποιείται παραδοσιακά με το χέρι και απαιτεί πείρα, μεγάλη προσοχή και δεξιότητα. Σήμερα υπάρχει η δυνατότητα χρήσης και ημιαυτόματων μηχανικών μέσων (ανεμιστήρες), για να απομακρυνθούν τα τέπαλα από τα στίγματα και τους στήμονες του άνθους, σε συνδυασμό όμως με τη χειρωνακτική εργασία που ακολουθεί για τον διαχωρισμό των σιγμάτων από τους στήμονες.



Εικόνα 3.1. Συλλογή ανθέων και διαχωρισμός σιγμάτων με το χέρι.

Η ξήρανση των σιγμάτων είναι το πιο βασικό στάδιο επεξεργασίας του κρόκου κατά την οποία τα στίγματα χάνουν 20% του αρχικού τους βάρους και μετατρέπονται στο επιθυμητό άρτυμα. Οι τρόποι εκτέλεσης της διαδικασίας ποικίλλουν ανάλογα την

περιοχή καλλιέργειας και παραγωγής του κρόκου (Λευκή βίβλος του κρόκου). Αν ο κρόκος ξηραθεί κανονικά, διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες (χρώμα, άρωμα, γεύση) ενώ παράλληλα βελτιώνεται η ποιότητά του, χωρίς να αποβάλλει τη χρωστική του δύναμη και το αιθέριο έλαιό του. Τα στίγματα απλώνονται σε κόσκινο από μετάξι και ξηραίνονται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ 25-30°C για 12-24 ώρες. Η βέλτιστη υγρασία για το τελικό προϊόν ποικίλει μεταξύ 10-12%. Ο κρόκος έχει αποξηραθεί ολοκληρωτικά όταν αποκολλάται από το κόσκινο όπου είχε προσκολληθεί όταν ήταν νωπός. Η ξήρανση πρέπει να γίνεται υπό σκιά και όχι κάτω από το φως του ήλιου. Το ηλιακό φως μπορεί να θολώσει το χρώμα των στιγμάτων και να μειώσει τη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου (Σταμπόλη Ευανθία, 2011). Τέλος, τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα του κρόκου, το λεγόμενο saffron, τοποθετούνται σε κατάλληλες συσκευασίες και δοχεία, ώστε, στη συνέχεια, να προωθηθούν στο εμπόριο (Ordoudi and Tsimidou, 2004).

4. Το saffron

Ως «saffron» ή «κρόκος» χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L. και ειδικότερα αναφέρεται στο μπαχαρικό που προκύπτει από αυτά (σε μορφή ολόκληρων στιγμάτων ή σκόνης). Στην παγκόσμια αγορά έχει επικρατήσει η εμπορική ονομασία «saffron», η οποία προέρχεται από παραφθορά της αραβικής λέξης *zafaran*, που σημαίνει κίτρινο. Στην Ελλάδα είναι γνωστός και με άλλα ονόματα, όπως ζαφορά, σαφράν, σαφράνι, μαμελούκος.

Επίσημα και σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2011) ως κρόκος ή σαφρόν (saffron) χαρακτηρίζονται τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L., που πρέπει να είναι απαλλαγμένα από τμήματα του στύλου ή άλλα μέρη του άνθους καθώς και από στίγματα άλλων ειδών κρόκων και άλλων λουλουδιών (π.χ. των φυτών *Carthamus Tinctorius* L., *Calendula Officinalis* L. κ.λ.π.).



Εικόνα 4.1. Αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού *Crocus sativus* L.

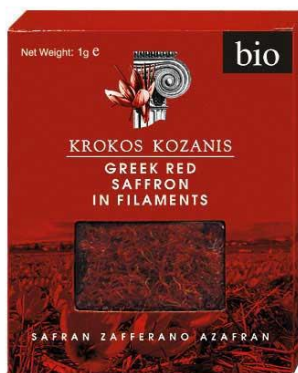
Το saffron είναι ιδιαίτερα δημοφιλές σε όλο τον κόσμο και η αξία του παραμένει σταθερή στο πέρασμα των χρόνων διότι είναι το μόνο μπαχαρικό που συνδυάζει χρώμα, γεύση και άρωμα, χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητά του.

5. Χρήσεις του saffron

Το saffron έχει αρτυματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες καθώς και μεγάλη χρωστική ικανότητα και για το λόγο αυτό επιδιώκεται η καλλιέργεια του φυτού. Από την αρχαιότητα ήταν δημοφιλές για τη χρησιμότητά του, η οποία αντικατοπτρίζεται μέχρι και σήμερα στις πολλαπλές εφαρμογές του σε διάφορους τομείς, κυρίως της βιομηχανίας τροφίμων και της φαρμακοβιομηχανίας. Στο παρελθόν, έχει χρησιμοποιηθεί και ως βαφική ύλη για τη χρώση υψηλής ποιότητας ενδυμάτων, στην

κοσμετολογία και αρωματοποιία, στις μέρες μας όμως αυτή η χρήση του είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, λόγω του υψηλού κόστους και της ανάπτυξης φθηνών συνθετικών χρωμάτων. (Carmona Delgado et al., 2006).

Χωρίς αμφιβολία, η πιο διαδεδομένη χρήση του κρόκου σήμερα παγκοσμίως είναι αυτή ως πρόσθετο τροφίμων, λόγω του χαρακτηριστικού αρώματος, της ιδιαίτερης γεύσης και του έντονου κίτρινου χρώματος που προσδίδει στα διάφορα πιάτα. Σήμερα στην Ευρωπαϊκή κουζίνα αποτελεί κύριο συστατικό σε μερικά από τα πιο γνωστά πιάτα, όπως το Rissoto alla Milanese στην Ιταλία, η Bouillabaisse στην Γαλλία και η Paella Valenciana στην Ισπανία. Στην βιομηχανία επίσης χρησιμοποιείται για το χρωματισμό και αρωματισμό αλκοολούχων ποτών, ροφημάτων και γαλακτοκομικών προϊόντων (Carmona Delgado et al., 2006).



Εικόνα 5.1. Συσκευασία ελληνικού κρόκου Κοζάνης σε νήματα.

Επίσης η παραγωγή του κρόκου έχει απασχολήσει έντονα τη βιομηχανία φαρμάκων και έχει υπάρξει αντικείμενο πολλών επιστημονικών ερευνών λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων και δράσεων. Έχει αποδειχτεί από προηγούμενες μελέτες ότι βοηθάει στην πρόγνωση ή στην αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων όπως γαστρεντερολογικές διαταραχές, με κυριότερη αυτή του πεπτικού έλκους (Kianbakht and Mozaffari, 2009; Xu et al., 2009), καρδιαγγειακά νοσήματα, αφού η κροκετίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιλιπιδαιμική δράση (Giaccio, 2004; Λαδοπούλου, 1998) , στη πρόληψη του διαβήτη (Xi et al., 2005) , των αϋπνιών (Hosseinzadeh and Noraei, 2009), του άγχους (Pitsikas et al., 2008) και της κατάθλιψης (Akhondzadeh et al., 2005). Δείχνει επίσης ενθαρρυντική δράση στην πρόληψη του καρκίνου λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων (Negbi, 1999; Carmona Delgado et al., 2006). Ειδικότερα, οι Tarantilis et al. (1994a) έδειξαν ότι τα καροτενοειδή του saffron αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων κάποιων τύπων λευχαιμίας (K562 και HL60), καθώς επίσης και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού

Chryssanthi et al. (2007). Ωστόσο, ιδιαίτερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τις αντιοξειδωτικές ικανότητες των στίγμάτων του *C. sativus* και την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Martinez-Tome et al., 2001) με άμεσα θετικά αποτελέσματα κατά νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer (Abe and Saito, 2000) και κατά ψυχοσικών διαταραχών όπως η σχιζοφρένια (Georgiadou et al., 2013).

6. Χημική σύσταση του saffron

Η χημική σύσταση του κρόκου μελετάται λεπτομερώς από τα τέλη του 19ου αιώνα. Το μέρος του φυτού το οποίο εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, από χημική άποψη, είναι τα στίγματα του άνθους. Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζεται η χημική σύστασή τους, κατά προσέγγιση, όπως παρουσιάζεται σε διάφορες επιστημονικές έρευνες (Lewis et al., 1981; Sampathu et al., 1984; Rios et al., 1996; Basker 1999) . Ωστόσο, μπορεί να τροποποιηθεί σημαντικά ανάλογα με τον τόπο προέλευσης, τις συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης.

Συστατικά	Ποσοστό (%)
Νερό	6 – 12
Ανόργανες ύλες	4 – 8,5
Λίπη	5 – 8
Πρωτεΐνες	10 – 14
Συνολικά σάκχαρα	26 – 27
Γεντιοβιοσίδια	2 – 3
Γλυκόζη	7 – 8
Φρουκτόζη	1 – 2
Ξυλόζη και ραμνόζη	Ίχνη
Άμυλο	6 – 7
Πεκτίνες	6
Πεντοζάνες	6 – 7
Κόμμεα και Δεξτρίνες	9 – 10,5
Ακατέργαστες ίνες	4 – 5
Αιθέρια έλαια	0,3
Βιταμίνες	0.3 – 138*

*σε μg/g

Πίνακας 6.1. Η κατά προσέγγιση χημική σύσταση των στίγμάτων του *Crocus sativus* (Lewis et al., 1981; Sampathu et al., 1984; Rios et al., 1996; Basker, 1999).

Σε εμπορική κλίμακα, ο κρόκος αξιολογείται με βάση το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα που προσδίδει. Τα συστατικά που του δίνουν αυτές τις οργανοληπτικές ιδιότητες, είναι αυτά που καθορίζουν και την ποιότητα του κρόκου και αποτελούν τους βασικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των συστατικών αυτών, τόσο υψηλότερη και η ποιότητα του κρόκου, προϋποθέτοντας βέβαια και την ταυτόχρονη απουσία άλλων παραγόντων (πχ. προσθήκη άλλων ειδών *Crocus*, ίνες από κολλώδιο και ζελατίνη, υψηλά ποσοστά υγρασίας) που μπορεί να οδηγήσουν στη νοθεία του, όπως προβλέπεται από το ISO 3632 (2003).

6.1. Βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron

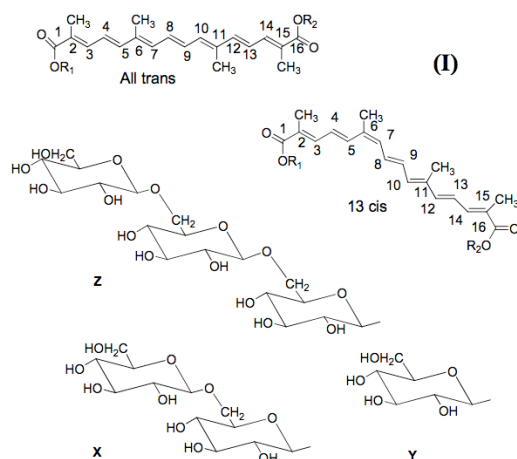
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις που ανήκουν σε εξαιρετικά διαφοροποιημένες χημικές ομάδες, όπως οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, τερπένια, στεροειδή, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή κ. α. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Οι βασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron είναι οι κροκίνες, η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη, στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα του, η πικρή του γεύση και το χαρακτηριστικό άρωμα του αντίστοιχα.

Οι κροκίνες αποτελούν τις σημαντικότερες μεταξύ άλλων (α -, β - και γ -καροτένιο, ζεαξανθίνη, και λυκοπένιο) χρωστικές ουσίες των στιγμάτων του κρόκου. Είναι ασυνήθιστα υδατοδιαλυτά καροτενοειδή, γλυκοζιδιακοί εστέρες της κροκετίνης. Λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητας που τις χαρακτηρίζει, διαλύονται γρήγορα στο νερό σχηματίζοντας διάλυμα χρώματος πορτοκαλί, γεγονός που τις καθιστά ως φυσικές χρωστικές των τροφίμων.

Η κροκετίνη αποτελείται από 16 άτομα άνθρακα ενώ στις θέσεις C-2, C-6, C-11 και C-15 υπάρχουν διακλαδώσεις με μεθύλια. Ανάλογα με την στερεοδιάταξη στη θέση C-6 απαντάται σε *cis*- ή σε *trans*- διάταξη ενώ η εστεροποίηση της γίνεται με μονάδες β -D-γλυκόζης και β -D-γεντιοβιόζης. Η επικρατέστερη ποσοτικά κροκίνη είναι η *trans*-κροκίνη-4, ο διγεντιοβιοζυλεστέρας της κροκετίνης (Abdullaev et al., 2002). Το προφίλ των κροκινών έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές κατά το πέρασμα των χρόνων (Kuhn 1931, Pfandev and Witter, 1975; Dinghra et al., 1975), οι οποίοι ανακάλυψαν και ταυτοποίησαν τις διάφορες μορφές τους (*trans*-κροκίνη-4, *trans*-κροκίνη-3, *trans*-κροκίνη-2' και *trans*-κροκίνη-1). Το 1984 οι Speranza et al. βρίσκουν ότι η *trans*-

κροκίνη-4 απαντάται επίσης και στη *cis* διαμόρφωση, ενώ αργότερα *cis* δομές ανακαλύφθηκαν και από τους Tarantilis et al. (1994b, 1995) οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν εύκολα από τις *trans* αφού εμφανίζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Τελευταία ανακαλύφθηκε η *trans*-κροκίνη-5, η οποία αποτελείται στο ένα άκρο από τρεις συνεχόμενες μονάδες β-D-γλυκόζης (Tarantilis et al., 1995) (Εικόνα 6.1.1.).

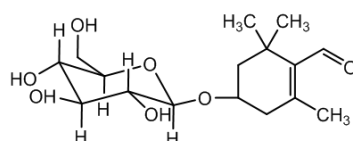


Χημική δομή κροκινών (CRCs): γλυκοζυλεστέρες της κροκετίνης

κροκίνη-5: R₁= τρεις β-D-γλυκοζυλ (Z), R₂= β-D-γεντιοβιοζυλ (X)
κροκίνη-4: R₁= R₂= β-D-γεντιοβιοζυλ (X)
κροκίνη-3: R₁= β-D-γεντιοβιοζυλ (X), R₂= β-D-γλυκοζυλ (Z)
κροκίνη-2: R₁= β-D-γεντιοβιοζυλ (X), R₂= H
κροκίνη-2': R₁= R₂= β-D-γλυκοζυλ (Z)
κροκίνη-1: R₁= β-D-γλυκοζυλ (Z), R₂= H
κροκετίνη (CRT): R₁= R₂= H

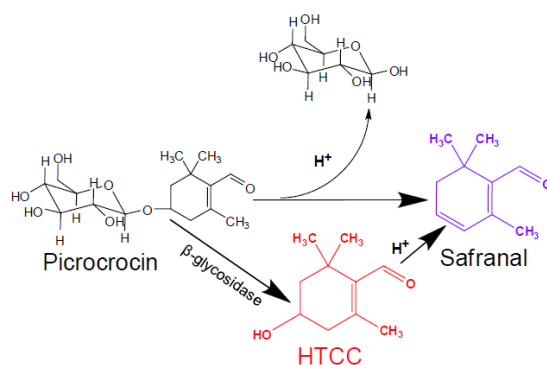
Εικόνα 6.1.1. Οι χημικές δομές των κυριότερων κροκινών.

Η πικρή και ελαφρώς πικάντικη γεύση του saffron οφείλεται στην πικροκροκίνη, η οποία είναι ένα γλυκοζίτης της σαφρανάλης. Έχει εντοπισθεί μόνο στο γένος *Crocus*, εκ των οποίων το μόνο βρώσιμο είδος είναι το *Crocus sativus* L. Για το λόγο αυτό η πικροκροκίνη αποτελεί μοριακό δείκτη αυτού του μπαχαρικού, που του προσδίδει μια μοναδική γεύση που δεν μπορεί να μιμηθεί από άλλα μπαχαρικά και καρυκεύματα (García-Rodríguez et al. 2014). Η δομή της εδραιώθηκε από τους Khun και Winterstein το 1934 ενώ η στερεοχημική της διάταξη (R) καθορίστηκε από τους Buchecker και Eugster (1973).



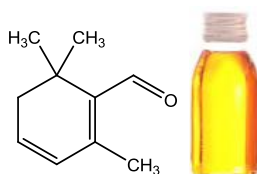
Εικόνα 6.1.2. Χημική δομή της πικροκροκίνης.

Η πικροκροκίνη σχηματίζεται κατά την οξειδωτική αποικοδόμηση της ζεαξανθίνης ενώ αποτελεί πρόδρομη ένωση της σαφρανάλης. Η απογλυκοζυλίωση της πικροκροκίνης, που συνήθως λαμβάνει χώρα κατά την αποξήρανση των σιγμάτων, σημαίνει τη διάσπασή της σε D-γλυκόζη και σαφρανάλη. Η διάσπαση μπορεί να γίνει μέσω φυσικής ενζυματικής διαδικασίας (β-γλυκοσιδάση) και ενδιάμεσο σχηματισμό του HTCC (2,6,6-τριμεθυλ-4-υδροξυ-1-καρβοξαλδεΐδη-1-κυκλοεξάνιο) ή μέσω οξειδωτικής υποβάθμισης (θέρμανση) κατά την ανάπτυξη του φυτού, την επεξεργασία και την αποθήκευσή του (Tarantilis et al., 1994; Kanakis et al., 2004) (Εικόνα 6.1.3.).



Εικόνα 6.1.3. Σχηματική απεικόνιση υποβάθμισης της πικροκροκίνης.

Η σαφρανάλη είναι άλλος ένας βασικός δευτερογενής μεταβολίτης του κρόκου αφού προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα στο καρύκευμα. Είναι μονοτερπενική αλδεΐδη και αποτελεί το πιο σημαντικό πτητικό συστατικό του αιθέριου ελαίου αντιπροσωπεύοντας το 30-60% της συγκέντρωσης του (Carmona et al., 2007; Maggi et al., 2009).



Εικόνα 6.1.4. Χημική δομή της σαφρανάλης. Το βασικότερο συστατικό του αιθέριου ελαίου του saffron.

6.2. Παράγοντες που επιδρούν ποιοτικά και ποσοτικά στους βασικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron

Υπάρχει πλήθος παραγόντων που είναι σε θέση να επηρεάσουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες του κρόκου και τελικά να αναδείξουν ή να υποβαθμίσουν τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούν οι παράγοντες αυτοί

που δρουν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής, της επεξεργασίας και της συντήρησης του κρόκου.

6.2.1. Συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και της συγκομιδής

Η ποιότητα του κρόκου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη στη διεθνή αγορά με το μέγεθος των στιγμάτων. Μικρότερα φυτά παρουσιάζουν μικρότερα στίγματα, γεγονός το οποίο είναι ανάλογο πολλές φορές με τις συνθήκες καλλιέργειας. Η εκτενής ξηρασία που μπορεί να παρουσιαστεί σε ορισμένες περιοχές καλλιέργειας του saffron, αποτελεί παράγοντα μείωσης της ποιότητάς του (Carmona Delgado et al., 2006). Ωστόσο, η περίσσεια νερού επηρεάζει εξίσου αρνητικά την ποιότητα του saffron, καθώς έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης των εστέρων της κροκετίνης (Ohashi and Miyoshi, 1964). Επιπρόσθετα, η θερμοκρασία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα με άμεση επίδραση στη ποιότητα του saffron. Καλύτερης ποιότητας saffron παράγεται σε κλίματα με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια καθώς τα στίγματα του φυτού παρουσιάζονται με ζωντανό χρώμα και με έντονο άρωμα (Carmona Delgado et al., 2006).

Η συγκομιδή του κρόκου ιδανικά πραγματοποιείται από τη στιγμή που θα εμφανιστούν τα πρώτα άνθη του και μέχρι πριν αυτά ανοίξουν πλήρως. Αυτό έχει ως στόχο τα στίγματα να προστατεύονται από μηχανικές αλλά και από χημικές καταπονήσεις (ηλιακή ακτινοβολία) (Carmona Delgado et al., 2006). Η ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα του saffron, μειώνοντας τη συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου και επιφέροντας σημαντικές αλλοιώσεις στο χρώμα, αφού οι κροκίνες είναι ουσίες φωτοευαίσθητες. Η έκθεση των ανοικτών ανθέων και κατά συνέπεια η άμεση έκθεση των στιγμάτων του κρόκου στο ηλιακό φως, όπως συμβαίνει ενδεχομένως στο Μαρόκο, έχει αρνητική επίπτωση στην ποιότητά του (Ait-Oubahou and El-Otmani, 1999).

Σύμφωνα με περαιτέρω μελέτες των δευτερογενών μεταβολιτών του κρόκου και το πως αυτοί επηρεάζονται από τις κλιματολογικές συνθήκες κατά τη συγκομιδή, παρατηρήθηκε ότι: η συγκέντρωση της σαφρανάλης αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας και μειώνεται με την πτώση του ύψους της βροχόπτωσης, οι κροκίνες φαίνονται να επηρεάζονται σημαντικά από το ύψος της βροχόπτωσης και λιγότερο από τη σχετική υγρασία και η πικροκροκίνη εμφανίζει μια αρνητική συσχέτιση με την άνοδο του ύψους της βροχόπτωσης και της σχετικής υγρασίας. Αντίθετα η άνοδος της θερμοκρασίας συνοδεύτηκε με αύξησης της περιεκτικότητας σε πικροκροκίνη. Σε γενικές γραμμές οι καιρικές συνθήκες αφενός παίζουν ρόλο στις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών, αφετέρου δεν τις επηρεάζουν καθοριστικά (Σταμπόλη, 2011).

6.2.2. Συνθήκες κατά την ξήρανση των στιγμάτων

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ξήρανση των στιγμάτων αποτελεί τη σημαντικότερη και πλέον «λεπτή» διαδικασία κατά την οποία μετατρέπονται στο άρτυμα κρόκος, καθώς επίσης αποτελεί και το κριτικό σημείο που καθορίζει τις ιδιότητές του (Basker, 1999; Ordoudi and Tsimidou 2004). Η ξήρανση του κρόκου πρέπει να γίνεται υπό σκιά και όχι κάτω από το φως του ήλιου, διότι το ηλιακό φως μπορεί να αλλοιώσει το χρώμα των στιγμάτων και να μειώσει τη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου.

Στη διαδικασία της ξήρανσης καθοριστικό ρόλο παίζουν τόσο η θερμοκρασία όσο και η διάρκεια της διαδικασίας, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρόκου (χρώμα, γεύση και άρωμα).

Όσον αφορά το χρώμα, μία σχετικά μικρή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια ξήρανσης (< 30°C), οδηγεί στην αύξηση του αναγκαίου χρόνου αποξήρανσης όπως και σε ποιοτική υποβάθμιση του saffron. Αυτό οφείλεται στην παρατεταμένη ενζυμική δραστηριότητα που παρουσιάζεται, έχοντας ως αποτέλεσμα την διάσπαση των κροκινών (Raina et al., 1996). Επιπρόσθετα, η ξήρανση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C οδηγεί στην ποιοτική υποβάθμιση του saffron λόγω της θερμικής διάσπασης των χρωστικών του. Οι Raina et al. αναφέρουν ότι η ιδανική θερμοκρασία ξήρανσης κυμαίνεται από τους 35 έως τους 50°C για περίπου 6 ώρες, αφού οι μεταχειρίσεις με αυτή τη μέθοδο παρουσιάζουν ίδια επίπεδα χρωστικών με αυτά του φρέσκου saffron.

Όσον αφορά το άρωμα, τα φρέσκα στίγματα του κρόκου είναι πρακτικά άοσμα. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η σαφρανάλη παράγεται είτε μέσω της ενζυματικής μετατροπής (β - γλυκοσιδάση) της πικροκροκίνης με ενδιάμεσο προϊόν το HTCC, είτε μέσω της οξειδωτικής υποβάθμισης της πικροκροκίνης με τη χρήση θερμότητας, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ξήρανσης. Ερευνητές αναφέρουν ότι δείγματα διαφορετικής προέλευσης που έχουν υποστεί ποικίλες τεχνικές ξήρανσης παρουσιάζουν διαφορετικές συγκεντρώσεις σαφρανάλης (Alonso et al., 2001). Οι Tarantilis and Polissiou et al. (1997) επίσης αναφέρουν ότι πολλές πτητικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου του saffron αποτελούν προϊόντα διάσπασης λιπόφιλων καροτενοϊδών όπως η ζεαξανθίνη, όταν αυτή θερμανθεί.

6.2.3. Συνθήκες κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και συντήρησης

Η αποθήκευση και η συντήρηση του saffron αποτελούν σημαντικό μέρος της διαδικασίας μέχρι το τελικό προϊόν να φτάσει στον καταναλωτή και δεν πρέπει να υποτιμηθούν, αφού οι συνθήκες που επικρατούν όπως το φως, η θερμοκρασία και η υγρασία, μπορούν να επηρεάσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

Το ηλιακό φως, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να επηρεάσει το σύνολο των φωτοευαίσθητων κροκινών και για αυτό το saffron θα πρέπει να αποθηκεύεται σε αδιάφανα δοχεία. Στις Ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης συγκαταλέγονται επίσης η χαμηλή θερμοκρασία και σχετική υγρασία. Αυξημένη σχετική υγρασία μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, μυκήτων και βακτηρίων, να επηρεάσει το χρώμα και τη γεύση, αφού οι κροκίνες και η πικροκροκίνη είναι υδατοδιαλυτές ουσίες, καθώς επίσης ενδέχεται να επιδράσει αρνητικά στο σχηματισμό των συστατικών του αρώματος (Alonso et al., 1990; Tsimidou and Bilianderis, 1997; Carmona Delgado et al., 2006).

Σημαντικό στάδιο της αποθήκευσης αποτελεί και η εξυγίανση των σιγμάτων από την ενδεχόμενη ανάπτυξη μικροοργανισμών αφού το saffron είναι επιρρεπές στις μικροβιακές μολύνσεις. Η διαδικασία που ακολουθούνταν μέχρι πρότινος ήταν ο υποκαπνισμός , διαδικασία η οποία έχει σταματήσει σε πολλές χώρες λόγω της υψηλής τοξικότητάς της. Μια αποτελεσματική εναλλακτική της μεθόδου είναι η χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας, όπως οι ακτίνες γ. Δόσεις ακτινοβολίας της τάξης των 5 - 10 kGy είναι ικανές να απολυμάνουν επαρκώς τα στίγματα χωρίς να επηρεαστεί αρνητικά η γεύση και το άρωμα τους (Zareena et al., 2001).

7. Σκοπός του πειράματος

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην Ενότητα 6.2, πολλοί είναι οι εξωτερικοί παράγοντες που επιδρούν στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του και κατ' επέκταση στην ποιότητα του. Η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία είναι παράγοντες σημαντικοί που συμβάλλουν στη γήρανση του saffron, στην εξασθένιση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών και τέλος στη μείωση της ποιότητας του.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσομοιάσει τις συνθήκες αυτές μέσω δύο τεχνικών επιταχυνόμενης γήρανσης και να αξιολογήσει τις αλλαγές που μπορεί να επιφέρουν στην ποιότητα του saffron. Η πρώτη πραγματοποιείται με θέρμανση σε ένα εύρος θερμοκρασιών, μεγαλύτερες από αυτές που εφαρμόζονται στα στίγματα του κρόκου κατά το βασικό στάδιο της επεξεργασίας με στόχο την αποξήρανση του. Η δεύτερη μέθοδος πραγματοποιείται με ακτινοβολία των δειγμάτων, με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) σε διαφορετικά μήκη κύματος και διαφορετική χρονική διάρκεια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

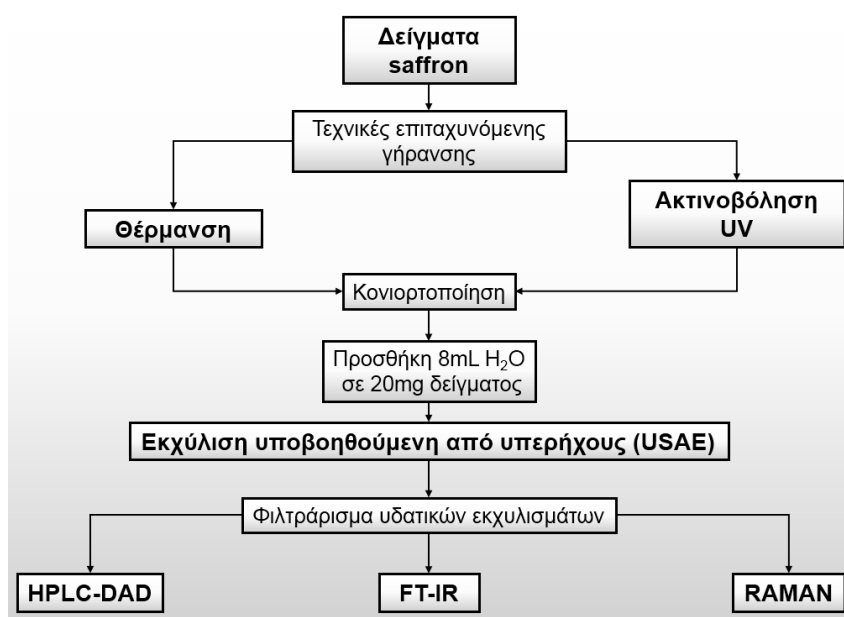
8. Φυτικό υλικό και στάδια πειραματικής πορείας

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν πέντε (5) διαφορετικά δείγματα αποξηραμένων στιγμάτων ελληνικού κρόκου, τα οποία παραχωρήθηκαν από τον Αναγκαστικό Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Τα δείγματα προήλθαν από φυτά *Crocus sativus* L. με διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (βιολογική ή συμβατική καλλιέργεια), κατά τη διάρκεια του ίδιου χρόνου συγκομιδής τους (2013).

	Δείγμα 1	Extra conventional 2013
	Δείγμα 2	Bio EU Extra 2013
	Δείγμα 3	222 Bio 2013
	Δείγμα 4	Bio Suisse 2013
	Δείγμα 5	222 conventional 2013

Πίνακας 8.1. Τα δείγματα saffron που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Το ακόλουθο διάγραμμα ροής παρουσιάζει συνοπτικά τα στάδια του πειράματος. Δηλαδή, τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκαν, από την εφαρμογή των μεθόδων της επιταχυνόμενης γήρανσης στα δείγματα, μέχρι τις μεθόδους ανάλυσης που επιλέχθηκαν για την αξιολόγηση των αλλαγών στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στα παρακάτω κεφάλαια.



Εικόνα 8.1. Στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

9. Προκατεργασία δειγμάτων για ανάλυση

9.1. Επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση θερμότητας

Για να επιτευχθεί η επιταχυνόμενη γήρανση με τη χρήση θερμότητας, ποσότητα στιγμάτων από κάθε δείγμα saffron ξεχωριστά τοποθετήθηκαν σε πορσελάνινες κάψουλες, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον εργαστηριακό θερμοστατούμενο φούρνο. Συνολικά εφαρμόστηκαν οκτώ διαφορετικές θερμοκρασίες, σταδιακά αυξανόμενες (50°C, 70°C, 90°C, 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C), στις οποίες τα δείγματα παρέμειναν για 2 ώρες στην κάθε μια ξεχωριστά.

Δείγματα	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5
Θερμοκρασία (°C)	50	70	90	110	120	130	140	150
Διάρκεια (Ώρες)	2	2	2	2	2	2	2	2

Πίνακας 9.1.1. Μεταχείριση δειγμάτων κατά την επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση θερμότητας.

9.2. Επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

Για να επιτευχθεί η επιταχυνόμενη γήρανση με τη χρήση ακτινοβολίας, ποσότητα στιγμάτων από κάθε δείγμα saffron ξεχωριστά τοποθετήθηκαν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), η οποία εφαρμόστηκε σε αυτοσχέδια κλειστή κατασκευή, για να αποφευχθούν οι απώλειες ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκεια αυτής της μεταχείρισης, τα δείγματα δέχτηκαν UV ακτινοβολία δύο διαφορετικών μηκών κύματος (254nm και 365nm), με διάρκεια 24, 48 και 72 ωρών για το κάθε μήκος αντίστοιχα.

Δείγματα	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5	1,2,3,4,5
Ακτινοβολία (nm)		254			365	
Διάρκεια (Ώρες)	24	48	72	24	48	72

Πίνακας 9.2.1. Μεταχείριση δειγμάτων κατά την επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση ακτινοβολίας.

9.3. Προετοιμασία δειγμάτων για εκχύλιση

Μετά την εφαρμογή της κάθε μεθόδου επιταχυνόμενης γήρανσης, στα διάφορα επίπεδα θερμοκρασίας και ακτινοβολίας, όλα τα δείγματα saffron προετοιμάστηκαν για την τεχνική εκχύλισης. Η διαδικασία της προετοιμασίας περιελάμβανε τα εξής βήματα:

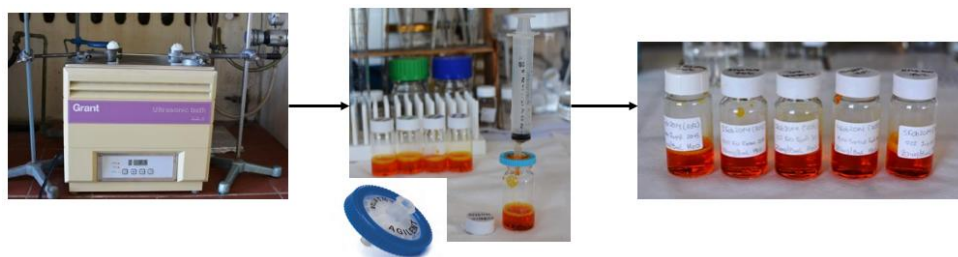
- Κονιορτοποίηση και ομογενοποίηση των μεταχειρισμένων δειγμάτων, η οποία έγινε με το χέρι με τη βοήθεια πορσελάνινου ιγδίου.
- Ζύγιση της επιθυμητής ποσότητας δείγματος (20mg) με χρήση ζυγού ακριβείας και τοποθέτηση αυτής σε πλαστικά φιαλίδια.
- Προσθήκη 8mL απιονισμένου νερού



Εικόνα 9.3.1. Απεικόνιση της προετοιμασίας των δειγμάτων saffron για εκχύλιση.

9.4. Παραλαβή υδατικών εκχυλισμάτων με την τεχνική της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (USAE)

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (Ultra Sound Assisted Extraction, USAE). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν εντός λουτρού υπερήχων, για 10 min και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25°C. Η συχνότητα της πηγής υπερήχων ήταν 35 kHz. Στη συνέχεια τα υδατικά εκχυλίσματα διηθήθηκαν με τη χρήση φίλτρων Agilent με διάμετρο πόρων 0,45μm, έτσι ώστε να απομακρυνθούν στέρεα κατάλοιπα των σιγμάτων του saffron, και τέλος τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια.



Εικόνα 9.4.1. Εκχύλιση USAE, φιλτράρισμα και υδατικά εκχυλίσματα saffron έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση.

10. Μέθοδοι ανάλυσης

10.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού χημικών ουσιών. Χρησιμοποιείται τόσο για την ποιοτική ταυτοποίηση, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών. Ενδείκνυται για την ανάλυση μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ουσιών (Ταραντίλης, 2004).

Στην παρούσα διατριβή, η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων του φυτικού υλικού, πραγματοποιήθηκε με σύστημα Agilent Model 1100 HPLC, εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου κύματος UV-Vis DAD (Diode Array Detector), συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation, για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.



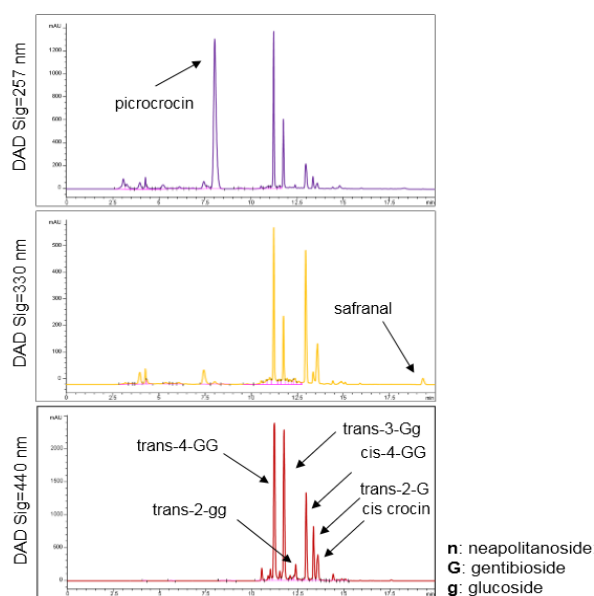
Εικόνα 10.1.1. Σύστημα της HPLC-DAD που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

Το κάθε δείγμα από τα υδατικά εκχυλίσματα εισάγονταν στο σύστημα με ειδική σύριγγα, σε βαλβίδα υψηλής πίεσης, και ο όγκος εισαγωγής του ήταν 20μL (injection volume). Η στήλη ήταν Supelco (Discovery HS C18) ανεστραμμένης φάσης, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης 5 μm, θερμοστατούμενη σε ειδικό φούρνο για HPLC (Column heater - Model 7971, Jones Chromatography) στους 30°C. Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης έκλουσης Α ήταν νερό με προσθήκη 0,25% φορμικού οξέος και ο διαλύτης έκλουσης Β ήταν ακετονιτρίλιο. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε σε σταθερή τιμή των 0,800 mL/min. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της βαθμιδωτής

έκλουσης (gradient elution), κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία, ως εξής: 80% A για 5 min, μείωση του A έως το 20% έως τα 15 min και επαναφορά σε 80% A έως τα 20 min.

Η καταγραφή των εκλουόμενων συστατικών, γίνονταν συνεχώς με καταγραφή του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή με συστοιχία διόδων (DAD) και στα επιλεγμένα μήκη κύματος 257, 330 και 440 nm, στα οποία η πικροκροκίνη, η σαφρανάλη και οι κροκίνες εμφανίζουν τη μέγιστη απορρόφηση αντίστοιχα.

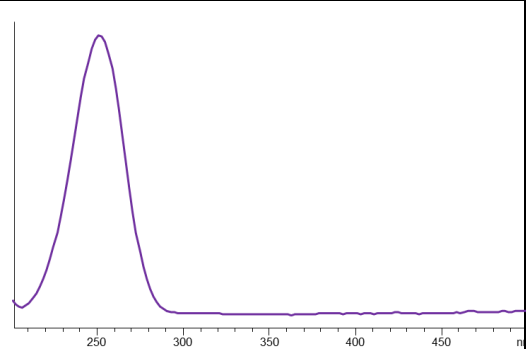
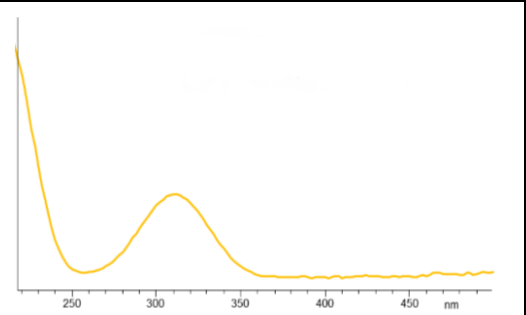
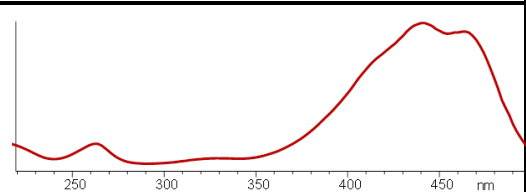
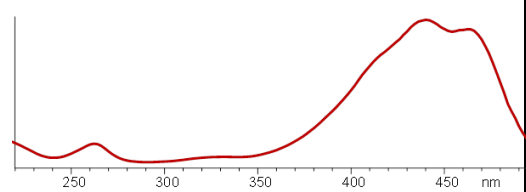
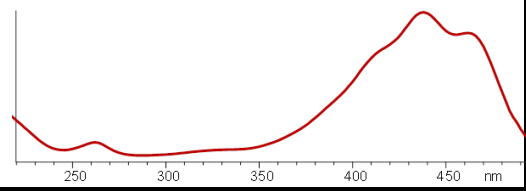
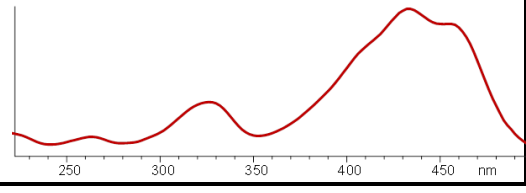
Στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 10.1.1.) παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα με τις κορυφές των κύριων αυτών συστατικών και τους χρόνους συγκράτησης (retention time, t_R), δηλαδή τους χρόνους που μεσολαβούν από τη στιγμή που έγινε η ένεση με το δείγμα μέχρι την εμφάνιση του μεγίστου της κορυφής στο χρωματογράφημα, στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

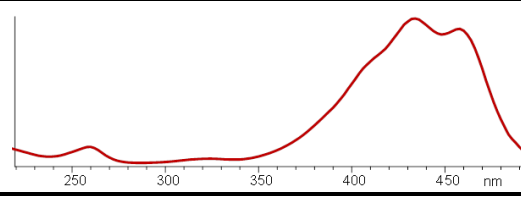
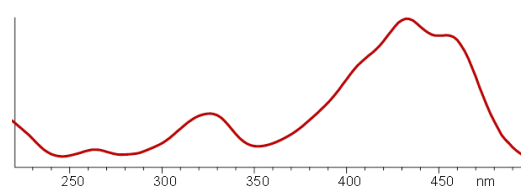


Γράφημα 10.1.1. Τυπικά χρωματογραφήματα υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron, στα οποία διακρίνονται οι κορυφές των κύριων συστατικών του (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες).

Τα συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1.1., όπου δίνονται και τα φάσματα UV-Vis κάθε συστατικού. Η απόδοση των κορυφών έγινε βάσει των φασμάτων UV-Vis και μέσω σύγκρισης με βιβλιογραφικά δεδομένα (Tarantilis, 1995; Carmona et al., 2006b; Carmona Delgado et al., 2006). Η ονοματολογία των κροκινών ακολουθεί την πρόταση των Carmona et al. (2006b), σύμφωνα με την οποία, το πρώτο τμήμα του ονόματος περιγράφει την ισομερική μορφή του άγλυκου τμήματος, ακολουθεί ο συνολικός αριθμός των τμημάτων σακχάρων του μορίου και τέλος δίνεται ο τύπος του

σακχάρου σε κάθε άκρο της κροκίνης: (n) νεαπολιτανοζίτης, (G) γεντοβιοζίτης, (g) γλυκοζίτης. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών των εξεταζόμενων δειγμάτων με την βοήθεια της HPLC.

Συστατικά	Χρόνος έκλουσης (t_R)	Φάσμα UV-Vis
Πικροκροκίνη	8,19 min	
Σαφρανάλη	19,35 min	
<i>trans</i> -4-GG	11,26 min	
<i>trans</i> -3-Gg	11,77 min	
<i>trans</i> -2-gg	12,41 min	
<i>cis</i> -4-GG	12,95 min	

Συστατικά	Χρόνος έκλουσης (t_R)	Φάσμα UV-Vis
<i>trans</i> -2-G	13,37 min	
Μη ταυτοποιημένη <i>cis</i> κροκίνη	13,59 min	

Πίνακας 10.1.1. Συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων saffron που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με χρήση της HPLC, ο χρόνος έκλουσης (t_R) και το φάσμα UV-Vis που παρουσίασαν.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βασικών συστατικών, υπολογίστηκε το εμβαδόν της περιοχής που περικλείεται από την κορυφή του χρωματογραφήματος και τη βασική γραμμή, το οποίο σχετίζεται με την συγκέντρωση του αντίστοιχου συστατικού μέσα στο δείγμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των συστατικών στο εξεταζόμενο δείγμα, τόσο μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής παρατηρείται για το συγκεκριμένο συστατικό.

10.2. Φασματοσκοπίες FT-IR και Raman

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform - Infra Red Spectroscopy, FT-IR) και Raman είναι από τις πιο σημαντικές σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές στη σύγχρονη εποχή. Το χαμηλό κόστος αγοράς, χρήσης και συντήρησης των οργάνων, οι μικρές ή μηδενικές απαιτήσεις σε αναλώσιμα και η ταχύτητα των αναλύσεων τις καθιστά μεθόδους δημοφιλείς για ποιοτικούς ελέγχους ρουτίνας και κατάλληλες για άμεση εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων (Pappas et al., 2008; Tarantilis et al., 2008). Τα φάσματα που λαμβάνονται, στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένα σημεία απορρόφησης τους, με άλλα γνωστά (πρότυπα). Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητας τους.

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μία από τις μεθόδους που έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό των κροκινών σε δείγματα saffron (Anastasaki et al., 2010b),

εφόσον τα φάσματα της δίνουν καλύτερα αποτελέσματα (ισχυρό σήμα) σε ενώσεις με συμμετρική δομή, όπως είναι τα καροτενοειδή.

Φασματοσκοπία FT-IR

Η καταγραφή των φασμάτων έγινε σε φασματόμετρο FT-IR Thermo Nicolet 6700 με χρήση της τεχνικής ATR (Attenuated Total Reflectance). Με τη βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας, 0,7 mL υδατικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα τοποθετούνταν στον κρύσταλλο ειδικής πλάκας (ZnSe), η οποία στη συνέχεια μεταφερόταν σε φούρνο (40°C) με σκοπό την αφίδρωση του δείγματος, διότι η παρουσία νερού προκαλούσε αλλοιώσεις στην φασματική πληροφορία. Αφού το δείγμα είχε αφυδατωθεί καλά, η πλάκα μεταφερόταν στην ειδική κεφαλή της τεχνικής ATR για την καταγραφή των φασμάτων. Τα φάσματα προέκυψαν ύστερα από 100 σαρώσεις, με την ανάλυση του οργάνου να είναι 4 cm^{-1} και καταγράφηκε στην περιοχή $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$.

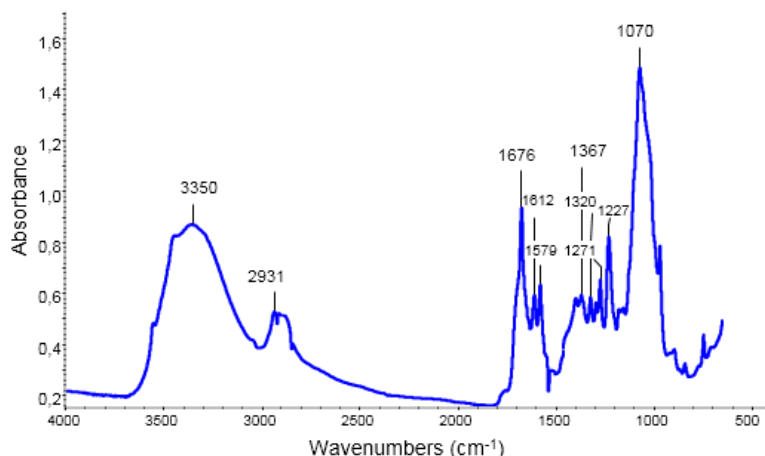


Εικόνα 10.2.1. Απεικόνιση λήψης φασμάτων με την FT-IR.

Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3 της Thermo Fisher Scientific Inc. και περιλάμβανε την αυτόματη εξομάλυνση (automatic smooth) και την αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) των φασμάτων. Επιπλέον, από το σύνολο των φασμάτων, αφαιρέθηκε η κορυφή του CO_2 ($\sim 2385\text{-}2285\text{ cm}^{-1}$), η οποία οφείλεται σε μεταβολές του ατμοσφαιρικού CO_2 , κατά την καταγραφή των φασμάτων.

Όλες οι συγκρίσεις των φασμάτων έγιναν μεταξύ των δειγμάτων που ήταν μάρτυρες (control), δηλαδή δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί κάποια μεταχείριση, και των δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι επιταχυνόμενης γήρανσης, και αφορούσαν τη φασματική περιοχή $1800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, η οποία, όπως προκύπτει, περιλαμβάνει τις απορροφήσεις που οφείλονται στις λειτουργικές ομάδες των συστατικών των εκχυλισμάτων και την περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων.

Στο Γράφημα 10.2.1. παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron, όπως καταγράφηκαν με την τεχνική FT-IR, και στον Πίνακα 10.2.1. καταγράφονται οι εντάσεις των κορυφών του φάσματος (απορροφήσεις) και οι λειτουργικές ομάδες που τις αντιπροσωπεύουν.



Γράφημα 10.2.1. Τυπικό φάσμα FT-IR υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.

Κυματάριθμος (cm ⁻¹)	Λειτουργικές ομάδες
3350	O-H σακχάρων
3000-2840	C-H (δονήσεις τάσης)
1676	C=O εστερικών ομάδων κροκινών
1612	C=C κροκινών
1367	C-H (δονήσεις κάμψης)
1227	C-O εστερικών ομάδων κροκινών
1070	C-O σακχάρων

Πίνακας 10.2.1. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (FT-IR) υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.

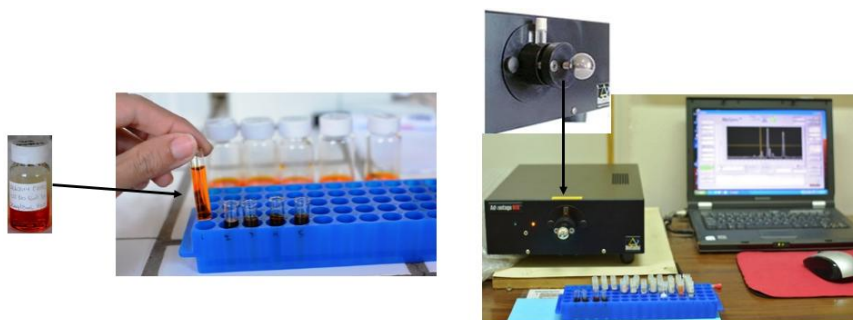
Η πλατιά κορυφή στην περιοχή των 3350 cm⁻¹ οφείλεται στις υδροξυλικές ομάδες των σακχάρων της πικροκροκίνης και των κροκινών, αλλά και σε μόρια διαλύτη που τυχόν δεν απομακρύνθηκαν κατά την ξήρανση (Socrates, 2001). Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή 3000-2840 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H (V_{C-H}) (Socrates, 2001). Η κορυφή στα ~1676 cm⁻¹ οφείλεται στις δονήσεις τάσης του καρβονυλίου (V_{C=O}) των εστερικών ομάδων των κροκινών (Tarantilis et al., 1998), ενώ αυτή στα 1612 cm⁻¹ στις δονήσεις τάσεις του διπλού δεσμού (V_{C=C}) του συζυγιακού συστήματος των κροκινών (Socrates, 2001). Η κορυφή στα 1367 cm⁻¹

αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης του δεσμού C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) (Socrates, 2001), ενώ αυτή στα 1227 cm^{-1} στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) των εστερικών ομάδων των κροκινών (Tarantilis et al., 1998). Τέλος, η απορρόφηση στα 1070 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις του δεσμού C-O των σακχάρων της πικροκροκίνης και των κροκινών (Tarantilis et al., 1998).

Αλλαγές στον κυματάριθμο της εμφάνισης και του εμβαδού των κορυφών, σημαίνει αλλαγές στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron.

Φασματοσκοπία Raman

Η καταγραφή των φασμάτων έγινε σε φασματόμετρο Raman DeltaNu Advantage 785 (εγγύς υπέρυθρο). Η διέγερση της πηγής Laser ήταν 785 nm και η ένταση της 120 mW (μέγιστη ένταση στο δείγμα 80 mW). Η ανάλυση του οργάνου ήταν 5 cm^{-1} . Με τη βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας, $0,7\text{ mL}$ υδατικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο, διαφανή σωλήνα 1 mL , ο οποίος στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην υποδοχή δείγματος του οργάνου έτσι ώστε η ακτίνα Laser να διέρχεται από το μέσο του σωλήνα. Το τελικό φάσμα Raman κάθε δείγματος αντιστοιχεί στο μέσο 10 φασμάτων με χρόνο ολοκλήρωσης (integration time) 10 sec/φάσμα στη φασματική περιοχή $2000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$.



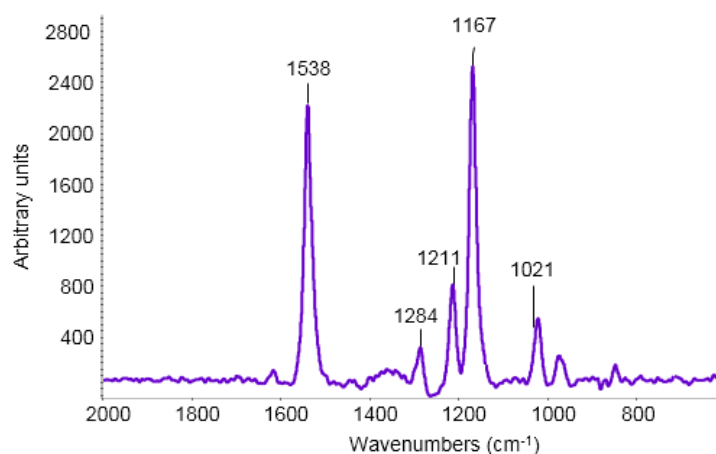
Εικόνα 10.2.2. Απεικόνιση λήψης φασμάτων με την Raman.

Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού OMNIC 7.3 της Thermo Fisher Scientific Inc., και περιλάμβανε την αυτόματη εξομάλυνση (automatic smooth) και την αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) των φασμάτων.

Όλες οι συγκρίσεις των φασμάτων έγιναν μεταξύ των δειγμάτων που ήταν μάρτυρες (control), δηλαδή δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί κάποια μεταχείριση, και των δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι επιταχυνόμενης γήρανσης, και

αφορούσαν τη φασματική περιοχή 2000-400 cm^{-1} , η οποία, όπως προκύπτει, περιλαμβάνει τις απορροφήσεις που οφείλονται στις λειτουργικές ομάδες των συστατικών των εκχυλισμάτων και την περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων.

Στο Γράφημα 10.2.2. παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron, όπως καταγράφηκαν με την τεχνική Raman, και στον Πίνακα 10.2.2. καταγράφονται οι εντάσεις των κορυφών του φάσματος (απορροφήσεις) και οι λειτουργικές ομάδες που τις αντιπροσωπεύουν.



Γράφημα 10.2.1. Τυπικό φάσμα Raman υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.

Κυματάριθμος (cm^{-1})	Λειτουργικές ομάδες
1538	C=C
1284	C-H (δονήσεις παραμόρφωσης)
1211	C-H (δονήσεις τάσης και κάμψης)
1167	C-C
1021	-CH ₃

Πίνακας 10.2.2. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Raman) υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.

Η κορυφή στα 1538 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του διπλού δεσμού C=C ($\nu_{\text{C=C}}$), ενώ αυτή στα 1284 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις παραμόρφωσης του δεσμού C-H. Αυτή στα 1167 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-C ($\nu_{\text{C-C}}$). Η κορυφή στα 1211 cm^{-1} οφείλεται κυρίως στις δονήσεις τάσης ($\nu_{\text{C-C}}$) και τις δονήσεις κάμψης ($\delta_{\text{C-H}}$) του απλού δεσμού. Η εμφάνιση της κορυφής στα 1021 cm^{-1} ($\rho_{\text{C-C}}$) οφείλεται στις δονήσεις αιώρησης των ομάδων CH₃, οι οποίες συνδέονται με άνθρακες της πολυενικής αλυσίδας σε απλό δεσμό (C-C). (Tarantilis et al., 1998).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη φασματοσκοπία Raman οι ζώνες δονητικών μεταπτώσεων διαχωρίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια δίνοντας έτσι πιο σαφή αποτελέσματα για ενώσεις με συμμετρική δομή, όπως είναι τα καροτενοειδή, δηλαδή οι κροκίνες στην περίπτωση του saffron (Tarantilis et al., 1998; Wold et al. 2004; Anastasaki et al., 2010). Επίσης, μείωση της έντασης της κορυφής 1167 cm^{-1} και η διάσπαση της σε μικρότερες, δείχνει τη μετατροπή των *trans* σε *cis* κροκίνες.

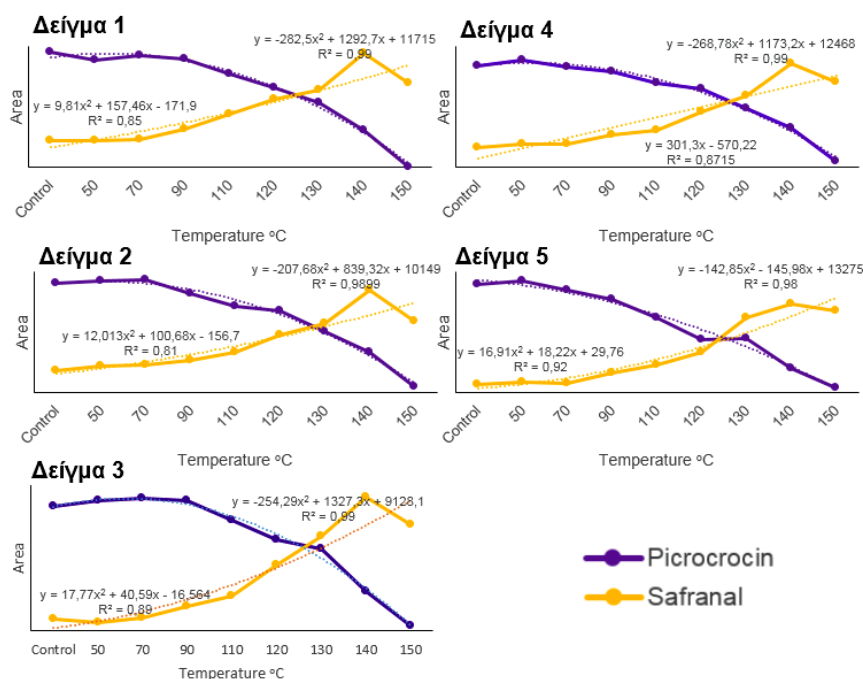
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11. Αποτελέσματα επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανση με χρήση θερμότητας

Στην ενότητα αυτή θα εξετάσουμε τα αποτελέσματα της επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανσης με χρήση θερμότητας, στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων του ελληνικού saffron, όπως αυτά προέκυψαν από τις μεθόδους ανάλυσης HPLC-DAD, FT-IR, Raman και θα αξιολογήσουμε τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες).

11.1. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

Οι γραφικές παραστάσεις στο Γράφημα 11.1.1. απεικονίζουν τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης, όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την επίδραση της βαθμιαίας αύξησης της θερμοκρασίας (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.1.), και καταγράφηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης HPLC-DAD (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 10.1.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών τους (Area), για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά.

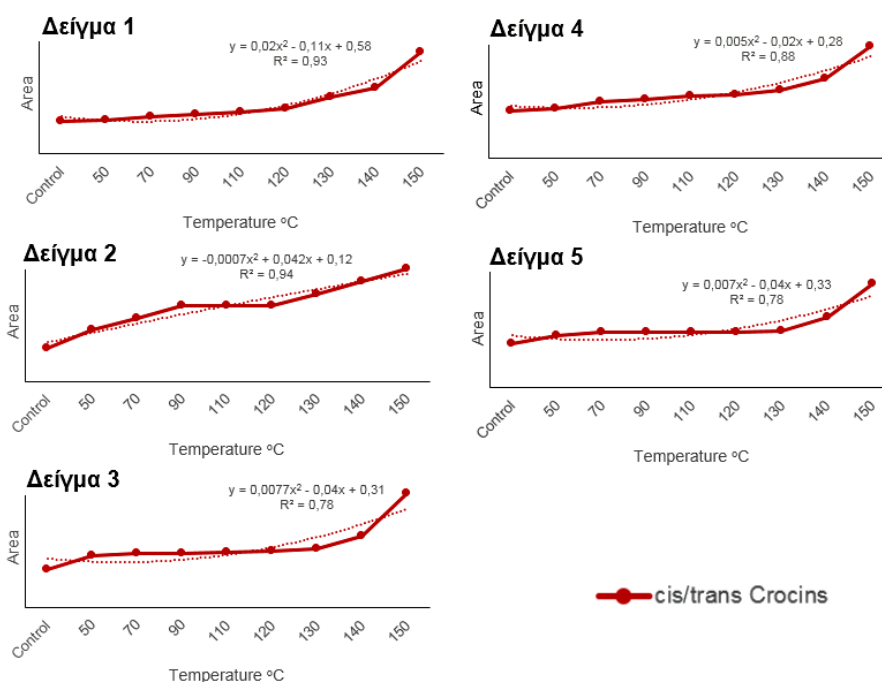


Γράφημα 11.1.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στην πικροκροκίνη και σαφρανάλη των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).

Εξετάζοντας το Γράφημα 11.1.1. είναι εμφανές ότι παρατηρούνται αλλαγές, στο σύνολο των δειγμάτων, τόσο στη συγκέντρωση της πικροκροκίνης όσο και της σαφρανάλης καθώς αυξάνεται βαθμιαία η θερμοκρασία με την οποία μεταχειρίζονται τα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι τους 70°C η συγκέντρωση της πικροκροκίνης αυξήθηκε σε μικρό βαθμό, ενώ μετά τους 90°C μειώθηκε. Ταυτόχρονα η συγκέντρωση της σαφρανάλης αυξάνεται. Οι μεταβολές αυτές γίνονται περισσότερο αισθητές στις μεταχειρίσεις με τις μεγαλύτερες θερμοκρασίες (110-150°C). Η πτώση στη συγκέντρωση της σαφρανάλης μετά τους 140°C πιθανότατα οφείλεται στην εξάτμισή της λόγω ακραίας θερμοκρασίας.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Carmona Delgado et al. (2005) ο οποίος εφάρμοσε παρόμοια τεχνική θερμικής επιταχυνόμενης γήρανσης σε ισπανικά δείγματα saffron. Ο ίδιος παρομοιάζει τη συμπεριφορά αυτή της πικροκροκίνης με τη μελέτη των Himeno et al. (1987), ότι δηλαδή η συγκέντρωση της πικροκροκίνης σε ανέπαφα στίγματα κρόκου κατά την ανάπτυξη του φυτού, παρουσιάζει μια σταδιακή αύξησή της πριν την άνθηση, και εν συνεχεία μια σημαντική μείωση της, η οποία συμπίπτει με την εμφάνιση των πτητικών ουσιών. Ταυτόχρονα με την μείωση της συγκέντρωσης της πικροκροκίνης, παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της σαφρανάλης, γεγονός που υποδηλώνει τη μετατροπή της πρώτης στη δεύτερη. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται από τη θεωρία πολλών ερευνητών, ότι δηλαδή η θερμική μεταχείριση του saffron είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή σαφρανάλης από την πικροκροκίνη (Himeno et al., 1987; Tarantilis et al., 1994; Winterhalter and Straubinger, 2000; Kanakis et al., 2004).

Οι γραφικές παραστάσεις στο Γράφημα 11.1.2. απεικονίζουν τη μεταβολή του λόγου των συγκεντρώσεων των *cis*-κροκινών προς τις *trans*-κροκίνες, όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την επίδραση της βαθμιαίας αύξησης της θερμοκρασίας (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.1.), και καταγράφηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης HPLC-DAD (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 10.1.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών τους (Area), για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά. Επιλέχθηκε να μελετηθεί ο λόγος *cis/trans*-κροκίνες, καθώς είναι ενδεικτικός για τη διαδικασία ισομερίωσης, δηλαδή τη μετατροπή των *trans* σε *cis*-κροκίνες.



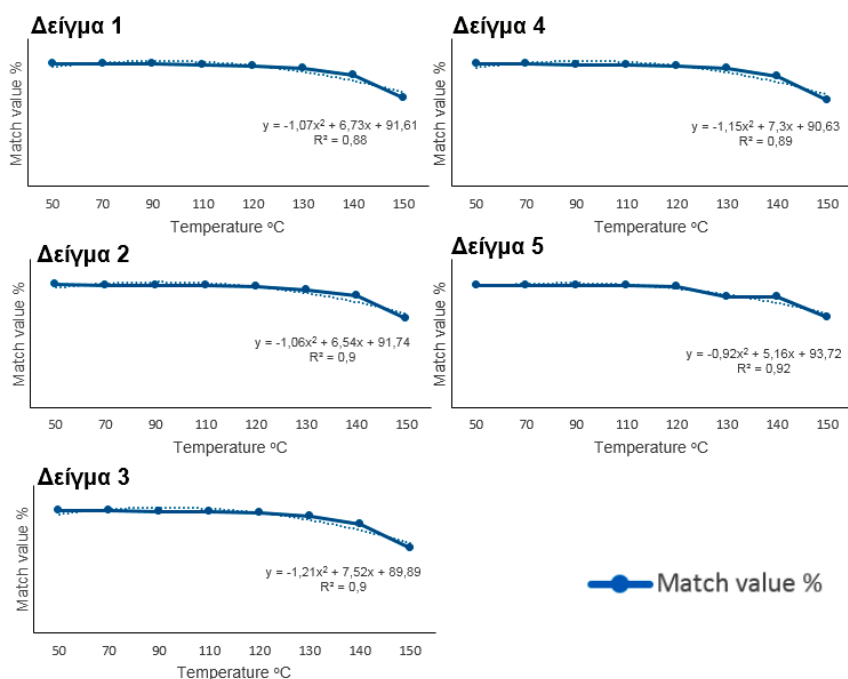
Γράφημα 11.1.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο λόγο *cis/trans*-κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).

Εξετάζοντας το Γράφημα 11.1.2. παρατηρούνται αλλαγές, στο σύνολο των δειγμάτων, στο λόγο των συγκεντρώσεων των *cis/trans*-κροκινών καθώς αυξάνεται βαθμιαία η θερμοκρασία με την οποία μεταχειρίζονται τα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος αυτός αυξάνεται σταδιακά υποδηλώνοντας την μείωση των *trans*-κροκινών και τη μετατροπή τους σε *cis*-κροκίνες, οι οποίες αυξάνονται. Η διαδικασία της ισομερίωσης είναι ανάλογη της βαθμιαίας αύξησης της θερμοκρασίας και παρατηρείται πιο έντονα στις υψηλότερες θερμοκρασίες (>120-130°C). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με αυτά των Carmona Delgado et al. (2005) που παρατηρήσαν ότι όταν τα δείγματα ισπανικού saffron μεταχειρίστηκαν με θερμότητα, οι 90°C αποτέλεσαν κριτικό σημείο της μετατροπής των *trans*-κροκινών-4 και 3 σε *trans*-κροκίνη 2 και *cis*-κροκίνες 3 και 2. Η διαδικασία αυτή της ισομερίωσης ήταν πιο ξεκάθαρη από τους 110°C και πάνω.

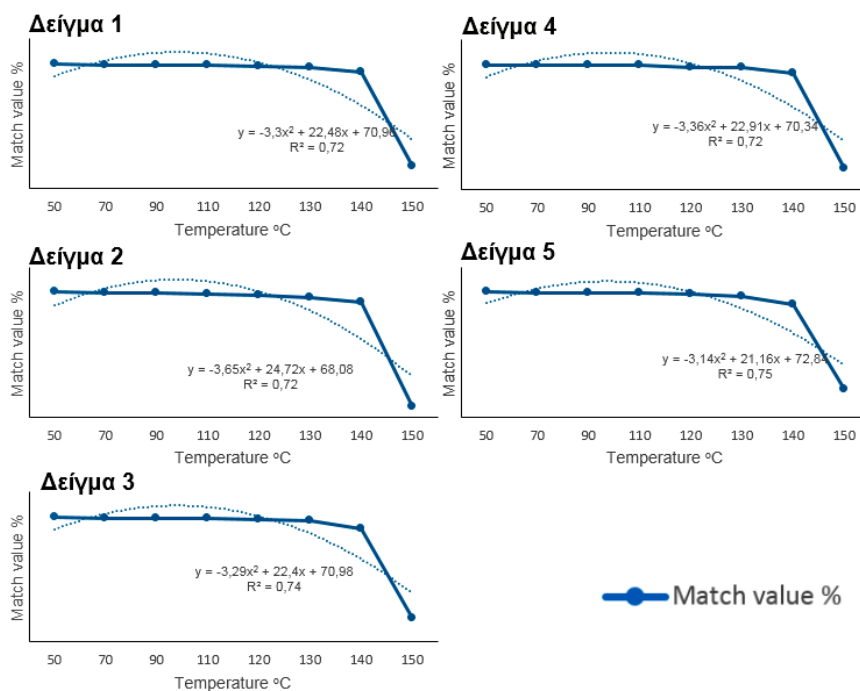
11.2. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με FT-IR και Raman

Οι γραφικές παραστάσεις στο Γράφημα 11.2.1. και 11.2.2 απεικονίζουν τις μεταβολές στο συνολικό προφίλ των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών του saffron (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες), όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την επίδραση της βαθμιαίας αύξησης της θερμοκρασίας (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.1.), και καταγράφηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης FT-IR και Raman (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 10.2.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τη σύγκριση ομοιότητας του

φάσματος του μάρτυρα (control) κάθε δείγματος, με τα φάσματα των αντίστοιχων μεταχειρισμένων δειγμάτων, για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι το % ποσοστό ομοιότητας που προκύπτει από τη σύγκριση αυτή (% match value).



Γράφημα 11.2.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).



Γράφημα 11.2.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).

Εξετάζοντας τα Γραφήματα 11.2.1. και 11.2.2. παρατηρούνται αλλαγές στο συνολικό προφίλ των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών καθώς αυξάνεται βαθμιαία η θερμοκρασία με την οποία μεταχειρίζονται τα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, ο συντελεστής συσχέτισης σταδιακά μειώνεται, με αισθητή τη διαφορά στις υψηλότερες θερμοκρασίες (130-150°C), πράγμα που σημαίνει ότι μειώνεται το ποσοστό ομοιότητας των μεταχειρισμένων δειγμάτων με τους αντίστοιχους μάρτυρές τους.

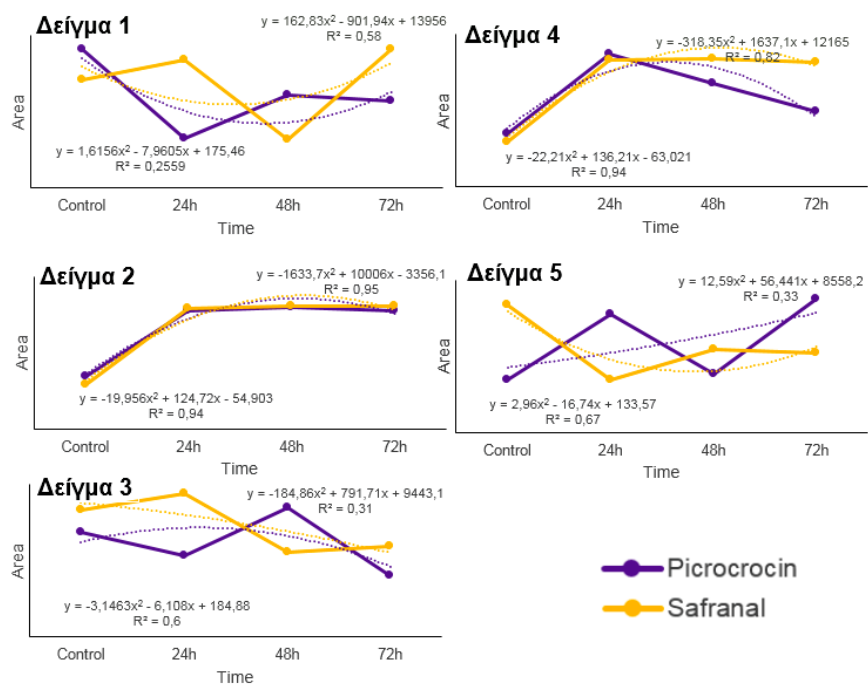
Στο Γράφημα 11.2.2. παρατηρείται απότομη πτώση του συντελεστή συσχέτισης μετά τους 140°C. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην αποικοδόμηση των κροκινών λόγω ακραίας θερμοκρασίας και το αποτέλεσμα αυτό αποτυπώνεται καλύτερα στα φάσματα Raman λόγω της ευαισθησίας τους στην καταγραφή των κροκινών.

12. Αποτελέσματα επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

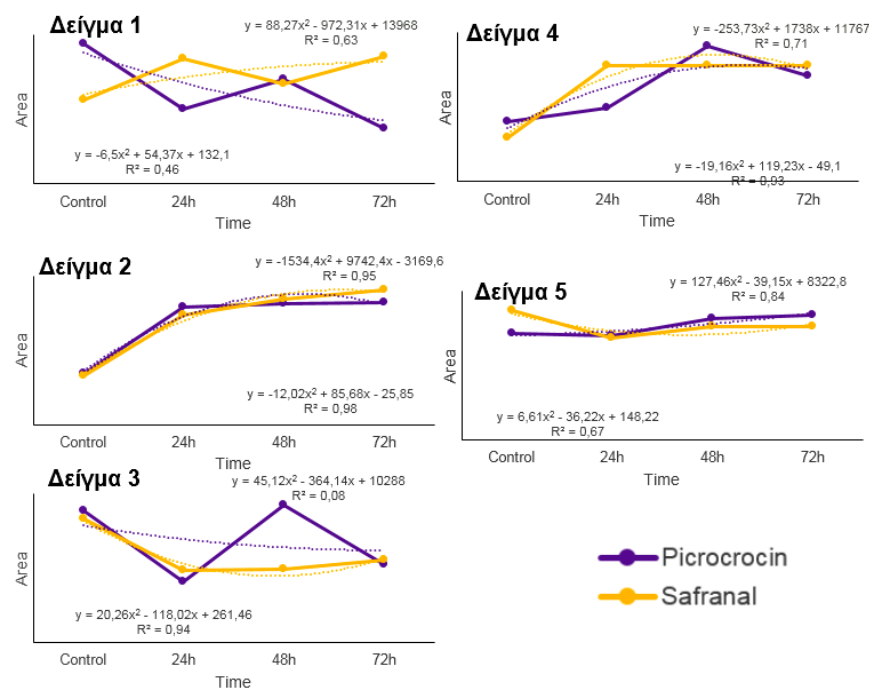
Στην ενότητα αυτή θα εξετάσουμε τα αποτελέσματα της επίδρασης της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm και 365nm), στο σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων του ελληνικού saffron, όπως αυτά προέκυψαν από τις μεθόδους ανάλυσης HPLC-DAD, FT-IR, Raman και θα αξιολογήσουμε τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών του saffron (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες).

12.1. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με HPLC-DAD

Οι γραφικές παραστάσεις στο Γράφημα 12.1.1. και 12.1.2. απεικονίζουν τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης, όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την έκθεση των δειγμάτων σε ακτινοβολία UV με μήκη κύματος 254nm και 365nm (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.2.), και καταγράφηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης HPLC-DAD (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 10.1.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών τους (Area), για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά.



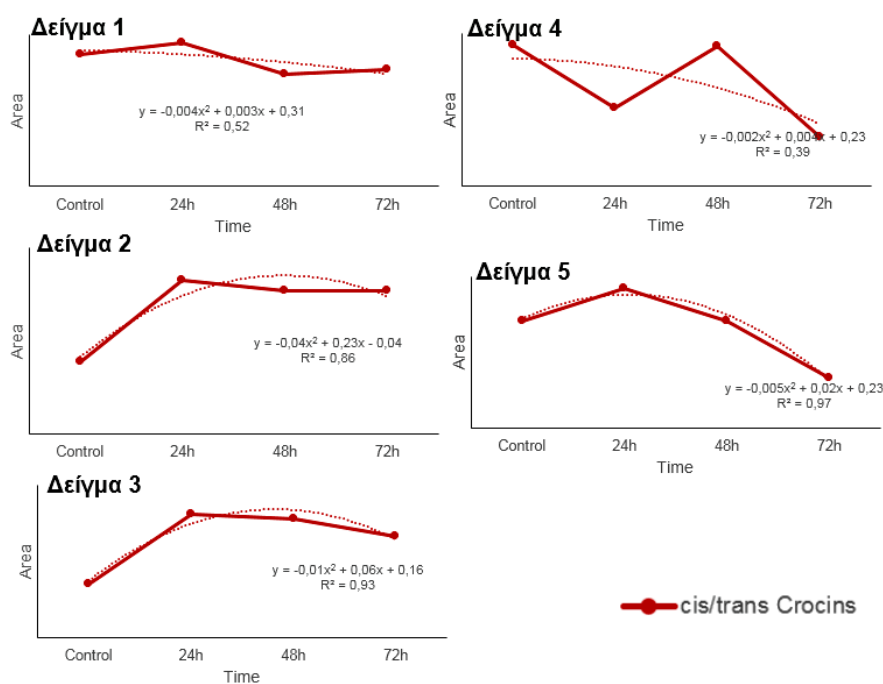
Γράφημα 12.1.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στην πικροκροκίνη και σαφρανάλ των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).



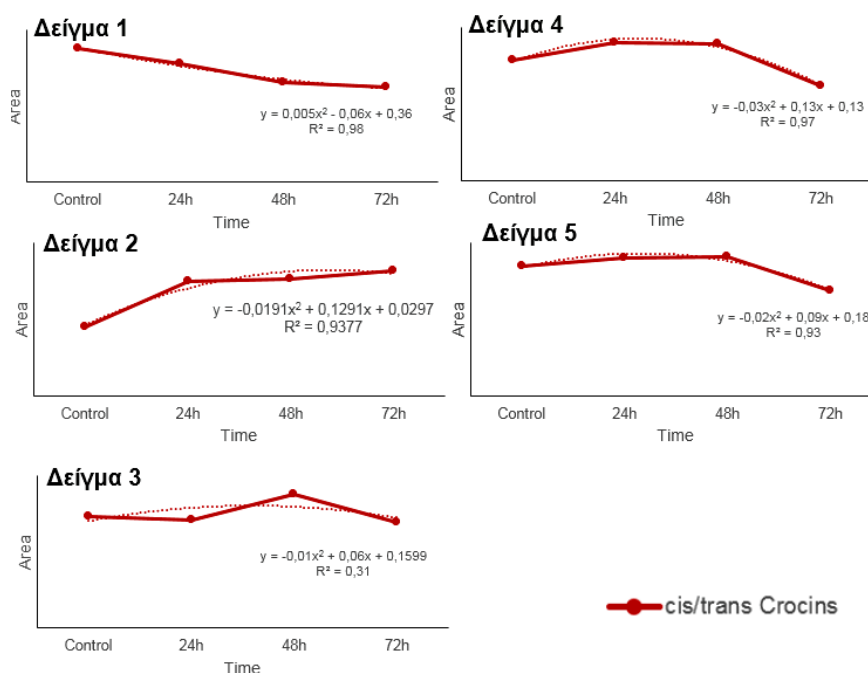
Γράφημα 12.1.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στην πικροκροκίνη και σαφρανάλ των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).

Εξετάζοντας τα Γραφήματα 12.2.1. και 12.1.2. διαπιστώνουμε ότι, στο σύνολο των δειγμάτων, αν και παρατηρούνται αλλαγές στις συγκεντρώσεις της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης, δεν διακρίνεται συστηματική μεταβολή. Για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί κάποια σαφής τάση για την επίδραση της ακτινοβολίας στα 254nm, ούτε όταν το μήκος κύματος αυξήθηκε στα 365nm.

Οι γραφικές παραστάσεις στα Γραφήματα 12.1.3. και 12.1.4. απεικονίζουν τη μεταβολή του λόγου των συγκεντρώσεων των *cis*-κροκινών προς τις *trans*-κροκίνες, όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την έκθεση των δειγμάτων σε ακτινοβολία UV με μήκη κύματος 254nm και 365nm (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.2.), και καταγράφηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης HPLC-DAD (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 10.1.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών τους (Area), για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά. Επιλέχθηκε να μελετηθεί ο λόγος *cis/trans*-κροκίνες, καθώς είναι ενδεικτικός για τη διαδικασία ισομερίωσης, δηλαδή τη μετατροπή των *trans* σε *cis*-κροκίνες.



Γράφημα 12.1.3. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο λόγο *cis/trans*-κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).

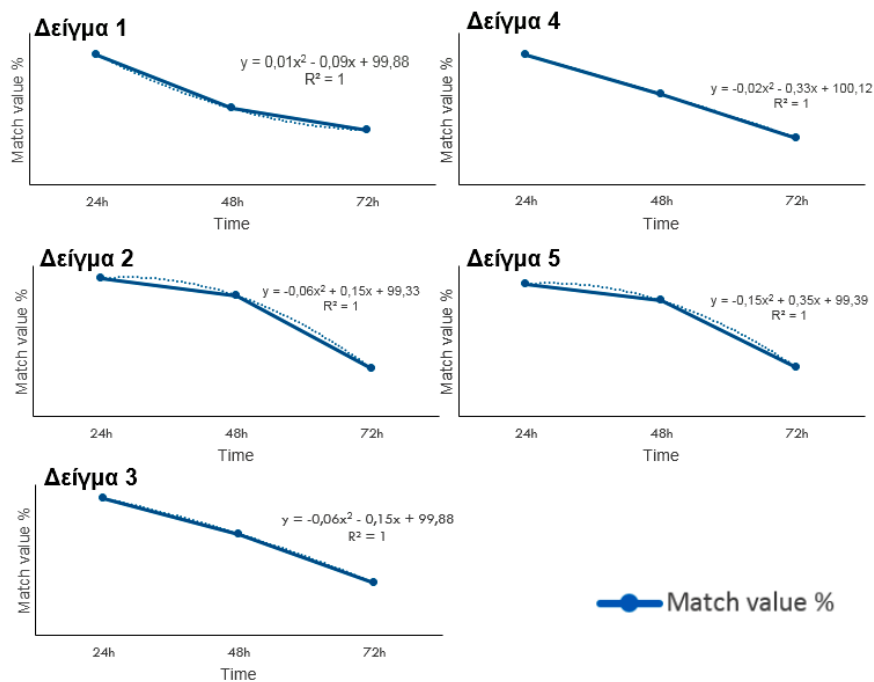


Γράφημα 12.1.4. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο λόγο cis/trans-κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).

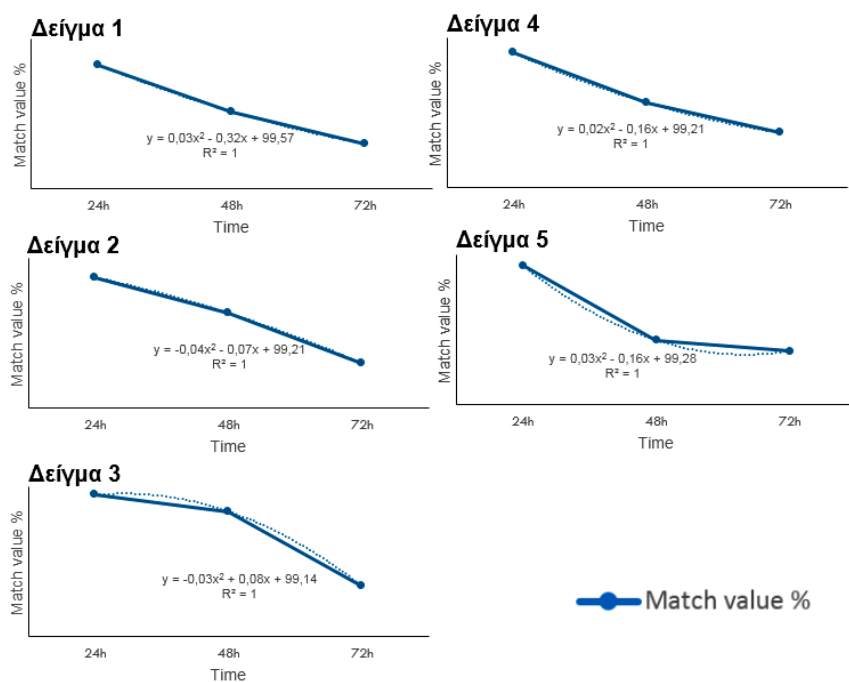
Όπως και στην περίπτωση της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης, διαπιστώνουμε ότι, στο σύνολο των δειγμάτων, αν και παρατηρούνται αλλαγές στο λόγο των συγκεντρώσεων cis/trans-κροκίνες, δεν διακρίνεται συστηματική μεταβολή. Για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί κάποια σαφής τάση για την επίδραση της ακτινοβολίας στα 254nm, ούτε όταν το μήκος κύματος αυξήθηκε στα 365nm.

12.2. Ανάλυση υδατικών εκχυλισμάτων με FT-IR και Raman

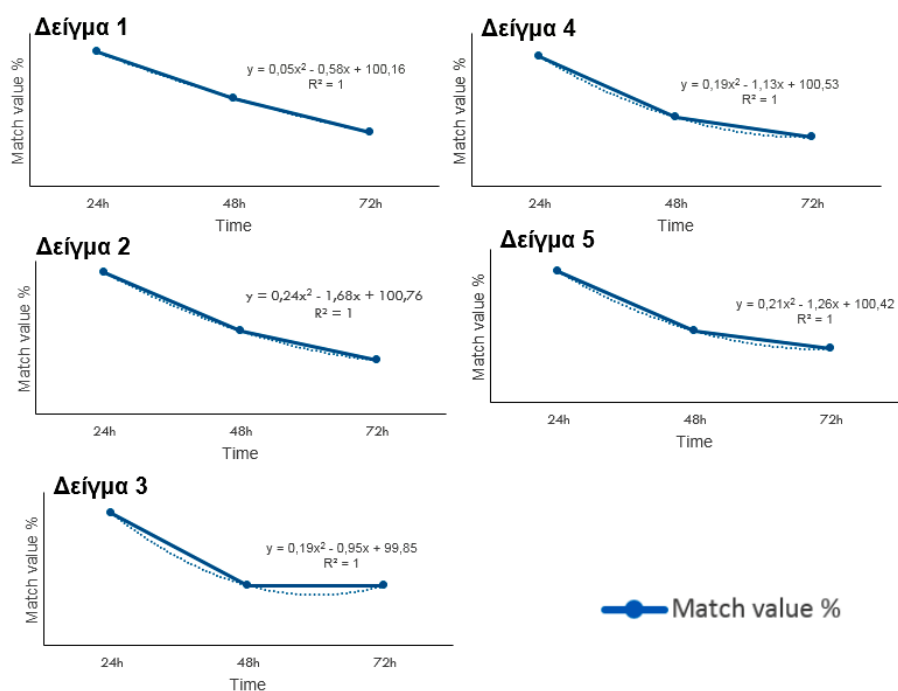
Οι γραφικές παραστάσεις στο Γράφημα 12.2.1. , 12.2.2, 12.2.3. και 12.2.4. απεικονίζουν τις μεταβολές στο συνολικό προφίλ των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών του saffron (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες), όπως αυτές διαμορφώθηκαν από την έκθεση των δειγμάτων σε ακτινοβολία UV με μήκη κύματος 254nm και 365nm (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 9.1.2.), και καταγράφηκαν με τις μεθόδους ανάλυσης FT-IR και Raman (όπως περιγράφονται στην Ενότητα 10.2.). Οι μεταβολές αυτές προέκυψαν από τη σύγκριση ομοιότητας του φάσματος του μάρτυρα (control) κάθε δείγματος, με τα φάσματα των αντίστοιχων μεταχειρισμένων δειγμάτων, για κάθε ένα από τα δείγματα ξεχωριστά. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι το % ποσοστό ομοιότητας που προκύπτει από τη σύγκριση αυτή (% match value).



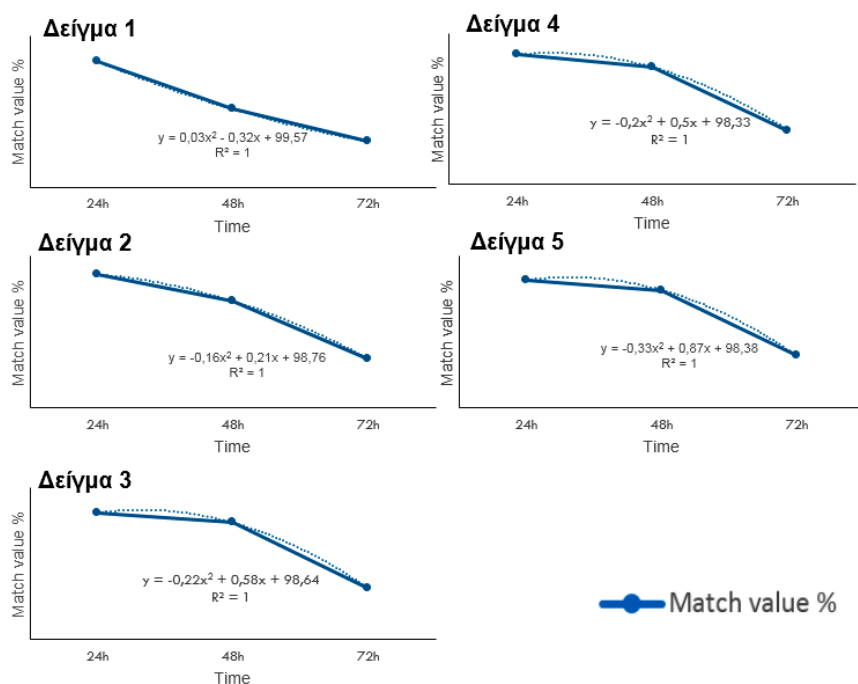
Γράφημα 12.2.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).



Γράφημα 12.2.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).



Γράφημα 12.2.3. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).



Γράφημα 12.2.4. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).

Εξετάζοντας τα προαναφερθέντα γραφήματα (Γράφημα 12.2.1. , 12.2.2, 12.2.3. και 12.2.4.) παρατηρείται ότι υπάρχει συστηματική μεταβολή στο προφίλ των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών, σε όλα τα δείγματα. Καθώς η διάρκεια της έκθεσης στην ακτινοβολία αυξανόταν, ο συντελεστής συσχέτισης μειώνεται, που σημαίνει ότι μειώνεται το ποσοστό ομοιότητας των μεταχειρισμένων δειγμάτων με τους αντίστοιχους μάρτυρές τους.

Συστηματικές μελέτες για την επίδραση της UV ακτινοβολίας στους δευτερογενείς μεταβολίτες του saffron δεν παρουσιάζονται μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, έχουν γίνει μελέτες για την επίδραση της ακτινοβολία-γ, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξυγίανση του προϊόντος από μικροοργανισμούς. Στην τελευταία περίπτωση. Μελέτη των Zareena et al. (2001) έδειξε ότι η έκθεση σε ακτινοβολία-γ θα μπορούσε να ευθύνεται για τη μείωση της σαφρανάλης του δείγματος και την αλλοίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του, όταν υποβλήθηκε σε δόσεις ακτινοβολίας άνω των 5 kGy. Ως εκ τούτου, το saffron δεν υποβλήθηκε σε επεξεργασία πέρα από αυτή τη δόση. Τέλος, στην ίδια μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν ποιοτικές αλλαγές στις κροκίνες. Οι ποσοτικές αλλαγές βρέθηκαν να κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με αυτά που συμβαίνουν κατά τη συντήρηση και αποθήκευση των δειγμάτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το χημικό προφίλ της πικροκροκίνης και σαφρανάλης παρουσίασε μεταβολές στο σύνολο των δειγμάτων, όταν αυτά υποβλήθηκαν στην τεχνική της επιταχυνόμενης γήρανσης με θέρμανση. Πιο συγκεκριμένα, από τις αναλύσεις της HPLC-DAD, παρατηρήθηκε ότι στα μεταχειρισμένα δείγματα μέχρι τους 70°C η συγκέντρωση της πικροκροκίνης αυξήθηκε σε μικρό βαθμό, ενώ μετά τους 90°C μειώθηκε, με ακόμα πιο αισθητή αυτή τη μείωση στους μεγαλύτερους βαθμούς θερμοκρασίας. Ταυτόχρονη μεταβολή παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση της σαφρανάλης, η οποία παρουσίασε σταδιακή αύξηση.
- Όσον αφορά τους ίδιους δευτερογενείς μεταβολίτες (πικροκροκίνη, σαφρανάλη), οι αναλύσεις της HPLC-DAD ήταν λιγότερο έως καθόλου ξεκάθαρες, όταν τα δείγματα μεταχειρίστηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία, τόσο στα 254nm όσο και στα 365nm, εφόσον δεν παρουσίασαν καμία σαφή τάση στο σύνολο των δειγμάτων.
- Το χημικό προφίλ των κροκινών επίσης παρουσίασε μεταβολές στο σύνολο των δειγμάτων, όταν αυτά υποβλήθηκαν στην τεχνική της επιταχυνόμενης γήρανσης με θέρμανση. Πιο συγκεκριμένα, από τις αναλύσεις της HPLC-DAD, παρατηρήθηκε ότι ο λόγος των *cis/trans* εστέρων της κροκετίνης σταδιακά αυξανόταν, υποδηλώνοντας έτσι ότι η θερμική μεταχείριση των δειγμάτων του saffron, είναι υπεύθυνη για την ισομερίωση των *trans* σε *cis*-κροκίνες, αποτέλεσμα το οποίο είναι περισσότερο εμφανές στις υψηλότερες θερμοκρασίες (120°C-150°C).
- Όπως και στην περίπτωση της πικροκροκίνης και της σαφρανάλης, η επίδραση της ακτινοβολίας, στο σύνολο των δειγμάτων, δεν έδειξε σαφή αποτελέσματα για το προφίλ των κροκινών, όπως φάνηκε από τις αναλύσεις της HPLC-DAD.
- Η ανάλυση των δειγμάτων με τις φασματοσκοπίες FT-IR και Raman έδωσαν σαφή αποτελέσματα, με τις μεταβολές στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών να είναι εμφανείς, τόσο στην περίπτωση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας, όσο και σε αυτή με τη χρήση ακτινοβολίας. Οι φασματοσκοπίες, σε σύγκριση με την HPLC-DAD, έδωσαν καλύτερη εικόνα των αλλαγών και πιθανώς αυτό οφείλεται στην υψηλή ευαισθησία αυτών των μεθόδων ανάλυσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdullaev** F.I. (2002). Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* (Maywood). 227(1): 20-5.
- Abe** K., Saito H. (2000). Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytotherapy Research*, 14(3), 149-152.
- Ait Oubahou**, A., El Otmani, M. (1999). Saffron cultivation in Morocco. In: Negbi, Moshe (Ed.), *Saffron Crocus sativus* L. ISSN 1027-4502 8, pp. 87–94.
- Akhondzadeh** S., Tahmacebi-Pour N., Noorbala A., Amini H., Fallah-Pour H., Jamshidi A., et al. (2005). *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo controlled trial. *Phytotherapy Research*, 19, 148–151.
- Alonso** G. L., Salinas M. R., Sa´nchez-Ferna´ndez M.A., Garijo J. (2001) Note. Safran content in Spanish saffron. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 225-229.
- Alonso** G.L., Varan R., Gomez R., Navarro F., Salinas M.R. (1990). Autooxidation in saffron at 40° C and 75% relative humidity. *Journal of Food Science*, 55(2), 595-596.
- Anastasaki** E.G., Kanakis CD., Pappas C, Maggi L, Zaiacain A., Carmona M., Alonso G.L., Polissiou M.G. (2010b). Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6011 -6017.
- Basker** D. (1999). Saffron chemistry. En: *Saffron. Crocus sativus* L. Medicinal and aromatic plants. Industrial profiles. Negbi M. Ed., Harwood Academic publishers, Amsterdam, Holanda, 45 – 42.
- Buchecker** R., Eugster C.H. (1973). Absolute configuration of picrocrocin. *Helv. Chim. Acta.* 56(3): 1121-1125.
- Carmona** Delgado M., Zalacain A., Pardo J.E., López E., Alvarruiz A., Alonso G.L. (2005). Influence of Different Drying and Aging Conditions on Saffron Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), pp 3974–3979.
- Carmona** Delgado M., Zalacain Aramburu A., Alonso Díaz-Marta G.L. (2006). The chemical composition of saffron: Color, taste and aroma. Albacete, Spain: Editorial Bomarzo.

- Carmona M.**, Zaiacain A., Sanchez A.M., Novella J.L., Alonso, G.L. (2006b). Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 973-979.
- Carmona M.**, Zalacain A., Salinas M. R., & Alonso G. L. (2007). A new approach to saffron aroma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 145–159.
- Chryssanthi D.G.**, Lamari F.N., Iatrou G., Pylara A., Karamanos N.K., Cordopatis P. (2007). Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. - *Anticancer Res.* 27: 357-362.
- Dinghra V.K.**, Seshadri T.R, Mukerjee S.K. (1975). Minor carotenoid glycosides from saffron (*Crocus sativus* L). *Ind. J.Chem.* 13(4): 339-341.
- García-Rodríguez M.**, Serrano-Díaz J., Tarantilis P., López-CórcolesM., Manuel Carmona M., Alonso G. (2014). Determination of Saffron Quality by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 62: 8068–8074.
- Georgiadou G.**, Grivas V., Tarantilis P.A., Pitsikas N. (2013). Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L, counteracted ketamine-induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology*, 1-10.
- Giaccio M.** (2004). Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(3):155-72.
- Himeno H.**, Sano K. (1987). Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 2395-2400.
- Hosseinzadeh H.**, Noraei N. B. (2009). Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytotherapy Research*, 23(6), 768–774.
- ISO 3632-1** (2003). Saffron (*Crocus sativus* L.) - Specification. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Kanakis C. D.**, Daferera D. J., Tarantilis P. A., Polissiou M. G.(2004). Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1- cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4515-4521.

Khun R., Winterstein A. (1934). Die Dihydroverbindung der isomeren Bixine und die Elektronen-Konfiguration der Polyene. Ber. Deustsch. Chem. Ges. 67: 344-347.

Kianbakht S., Mozaffari K. (2009). Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and non diabetic rats. Journal of Medicinal Plants, 8(5), 30-38.

Lewis Y. S., Sampathu S. R., Shivashankar S., Natarajan C.P. (1981). Quality evaluation of shaffron. Arecanuth spices and Cacao J., 4: 113 – 117.

Maggi L., Carmona M., del Campo C. P., Kanakis C. D., Anastasaki E., Tarantilis P. A., et al. (2009). Worldwide market screening of saffron volatile composition. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89(11), 1950-1954.

Martinez-Tome M., Jimenez A.M, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia M.A (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives, J Food Prot. 64(9):1412-9.

Negbi Moshe (1999). Saffron - *Crocus sativus* L., Medicinal and aromatic plants- Industrial profiles. Hardwood academic publishers.

Ohashi H., Miyoshi A. (1964). Ecological studies on the saffron (*Crocus sativus* L.) III. On the effect of soil moisture upon the development and yield. Universidad de Nagasaki. Japon.

Ordoudi S.A., Tsimidou Z.M. (2004), Saffron Quality: Effect of agricultural practices, processing and storage. In Production and Quality Assessment of Food Crops, Ramdane Dris and S.Mohan Jain, (Eds).

Pappas C.S., Tarantilis P.A., Moschopoulou E., Moatsou G., Kandarakis I., Polissiou M.G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. Food Chemistry, 106(3), 1271-127.

Pfander H., Wittwer F. (1975). Carotenoid-glycosides. Investigation of carotenoid-composition of saffron. Helv Chim Acta. 58(6): 1608-20.

Pitsikas N., Bouladakis A., Georgiadou G., Tarantilis P. A., Sakellaris N. (2008). Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in animal model of anxiety. Phytomedicine, 15(12), 1135-1139.

- Raina B. L.**, Agarwal G. S., Bhatia A. K., Gaur G. S. (1996). Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *J. Sci. Food Agric.* 71, 27-32.
- Rios J. L.**, Recio M. C., Giner R. M., Manez S. (1996). An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 10: 189-193.
- Sampathu S. R.**, Shirashankar S., Lewis Y. S. (1984). Saffron (*Crocus Sativus* L.) - Cultivation, Processing, Chemistry and Standardisation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20: 123-157.
- Socrates G.** (2001). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Table and Charts (3rd ed.). West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Speranza G.**, Dada G., Manitto P., Monti D., Gramatica P. (1984). 13-cis crocin; A new crocinoid from saffron. *Gaceta Chim. Ital.* 114: 189-192.
- Tarantilis P.A.**, Morjani H., Polissiou M., Manfait, M. (1994a): Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. - *Anticancer Res.* 14: 1913-1918.
- Tarantilis P.A.**, Polissiou M., Manfait, M. (1994b). Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode - array detection. *Journal of Chromatography A.* 664(1), 55-61.
- Tarantilis P.A.**, Tsoupras G., Polissiou M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. - *J. Chromatogr. A.* 699:107-118.
- Tarantilis P. A.**, Polissiou M. (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 459-462.
- Tarantilis P.A.**, Beljebbar A., Manfait M., Polissiou, M. (1998). FT-IR, FT-Raman spectroscopic study of carotenoids from saffron (*Crocus sativus* L.) and some derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, 54, 651-657.
- Tarantilis P.A.**, Troianou V.E., Pappas C.S., Kotseridis Y.S., Polissiou M.G (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 111(0), 192-196.

Tsimidou M., Biliaderis C.G. (1997). Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2890 - 2898.

Winterhalter P., Straubinger R. M., (2002). Saffron. Renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16, 39-59

Wold J. P., Marquardt B. J., Dable B. K., Robb, D., Hatlen, B. (2004). Rapid quantification of carotenoids and fat in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by Raman spectroscopy and chemometrics. *Appl. Spectrosc.*, 58 (4), 395–403.

Xi L., Qian Z. Y., Shen X. C., Wen, N., Zhang, Y. B. (2005). Crocetin prevents dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Planta Medica*, 71(10), 917–922.

Xu G. L., Li G., Ma H. P., Zhong H., Liu F., Ao G. Z. (2009). Preventive effect of crocin in inflamed animals and in LPS-challenged RAW 264.7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8325–8330.

Zareena A. V., Variyar, P. S., Gholap A. S., Bongirwar, D. R. (2001). Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 687–691.

Κουτσός Β. Θεόδωρος (2006). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. (σελ. 181-186). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη.

Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2003), Τόμος 2, Κεφάλαιο IV, άρθρο 42, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα.

Λαδοπούλου, Κ. (1998): Περιληπτική αναφορά σε ορισμένες νεότερες έρευνες για τον *Crocus sativus* L. Πρακτικά εκπαιδευτικού τριημέρου: "Κρόκος: Φάρμακο και Άρτυμα". Ελληνική Εταιρεία Εθνοφαρμακολογίας.

Λευκή Βίβλος. Ο κρόκος στην Ευρώπη, ISBN: 978-960-8092-56-3.

Σταμπόλη Ευανθία Α. (2011). Επίδραση των καιρικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της συγκομιδής στις ποιοτικές παραμέτρους του saffron κατά ISO 3632. Μεταπτυχιακή διατριβή. Γενικό τμήμα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών: Θετικές επιστήμες στη Γεωπονία, Μελέτη και αξιοποίηση φυσικών πόρων.

Ταραντίλης Πέτρος (2004). Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης - Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Συντομογραφία	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
ATR	Attenuated Total Reflectance	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Μεταβαλλόμενου Μήκους Κύματος
FT-IR	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
ISO	International Organization for Standardization	Διεθνής Οργανισμός για την Τυποποίηση
USAE	UltraSound Assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπέρηχους
UV-Vis	Ultraviolet-Visible	Υπεριώδες - Ορατό

II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. <i>Crocus sativus</i> L. – Κρόκος ο ήμερος	1
Εικόνα 1.2. Τοιχογραφίες μινωϊκής εποχής.....	2
Εικόνα 1.3. Χώρες καλλιέργειας κρόκου.	2
Εικόνα 2.2. Κορμοί, ρίζες, φύλλα και άνθος του <i>Crocus sativus</i> L.	4
Εικόνα 3.1. Συλλογή ανθέων (αριστερά) και διαχωρισμός στιγμάτων (δεξιά) με το χέρι.	5
Εικόνα 4.1. Αποξηραμένα στίγματα του άνθους του φυτού <i>Crocus sativus</i> L.....	7
Εικόνα 5.1. Συσκευασία ελληνικού κρόκου Κοζάνης σε νήματα.	8
Εικόνα 6.1.1. Οι χημικές δομές των κυριότερων κροκινών	11
Εικόνα 6.1.2. Χημική δομή της πικροκροκίνης	11
Εικόνα 6.1.3. Σχηματική απεικόνιση υποβάθμισης της πικροκροκίνης.....	12
Εικόνα 6.1.4. Χημική δομή της σαφρανάλης. Το βασικότερο συστατικό του αιθερίου ελαίου του saffron.....	12
Εικόνα 8.1. Στάδια της πειραματικής διαδικασίας	17
Εικόνα 9.3.1. Απεικόνιση της προετοιμασίας των δειγμάτων saffron για εκχύλιση.....	19
Εικόνα 9.4.1. Εκχύλιση USAE, φιλτράρισμα και υδατικά εκχυλίσματα saffron έτοιμα για περαιτέρω ανάλυση.....	19
Εικόνα 10.1.1. Σύστημα της HPLC-DAD που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.	20
Εικόνα 10.2.2. Απεικόνιση λήψης φασμάτων με την Raman.	26

III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 6.1. Η κατά προσέγγιση χημική σύσταση των σιγμάτων του <i>Crocus sativus</i> (Lewis et al., 1981; Sampathu et al., 1984; Rios et al., 1996; Basker, 1999).	9
Πίνακας 8.1. Τα δείγματα saffron που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.	17
Πίνακας 9.1.1. Μεταχείριση δειγμάτων κατά την επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση θερμότητας.	18
Πίνακας 9.2.1. Μεταχείριση δειγμάτων κατά την επιταχυνόμενη γήρανση με χρήση ακτινοβολίας.	18
Πίνακας 10.1.1. Συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων saffron που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με χρήση της HPLC, ο χρόνος έκλουσης (t_R) και το φάσμα UV-Vis που παρουσίασαν.	23
Πίνακας 10.2.1. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (FT-IR) υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.	25
Πίνακας 10.2.2. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Raman) υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.	27

IV. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 10.1.1. Τυπικά χρωματογραφήματα υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron, στα οποία διακρίνονται οι κορυφές των κύριων συστατικών του (πικροκροκίνη, σαφρανάλη, κροκίνες).	21
Γράφημα 10.2.1. Τυπικό φάσμα FT-IR υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.	25
Γράφημα 10.2.1. Τυπικό φάσμα Raman υδατικού εκχυλίσματος ελληνικού saffron.	27
Γράφημα 11.1.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στην πικροκροκίνη και σαφρανάλη των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	29
Γράφημα 11.1.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο λόγο cis/trans-κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	31
Γράφημα 11.2.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).	32
Γράφημα 11.2.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση θερμότητας στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).	32
Γράφημα 12.1.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στην πικροκροκίνη και σαφρανάλη των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	34
Γράφημα 12.1.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στην πικροκροκίνη και σαφρανάλη των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	34
Γράφημα 12.1.3. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο λόγο cis/trans κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	35
Γράφημα 12.1.4. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο λόγο cis/trans κροκίνες των δειγμάτων ελληνικού saffron (HPLC-DAD).	36

Γράφημα 12.2.1. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).	37
Γράφημα 12.2.2. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (254nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).	37
Γράφημα 12.2.3. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (FT-IR).	38
Γράφημα 12.2.4. Επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης με τη χρήση ακτινοβολίας (365nm) στο συνολικό προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών των δειγμάτων ελληνικού saffron (Raman).	38

V. ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θερμοκρασία (°C)	Δείγμα	Area							
		Πικροκροκίνη	Σαφρανάλη	trans-4-GG	trans-3-Gg	trans-2-gg	cis-4-GG	trans-2-G	cis
Control	1	13288,96	167,8776	13266,87	10674,11	1125,749	6313,648	3496,869	2433,429
	2	4761,687012	46,11000443	9666,52051	7383,4937	778,56903	1834,729	1949,0861	830,5313
	3	10205,96973	166,640976	12577,8447	11443,58	2940,4705	4246,231	5188,0923	2773,598
	4	13417,87012	47,00541306	11962,6076	10223,424	2001,9409	4280,253	4123,1436	2413,175
	5	8542,168945	120,9457092	12339,165	11392,523	3163,0242	4726,453	5858,4961	3615,17
50	1	12460,81836	160,9112091	13211,8096	10978,226	1153,7399	6773,859	3179,4016	2924,308
	2	11047,4834	146,5843964	13425,5889	10828,839	1531,3555	6038,281	5197,7607	2622,782
	3	8719,685547	109,8648071	12572,8623	11378,576	2316,4285	5735,893	4747,605	3481,623
	4	14122,45801	155,6859283	13352,8115	11999,189	2024,0428	5030,675	4565,5889	2902,251
	5	12859,26465	172,1612854	13338,0889	11909,627	2447,7268	6189,917	4997,5615	3553,837
70	1	12932,8418	203,8968353	13987,8447	11836,481	1292,0201	6428,439	3805,905	2622,292
	2	11177,48	164,9522858	13719,4512	11491,268	1867,8115	6341,527	4744,3892	2743,004
	3	10838,56836	174,1591644	14502,2178	11845,358	1818,8931	6507,517	5664,9897	2855,004
	4	13184,08105	161,8205261	14424,9111	12050,268	1753,5289	5572,012	4972,7207	2472,63
	5	9786,68457	155,8765564	14048,6328	11995,368	2038,2399	6510,085	5447,7578	3072,386
90	1	12599,20117	460,4981384	746,159912	810,83783	11408,363	1649,735	7628,7222	4811,126
	2	9786,086914	289,6611328	13658,9336	11362,43	2099,8628	6623,317	5649,8838	3561,73
	3	10681,88965	335,5569153	13626,8164	11092,172	1801,2922	6846,353	5054,2212	3435,073
	4	12668,83691	409,4277649	13872,2256	11401,286	1820,9437	6542,049	5106,3662	3412,522
	5	10789,54492	312,1281128	13849,3184	11405,953	2057,4187	7324,553	5538,1133	3900,355
110	1	10810,99121	1223,188599	19781,9102	13815,397	2029,2195	12778,08	9784,7158	7248,137
	2	8582,674805	480,9834595	12857,4492	9529,2559	1222,7582	7750,424	5680,4473	3352,681
	3	9097,241211	481,1123047	13660,5645	10289,828	1443,1089	8842,374	6381,2783	3898,279
	4	11070,94434	567,0193481	13360,0859	10149,592	1269,786	8038,554	5866,1602	3582,869
	5	8626,623047	452,3848877	13333,3125	10015,169	1337,3575	8366,815	5938,9824	3627,2
120	1	9263,445313	1179,162598	17107,2539	8989,6182	1210,9806	8117,926	10783,144	3575,041
	2	8042,125	911,7854614	16142,0264	8758,9629	1086,5591	7716,621	9689,5176	3381,732
	3	7447,776855	898,6098633	17023,0566	8921,667	1288,0714	7877,898	10338,002	3604,671
	4	10287,75293	1089,662964	17624,5918	9919,6338	1196,5634	8434,024	10733,099	3875,356
	5	6154,053223	667,8893433	16853,3184	8286,0713	1308,626	7636,394	10074,032	3278,166
130	1	7453,217285	1431,334473	8498,96387	3719,4988	1223,8479	3893,42	9169,5879	3758,606
	2	6057,105469	1194,848145	7967,42676	3447,2419	1129,7102	3602,924	8508,8545	3229,806
	3	6737,081055	1298,880615	8754,25586	3876,5618	1246,54	4163,376	9126,4434	3594,084
	4	7776,921387	1562,44104	8781,71875	4005,8657	1177,6094	4164,644	9182,6787	3613,292
	5	6266,150391	1223,358276	8130,33643	3434,7507	1099,9102	3656,655	8367,6543	3192,904
140	1	4261,114258	2329,337158	2875,22266	1402,8376	1130,4465	1520,173	4904,2998	2600,814
	2	3959,453613	2044,846558	3004,6438	1466,1825	716,30994	1537,228	5382,7632	2796,995
	3	3245,659	1828,605591	2680,95532	1393,7906	671,87488	1345,583	4746,3247	2560,093
	4	5146,146484	2482,675781	3145,91968	1562,1917	703,83374	1412,684	5419,2827	2837,64
	5	2704,613037	1462,525513	2397,24585	1279,9486	648,26617	1147,478	4555,6431	2458,794
150	1	28,61591148	1581,623535	22,6966324	29,211647	53,681904	37,29623	162,28308	161,9363
	2	512,1826782	1263,976074	65,9185181	49,508598	73,660187	37,10876	131,97578	112,4235
	3	438,2277527	1448,997192	101,505852	96,18306	150,92621	104,5654	285,92429	312,6038
	4	729,703125	1950,967407	102,206352	72,348	110,45367	70,84786	183,6783	189,9991
	5	459,754303	1340,693726	101,936646	70,672035	126,83282	83,5751	210,90021	223,5599

Πίνακας 1. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: θερμότητα. Μέθοδος ανάλυσης: HPLC-DAD.

Ακτινοβολία (nm)	Ωρα (h)	Δείγμα	Area							
			Πικροκροκίνη	Σαφρανάλη	trans-4-GG	trans-3-Gg	trans-2-gg	cis-4-GG	trans-2-G	cis
Control		1	13288,96	167,8776	13266,87	10674,11	1125,749	6313,648	3496,869	2433,429
		2	4761,687012	46,11000443	9666,52051	7383,49365	778,56903	1834,7294	1949,086	830,531311
		3	10205,96973	166,640976	12577,8447	11443,5801	2940,4705	4246,231	5188,092	2773,59814
		4	13417,87012	47,00541306	11962,6076	10223,4243	2001,9409	4280,2534	4123,144	2413,17484
		5	8542,168945	120,9457092	12339,165	11392,5234	3163,0242	4726,4531	5858,496	3615,16992
254	24	1	12588,11035	169,7086334	12942,5918	11377,2363	2168,2104	6577,7695	4500,414	3714,82324
		2	10885,66113	125,9856644	12523,9297	11324,5391	2896,606	5619,9761	5548,116	3754,52832
		3	9818,951172	187,0261688	11700,2158	10999,666	3498,3218	4532,5298	4778,963	3358,83008
		4	14361,45605	132,4279327	13025,7607	11862,6592	2831,4329	4409,3027	5610,133	2775,93408
		5	8976,740234	108,5245056	12017,4824	11597,9053	3673,5686	4867,7739	5536,88	3743,3999
365	24	1	11763,16113	251,0949249	15903,6719	13856,5098	2619,1145	6678,9019	5401,292	3627,33862
		2	11007,92578	102,5578842	15246,3887	13662,1641	2884,0017	5073,5317	5851,235	3426,82129
		3	9028,082031	97,68806458	14101,8105	13868,7061	3681,2563	4395,1558	7110,183	3838,3645
		4	13728,8418	124,5383301	15090,5732	13421,0508	2541,397	6359,3818	4744,893	3343,66333
		5	8361,123047	95,22783661	15301,6006	13726,4023	2955,7141	6337,209	4857,118	3624,74731
254	48	1	12931,46484	162,409256	15408,0635	12858,2813	1652,4282	6127,2847	4427,775	2815,7876
		2	11195,22363	128,4004822	14904,1846	12636,1816	1757,7738	6164,0894	4916,347	3023,96582
		3	10622,59961	111,2887726	15335,5781	12765,125	2148,8528	6022,5146	5572,237	3020,38623
		4	14014,4873	133,7648468	15263,7402	13119,2656	2026,9656	5555,6099	4906,745	2775,14624
		5	8585,59668	113,4894791	14248,8516	12758,6953	2528,4231	5674,5117	5073,216	3136,80835
365	48	1	12459,71094	200,3820953	19468,9922	16439,752	2133,4646	6651,0215	5002,278	3216,00952
		2	11418,10059	117,9228363	19862,543	17476,1426	2717,9319	6838,2119	5492,231	3647,21826
		3	10313,24414	98,60089874	15143,5742	14225,7656	2889,1594	6245,7256	5710,982	3733,72998
		4	15197,11035	124,2453079	15520,2129	14607,7393	2860,6038	6647,7305	5560,618	3720,08325
		5	9745,680664	106,0625839	15365,9951	14955,9648	4065,4041	6785,9878	6273,538	4363,45801
254	72	1	12881,95	170,7028198	15365,6055	12940,0557	1419,3099	6440,0537	3801,46	2588,7749
		2	10784,53027	128,4519348	15426,1396	13027,3486	1501,2767	6426,8267	4876,216	2945,20142
		3	9496,147461	119,0888519	15796,3945	13465,1982	2474,8704	6185,1567	5465,237	2866,43433
		4	13684,65918	130,3249359	15945,2598	13616,1826	1942,6221	5059,9336	5039,821	2461,68091
		5	9070,530273	112,9356995	15748,6611	13229,5576	2072,1528	6008,5576	5400,682	2793,7561
365	72	1	11287,01855	257,5667419	16924,5488	14619,4385	2016,9296	5890,7695	4964,944	2503,1897
		2	11526,89063	126,2958221	17706,1133	15864,1758	2485,7346	6861,3638	5509,901	3312,00317
		3	9315,853516	110,7127533	18112,2266	15864,8086	2618,1309	5805,5073	5153,579	2902,95215
		4	14493,17871	125,1210251	19241,9785	17106,9063	2719,1731	5509,8677	5417,895	2723,89209
		5	10074,47754	106,7922134	19235,8301	17068,2676	3181,1799	5970,7998	5744,625	3320,53662

Πίνακας 2. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: ακτινοβόληση UV. Μέθοδος ανάλυσης: HPLC-DAD.

Θερμοκρασία (°C)	Δείμα 1	% Match value			
		Δείμα 2	Δείμα 3	Δείμα 4	Δείμα 5
50	99,87	99,59	98,92	99,48	99,49
70	99,56	99,53	98,93	99,34	99,41
90	99,46	99,32	98,6	99,25	99,28
110	99,18	99,13	98,45	99,16	98,99
120	98,37	98,03	97,32	98,35	98,23
130	96,16	95,26	94,86	96,04	89,69
140	90,95	90,26	87,95	89,49	89,69
150	71,99	72,04	68,06	70,51	73,27

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: θερμότητα. Μέθοδος ανάλυσης: FT-IR.

		% Match value									
		Δείγμα 1		Δείγμα 2		Δείγμα 3		Δείγμα 4		Δείγμα 5	
Ακτινοβολία		254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm
24h		99,73	99,63	99,38	99,32	99,67	99,09	99,76	99,59	99,59	99,37
48h		99,8	98,9	99,42	98,36	99,34	98,71	99,35	99,03	99,49	98,75
72h		99,75	99,21	99,21	97,88	98,89	98,71	98,89	98,85	99,09	98,56

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: ακτινοβολήση UV. Μέθοδος ανάλυσης: FT-IR.

		% Match value				
Θερμοκρασία (°C)		Δείμα 1	Δείμα 2	Δείμα 3	Δείμα 4	Δείμα 5
50		99,79	99,78	99,44	99,52	99,73
70		99,18	98,99	99,17	99,26	99,23
90		99,17	98,93	99,05	99,17	99,12
110		98,88	98,28	98,88	98,95	99,02
120		98,27	97,56	98,09	97,62	98,1
130		96,94	95,74	97,23	97,09	96,51
140		93,41	91,9	90,57	92,44	89,89
150		18,35	8,64	19,11	16,79	22,55

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: θερμότητα. Μέθοδος ανάλυσης: Raman.

		% Match value									
		Δείγμα 1		Δείγμα 2		Δείγμα 3		Δείγμα 4		Δείγμα 5	
Ακτινοβολία		254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm	254nm	365nm
24h		99,28	98,89	99,1	98,81	99,19	99	99,07	98,63	99,15	98,92
48h		99,06	98,47	98,91	98,53	99,17	98,92	98,97	98,53	99,08	98,8
72h		98,91	98,05	98,64	97,92	99,08	98,4	98,91	98,03	99,07	98,02

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων. Τεχνική επιταχυνόμενης γήρανσης: ακτινοβολήση UV. Μέθοδος ανάλυσης: Raman.