



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επίδρασης συστατικών αιθέριων ελαίων στον σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλιωσης (Advanced Glycation End-Products, dAGEs)

Ιωάννα Λορένα Α. Κότε

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Χρυσουγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2021**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επίδρασης συστατικών αιθέριων ελαίων στον σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products, dAGEs)

Study of the effect of essential oil components on the formation of advanced glycation products (Advanced Glycation End-Products, dAGEs)

Ιωάννα Λορένα Α. Κότε

Εξεταστική επιτροπή:

Χρυσαιγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μαρία Καψοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της επίδρασης συστατικών αιθέριων ελαίων στον σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products, dAGEs)

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής είναι η μελέτη της επίδρασης συστατικών αιθερίων ελαίων στο σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζιλίωσης (Advanced Glycation End-Products, dAGEs). Επιλέχθηκαν να μελετηθούν δύο μονοτερπενικές ενώσεις, η λιναλοόλη και η θυμόλη καθώς και το αιθέριο έλαιο του σπόρου του γλυκάνισου αποτελούμενο κυρίως από ανηθόλη σε ποσοστό 80-90% και μικρά ποσοστά εστραγόλης (ισομερές της ανηθόλης). Παρασκευάστηκαν δύο συστήματα γλυκόζης -λυσίνης, ένα ισομοριακό μίγμα (1:1) και ένα με 10πλάσια συγκέντρωση γλυκόζης (10:1), στα οποία προστέθηκαν οι λιναλοόλη, θυμόλη και το αιθέριο έλαιο γλυκάνισου σε συγκεντρώσεις 2, 4, 6 και 8μM. Τα μίγματα της αντίδρασης θερμάνθηκαν στους 80° και τους 100° C για χρονικό διάστημα 3 ωρών, με παρακολούθηση ανά μία ώρα της πορεία της αντίδρασης και του τρόπου δράσης των τερπενικών ενώσεων. Από τις υπό μελέτη τερπενικές ενώσεις η θυμόλη και το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ανάσχεση των MR και στη δημιουργία των AGEs συγκριτικά με τη λιναλοόλη. Η δράση αυτή διαπιστώθηκε κατά την εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR όταν προστέθηκαν στο ισομοριακό μίγμα γλυκόζης/λυσίνης στους 80° C.

Επιστημονική περιοχή: Προχωρημένη γλυκοζυλίωση

Λέξεις κλειδιά: αιθέρια έλαια, γλυκοζυλίωση, ανάσχεση

Study of the effect of essential oil components on the formation of advanced glycation products (Advanced Glycation End-Products, dAGEs)

MSc Food, Nutrition and Health

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Chemistry and Food Analysis

ABSTRACT

The subject of this dissertation is the study of the effect of essential oil components on the formation of Advanced Glycation End-Products (dAGEs). Two monoterpene compounds were selected to be studied, linalool and thymol as well as the essential oil of the anise seed consisting mainly of 80-90% anethole and small percentages of estragol (isomer of anethole). Two glucose-lysine systems were prepared, an equimolar mixture (1:1) and one with 10-fold glucose concentration (10:1), to which linalool, thymol and anise seed essential oil were added at concentrations of 2, 4, 6 and 8 μM . The reaction mixtures were heated to 80 ° C and 100 ° C for 3 hours. At predetermined heating times (1,2, and 3hrs), samples were taken and immediately cooled in ice water prior to analysis. Among the terpene compounds, thymol and anise seed essential oil appear to have greater effect on MR inhibition and AGEs formation than linalool. This effect was observed during the initial stage of MR when they added to the equimolar glucose / lysine mixture at 80° C.

Scientific area: Advanced glycosylation

Keywords: essential oils, glycosylation, inhibition

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 0 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 | 4 |
| Μη ενζυματική αμαύρωση | 4 |
| 1.1 Το αρχικό στάδιο των αντιδράσεων Maillard..... | 4 |
| 1.2 Ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της MR..... | 6 |
| 1.3 Η αντίδραση Strecker | 8 |
| 1.4 Τα αντιδρώντα της MR..... | 9 |
| 1.5 Συνθήκες της αντίδρασης | 11 |
| 1.6 Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (AGEs) - Καρβοξυμέθυλο λυσίνη (CML) | 12 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 | 17 |
| Αναστολή των AGEs | 17 |
| 2.1 Συνθετικοί αναστολείς των AGEs..... | 18 |
| 2.2 Φαινολικές ενώσεις στην αναστολή των AGEs | 19 |
| 2.4 Συστατικά αιθερίων ελαίων στην αναστολή των AGEs..... | 24 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 | 26 |
| 3.1 Αναλυτικές μέθοδοι ανίχνευσης των AGEs | 26 |
| 3.1.1 Φθορισμομετρία..... | 26 |
| 3.1.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό | 27 |
| 3.1.1.2 Φθορισμόμετρα | 28 |
| 3.1.1.3 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με φθορισμομετρία | 29 |
| 3.1.2 Φασματοφωτομετρία με υπεριώδη-ορατή ακτινοβολία (UV-Vis)..... | 30 |
| 3.1.2.1 Απορρόφηση – Νόμος Lambert-Beer | 30 |
| 3.1.2.2 Αποκλίσεις του Νόμου Lambert-Beer..... | 32 |
| 3.1.2.3 Φασματοφωτόμετρα | 33 |
| 3.1.2.4 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με Φασματοφωτομετρία UV-Vis..... | 34 |
| 3.1.3 Χρωματογραφία | 35 |
| 3.1.4 Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης των AGEs | 35 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 | 37 |
| Πειραματικό μέρος | 37 |
| 4.1 Υλικά και Μέθοδοι..... | 37 |
| 4.1.1 Υλικά..... | 37 |
| 4.1.2 Παρασκευή διαλυμάτων | 38 |
| 4.1.3 Προετοιμασία των μιγμάτων αντίδρασης..... | 39 |
| 4.2 Μέθοδοι παρακολούθησης της αντίδρασης..... | 40 |
| 4.2.1 Μέτρηση χρώματος των προϊόντων της αντίδρασης Maillard (MRPs)..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2 Μέτρηση φθορισμού των AGEs..... | 41 |
| 4.2.3 Μέτρηση απορρόφησης | 42 |
| 4.3 Στατιστική ανάλυση | 42 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 | 44 |
| Αποτελέσματα | 44 |
| 5.1 Επίδραση τερπενικών ενώσεων στη μεταβολή του χρώματος..... | 44 |
| 5.1.1 Θερμική επεξεργασία στους 80 °C | 44 |
| 5.1.2 Θερμική επεξεργασία στους 100 °C | 46 |
| 5.2 Επίδραση τερπενικών ενώσεων στο σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων | 48 |
| 5.2.1 Θέρμανση στους 80 °C..... | 48 |
| 5.2.2 Θέρμανση στους 100 °C..... | 50 |
| 5.3 Αξιολόγηση της εξέλιξης της αντίδρασης Maillard με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) | 52 |
| 5.3.1 Επίδραση στην εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR (μέτρηση απορρόφησης στα 280 nm)..... | 52 |
| 5.3.2 Επίδραση στην εξέλιξη του ενδιάμεσου σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 360 nm) | 57 |
| 5.3.3 Επίδραση στην εξέλιξη του τελικού σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm)..... | 61 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 | 65 |
| 6.1 Συζήτηση | 65 |
| 6.2 Συμπεράσματα..... | 67 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 69 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 74 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μη ενζυματική αμαύρωση

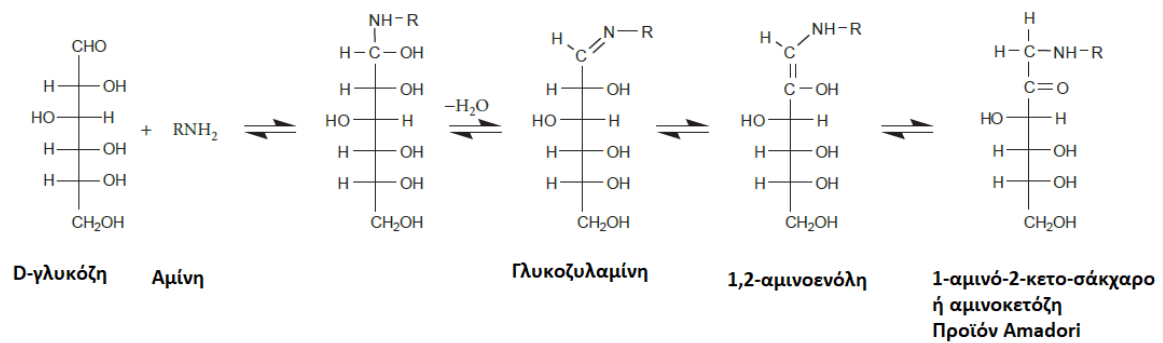
1.1 Το αρχικό στάδιο των αντιδράσεων Maillard

Οι αντιδράσεις Maillard (MR) (ή αμαύρωση Maillard) αποτελούν μια σειρά μη ενζυματικών, διαδοχικών και παράλληλων χημικών αντιδράσεων με σημαντική επίδραση τόσο στην ποιότητα όσο και την ασφάλεια των τροφίμων (Troise 2018). Ο Louis-Camille Maillard το 1912 ανέφερε για πρώτη φορά ότι τα αναγωγικά σάκχαρα αντιδρούν με αμινοξέα σε διάλυμα προς παραγωγή προϊόντων σκούρου χρώματος (μελανοϊδίνες).

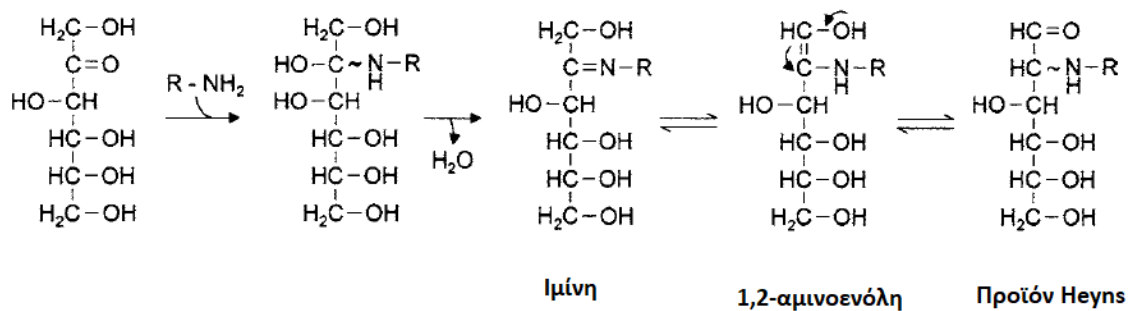
Η εξέλιξη των αντιδράσεων MR τυπικά διακρίνεται σε τρία στάδια: το αρχικό, το ενδιάμεσο και το τελικό και μπορεί να λάβει χώρα τόσο σε τρόφιμα όσο και *in vitro* (Hodge, 1953). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την καρβονυλοαμινο συμπύκνωση και την μετάθεση Amadori. Το ενδιάμεσο στάδιο χαρακτηρίζεται από αντιδράσεις αφυδάτωσης και κατακερματισμού των σακχάρων καθώς και αντιδράσεις αποικοδόμησης των αμινοξέων που ευνοούνται από υψηλές θερμοκρασίες. Στο τελικό στάδιο, στο στάδιο της αμαύρωσης, τα ενδιάμεσα προϊόντα πολυμερίζονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό φθοριζουσών και έγχρωμων ενώσεων γνωστών ως μελανοϊδίνες. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το τελικό στάδιο της αλληλουχίας των MR είναι η αλδολική συμπύκνωση, οι αντιδράσεις πολυμερισμού αλδεϋδών-αμινών και ο σχηματισμός ετεροκυκλικών αζωτούχων ενώσεων όπως αναλύεται και στην παράγραφο 1.2 (Nie et al. 2013).

Οι αντιδράσεις αμαύρωσης Maillard εκκινούν με την πυρηνόφιλη προσβολή από μια μη πρωτονιωμένη αμίνη στην καρβονυλομάδα του σακχάρου προς σχηματισμό γλυκοζυλαμίνης (Σχήμα 1.1). Το αναγωγικό σάκχαρο πρέπει να βρίσκεται σε μορφή ανοιχτής αλυσίδας ώστε να διαθέτει ελεύθερη αλδεϋδομάδα ή την ταυτομερή της κετόνη ώστε να αντιδράσει. Ο σχηματισμός της γλυκοζυλαμίνης (βάσης SCHIFF) είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση και μπορεί να δώσει ξανά τα αρχικά αντιδρώντα. Η γλυκοζυλαμίνη μπορεί επίσης γρήγορα να υποστεί ενδομοριακή αναδιάταξη προς σχηματισμό αμινοενόλης που μπορεί με τη σειρά της να αναδιαταχθεί περαιτέρω προς παραγωγή αμινοκετόζης, 1-αμινο-2-κετο-σάκχαρο, που αναφέρεται κοινώς ως ένωση Amadori. Εάν το αρχικό σάκχαρο είναι η φρουκτόζη τότε θα παραχθεί μια αμινοαλδόζη, που ονομάζεται

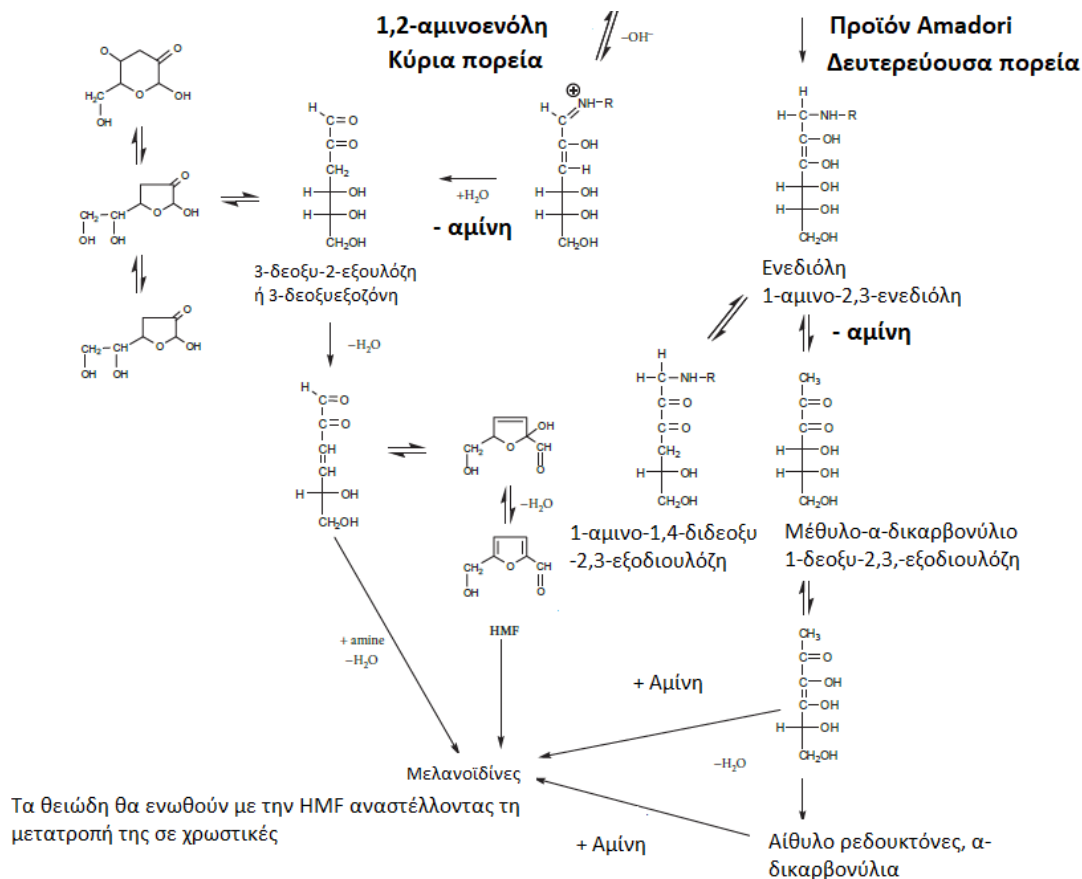
ένωση Heyns (2-αμινο-2-δεοξαλαδόζη) (Σχήμα 1.2) . Παρά το γεγονός ότι μέχρι αυτό το στάδιο η αντίδραση είναι αναστρέψιμη, εκκινεί μια σειρά πρόσθετων αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό ενός μεγάλου φάσματος οσμηρών, γευστικών και έγχρωμων παραγώγων (Brady, 2013) (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015).



Σχήμα 1.1. Σχηματισμός προϊόντων Amadori



Σχήμα 1.2. Σχηματισμός προϊόντων Heyns.



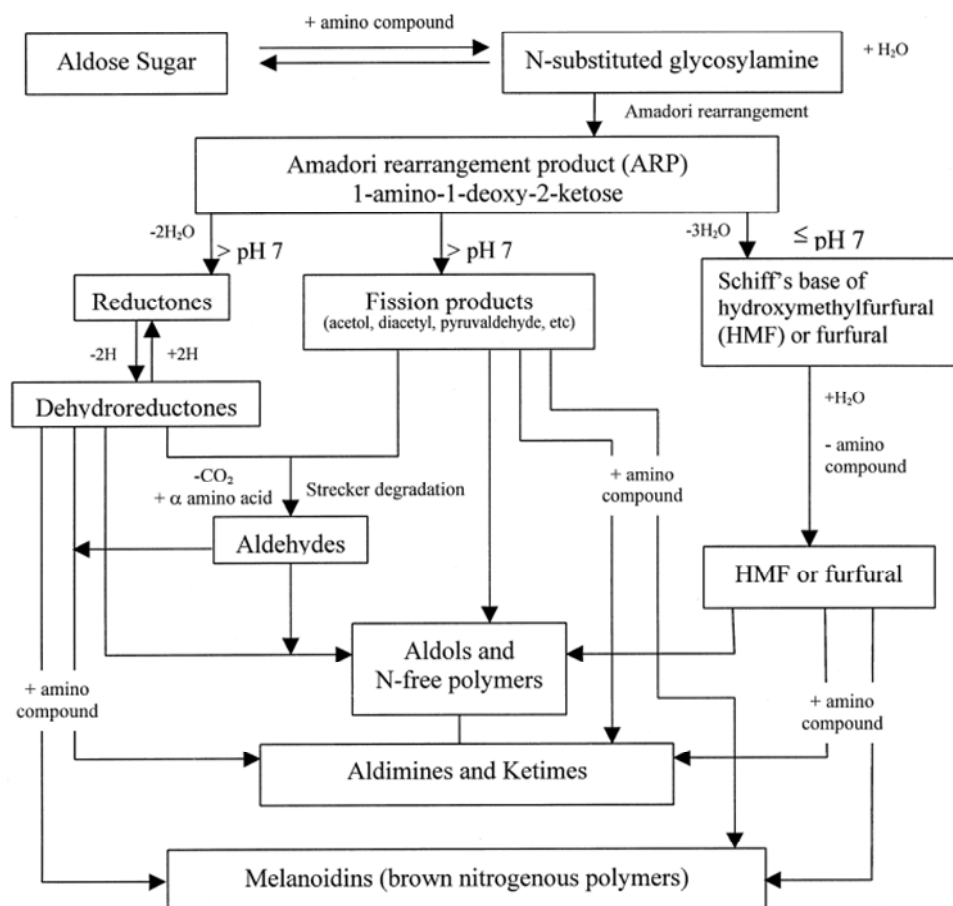
Σχήμα 1.3. Ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard

1.2 Ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της MR

Η πορεία των αντιδράσεων μετά τον σχηματισμό των προϊόντων Amadori εξαρτάται από το pH. Χαμηλά pH ευνοούν τον σχηματισμό 3-δεοξυ-1,2 δικαρβονυλικών ενώσεων (δεοξυζόνες) μέσω 1,2 ενολοποίησης (Σχήμα 1.3). Στην πορεία αυτή θα σχηματιστούν φουρφουράλη όταν το αρχικό σάκχαρο είναι μία πεντόζη ή υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη (HMF) όταν το αρχικό σάκχαρο είναι μία εξόζη (Σχήμα 1.4). Σε υψηλά pH >7 η διάσπαση των προϊόντων Amadori μέσω 2,3 ενολοποίησης οδηγεί στο σχηματισμό ρεδουκτονών όπως η 4-υδρόξυ-5-μέθυλο-2,3 διυδροφουραν-3-όνη (HMFone) και άλλων προϊόντων διάσπασης συμπεριλαμβανομένων της ακετόλης, της πυροσταφυλικής αλδεΐδης και του διακετυλίου.

Γενικότερα τα επόμενα στάδια μετά τον σχηματισμό των προϊόντων Amadori χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό 1-, 3- και 4-δικαρβονυλικών ενώσεων μέσω

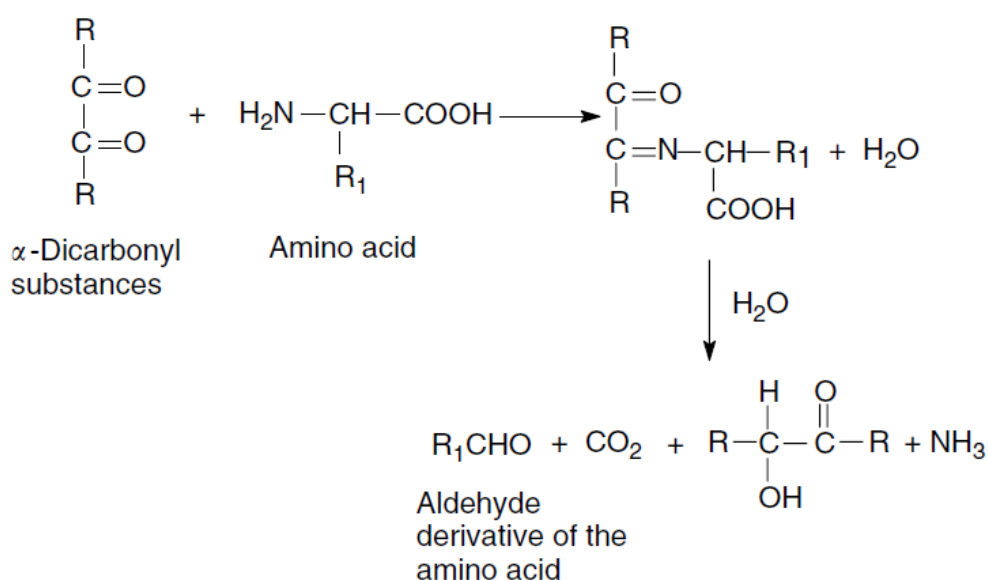
ενολοποίησης, αφυδάτωσης, ρετροαλδολικής διάσπασης, υποκατάστασης της αμινομάδας με υδροξυλομάδα. Τα προϊόντα αυτά συνολικά αποτελούν τα δευτερογενή προϊόντα της MR, είναι εξαιρετικά δραστικά και προωθούν επιπλέον αντιδράσεις καρβονυλίου-αμινομάδας. Μία από τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σ' αυτό το στάδιο είναι η αποικοδόμηση Strecker η οποία αναλύεται στη συνέχεια (Κεφ. 1.3). Στα επόμενα στάδια της αντίδρασης λαμβάνουν χώρα μια σειρά αντιδράσεων συμπεριλαμβανομένης της κυκλοποίησης, αφυδάτωσης, ρετροαλδολικής συμπύκνωσης, μετάθεσης, ισομερισμού και περαιτέρω συμπύκνωσης οδηγώντας στο σχηματισμό αζωτούχων πολυμερών και διασταυρούμενων πολυμερών (co-polymers) γνωστά ως μελανοΐδινες (Troise, 2019) (Martins et al.2000). Οι μελανοΐδινες είναι μόρια τα οποία δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως αφού πρόκειται για σύνθετες ενώσεις με μεγάλη ποικιλομορφία (Brady, 2013).



Σχήμα 1.4. Η αντίδραση Maillard (σχήμα προσαρμοσμένο από Hodge) (Martins et al., 2000).

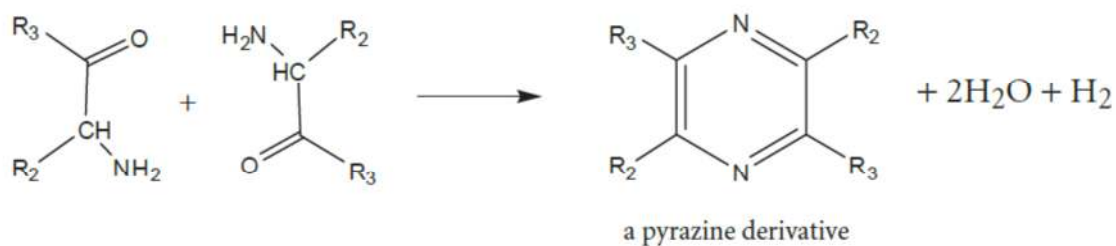
1.3 Η αντίδραση Strecker

Η αποικοδόμηση κατά Strecker είναι μια αντίδραση μεταξύ α -δικαρβονυλικών ενώσεων και α -αμινοξέων κατά την οποία το αμινοξύ υπόκειται σε απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση. Κατά την αντίδραση αρχικά σχηματίζεται μια βάση Schiff και ακολουθεί αποκαρβοξυλίωση (με απελευθέρωση CO_2), αφυδάτωση και απόσπαση και τελικά το αμινοξύ μετατρέπεται σε αλδεΐδη, η οποία έχει έναν άνθρακα λιγότερο από το αρχικό (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5. Η αντίδραση Strecker (Strecker degradation).

Στην πορεία της αντίδρασης Strecker, οι αμινο-κετόνες που παράγονται μπορούν να αλληλεπιδράσουν προς σχηματισμό παραγώγων πυραζίνης (Brady, 2013). Η αντίδραση αυτή συμβαίνει σε τρόφιμα με ελεύθερα αμινοξέα όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 100°C).

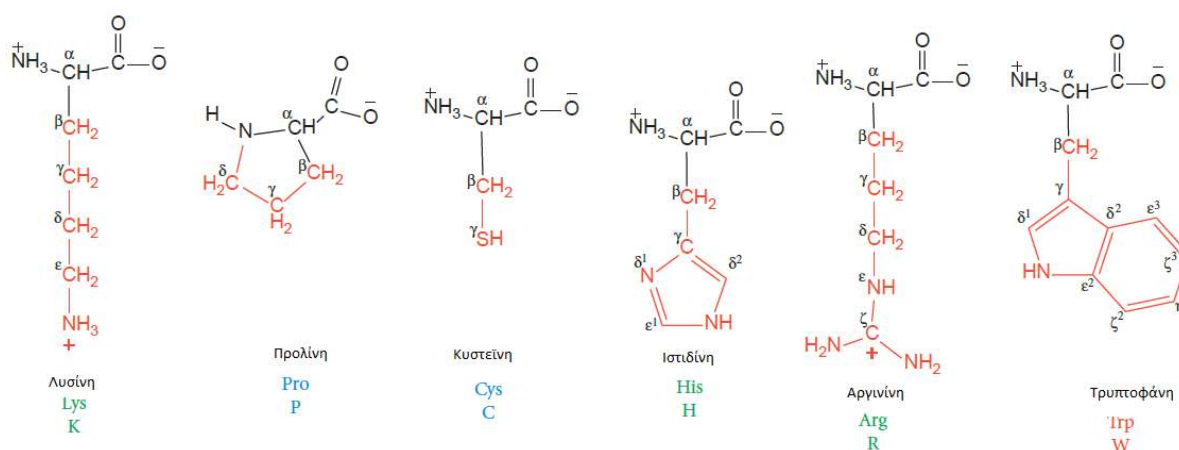


Σχήμα 1.6. Σχηματισμός πυραζινών στην πορεία της αντίδρασης Strecker

Οι αλδεΐδες που σχηματίζονται από την αντίδραση Strecker αλλά και οι πυραζίνες σε συνδυασμό με τα ενδιάμεσα προϊόντα αποικοδόμησης των σακχάρων δίνουν το άρωμα στα τρόφιμα.

1.4 Τα αντιδρώντα της MR

Οι αντιδράσεις Maillard είναι κοινές στα τρόφιμα, επειδή πολλά από τα αμινοξέα που συνιστούν τις πρωτεΐνες, κυρίως η λυσίνη και η προλίνη περιέχουν ελεύθερες αμινομάδες. Οι αντιδράσεις MR λαμβάνουν χώρα ευκολότερα με πρωτοταγείς αμίνες, όπως η αμινομάδα της λυσίνης από ότι με τις δευτεροταγείς αμίνες όπως η προλίνη.



Σχήμα 1.6. Αμινοξέα στην αντίδραση Maillard

Ωστόσο από μελέτες της αντίδρασης διάφορων καταλοίπων αμινοξέων με αναγωγικά σάκχαρα διαπίστωσαν υψηλή δραστικότητα των πλευρικών αλυσίδων επιπλέον των προηγούμενων αμινοξέων και της κυστεΐνης, ιστιδίνης καθώς και των αμινομάδων των *N*-τερματικών αμινοξέων πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015). Η τρυποφάνη σε πρωτεϊνικές ή πολυπεπτιδικές αλυσίδες δεν είναι ιδιαίτερα δραστική ενώ η ελεύθερη τρυποφάνη έχει καλή δραστικότητα (Brady, 2013). Το κατάλοιπο αργινίνης πολυπεπτιδίων ή πρωτεϊνών όπως και της λυσίνης μπορεί να υποστεί σημαντική τροποποίηση μέσω των MR. Ωστόσο επειδή η αργινίνη δεν είναι απαραίτητο αμινοξύ, η απώλειά της δεν είναι διατροφικά τόσο σημαντική όσο η απώλεια της λυσίνης. Η κυστεΐνη επίσης δεν μπορεί να συμμετέχει άμεσα στις MR, εντούτοις απελευθερώνει υδρόθειο κατά τη θερμική κατεργασία το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ενδιάμεσα προϊόντα της MR.

Εκ των σακχάρων, στις MR εμπλέκονται κυρίως η φρουκτόζη, η γλυκόζη και οι δισακχαρίτες λακτόζη και μαλτόζη και λιγότερο πεντόζες και γλυκοζιδικά συνδεδεμένα μόρια, όπως πολυφαινόλες, γλυκοσίδες, γλυκοπρωτεΐνες και σακχαρόζη που απαιτούν διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού (Troise, 2019). Η σχέση μεταξύ της δομής του σακχάρου και της επιδεκτικότητας στις MR έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο *in vivo* όσο και στα τρόφιμα (Vistoli et al., 2013). Παρόλο που η κυκλική μορφή των σακχάρων ευνοείται θερμοδυναμικά, η χημική δραστικότητα των μονοσακχαριτών σχετίζεται άμεσα με την αφθονία της ανοικτής αλυσίδας τους, η οποία κυμαίνεται από 0.0002% για τη γλυκόζη έως 0.7% για τη φρουκτόζη. Αυτό εξηγεί εύκολα γιατί η γλυκόζη, λόγω της σταθερότητας της μορφής πυρανόζης, είναι το λιγότερο δραστικό σάκχαρο, ενώ η φρουκτόζη της οποίας η κυκλική μορφή φουρανόζης είναι «κατά κάποιον τρόπο» λιγότερο σταθερή είναι περίπου 7,5 φορές πιο δραστική από τη γλυκόζη (Vistoli et al., 2013). Εκτός από την αφθονία της μορφής ανοικτής αλυσίδας, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την συμμετοχή στην αντίδραση Maillard περιλαμβάνουν το μήκος του σακχάρου και τη δραστικότητα των λειτουργικών ομάδων. Έτσι, οι αλδόζες είναι πιο δραστικές από τις κετόζες, επειδή η αλδεΐδομάδα είναι περισσότερο ηλεκτρονιόφιλη από την κετονομάδα (Vistoli et al., 2013).

1.5 Συνθήκες της αντίδρασης

Η θερμοκρασία επηρεάζει τόσο το ρυθμό όσο και τον μηχανισμό της αντίδρασης Maillard. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή ενέργεια ενεργοποίησης 10 και 160 kJ/mol. Ο ρυθμός της αντίδρασης Maillard είναι επίσης συνάρτηση της ενεργότητας νερού (a_w) του τροφίμου φθάνοντας στο μέγιστο σε τιμές a_w στην περιοχή 0,6-0,7. Η περιεκτικότητα σε νερό έχει μεγάλη επίδραση στην ενέργεια ενεργοποίησης. Ο ρυθμός αμαύρωσης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος a_w 0,3-0,7. Σε χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, η αντίδραση είναι αργή, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του νερού, αλλά σε πολύ υψηλότερα a_w , η συγκέντρωση των αντιδρώντων είναι χαμηλή έτσι ώστε ο ρυθμός αντίδρασης να αρχίσει να μειώνεται ξανά. Έτσι, για ορισμένα τρόφιμα, η αντίδραση μπορεί να ελεγχθεί με έλεγχο της ενεργότητας του νερού καθώς και με τον έλεγχο των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων, του χρόνου, της θερμοκρασίας και του pH.

Επίσης το διοξείδιο του θείου, τα διθειώδη ιόντα ή ενώσεις που περιέχουν θείο αντιδρούν με την αλδεϋδομάδα και την κετονομάδα σχηματίζοντας ενώσεις προσθήκης, αναστέλλοντας την αμαύρωση αφού αφαιρούν τουλάχιστον ένα από τα αντιδρώντα (αναγωγικά σάκχαρα, HMF, φουρφουράλη, κ.λπ.).

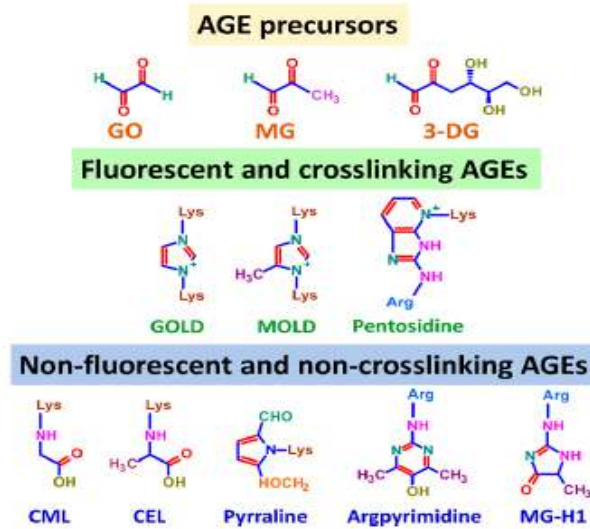
Οι παράγοντες της αντίδρασης που μπορούν να ελεγχθούν ώστε να αυξήσουν ή να μειώσουν το ρυθμό των MR είναι οι ακόλουθες:

- (1) η θερμοκρασία (με τη μείωση της θερμοκρασίας μειώνεται ο ρυθμός αντίδρασης) και ο χρόνος παραμονής στη θερμοκρασία.
- (2) το pH (μειώνοντας το pH μειώνεται ο ρυθμός αντίδρασης). Ο ρυθμός της αντίδρασης Maillard αυξάνεται με αύξηση της τιμής του pH με μέγιστο σε ελαφρώς αλκαλικό μέσο.
- (3) η περιεκτικότητα σε νερό (ο μέγιστος ρυθμός αντίδρασης επιτυγχάνεται σε a_w 0,6-0,7 (περίπου 30% υγρασία))
- (4) το είδος του σακχάρου και
- (5) η παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων που υφίστανται οξειδωση ενός ηλεκτρονίου υπό ενεργειακά ευνοϊκές συνθήκες, όπως τα ιόντα Fe (II) και Cu (I)

1.6 Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (AGEs) - Καρβοξυμέθυλο λυσίνη (CML)

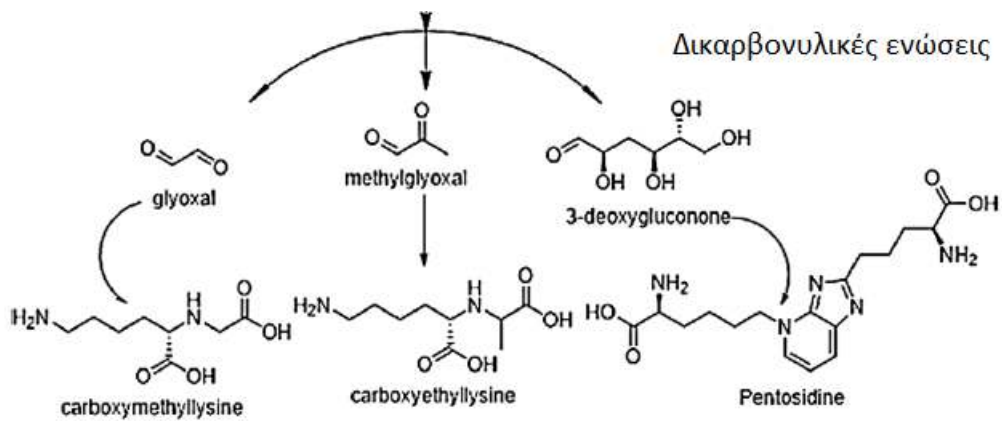
Οι δραστικές αλδεΐδες (αλδεΐδες Strecker και δικαρβονυλικές ενώσεις), οι οποίες σχηματίζονται κατά το ενδιάμεσο στάδιο της MR αλλά παράγονται και κατά την οξείδωση των λιπιδίων (γλυοξάλη, μεθυλογλυοξάλη και 3-δεοξυγλυκοζόνη) μπορούν να αντιδράσουν με αμινομάδες βιομορίων (πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων) κυρίως με την ε-NH₂ της λυσίνης ή τη γουανιδινομάδα της αργινίνης και να οδηγήσουν στην παραγωγή προϊόντων γνωστά ως Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (Advanced Glycation end products, AGEs) στα τελευταία στάδια των αντιδράσεων (Han et al. 2013) (Nguyen et al., 2014). Η κατηγορία των AGEs είναι πολύ ετερογενής και περιλαμβάνει πιθανότατα πολλά περισσότερα προϊόντα από αυτά που έχουν προσδιοριστεί έως σήμερα. Στην κατηγορία των AGEs ανήκουν η Νε-καρβοξυμεθυλο-λυσίνη (CML), η Νε-καρβοξυαίθυλο-λυσίνη (CEL), η πεντοσιδίνη, η πυρραλίνη, η ιμιδαζολόνη κ.ά.

Τα AGEs σχηματίζονται όχι μόνο μέσω των αντιδράσεων των δικαρβονυλικών ενώσεων και των αλδεϊδών Strecker αλλά και, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τη CML, από τη διάσπαση των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR. Τα AGEs μπορούν να ομαδοποιηθούν σε φθορίζοντα και μη φθορίζοντα AGEs, καθώς και AGEs διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking) και μη (non-cross-linking). Ορισμένα AGEs εμφανίζουν ιδιότητες φθορισμού και διασταυρούμενης σύνδεσης, ενώ άλλα δεν παρουσιάζουν κανένα από τα αναφερόμενα χαρακτηριστικά (Nowotny et al., 2018) (Σχήμα 1.7). Τα AGEs διασταυρούμενης σύνδεσης αναφέρονται σε γλυκιωμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια ενώ γίνεται αναφορά και στα ελεύθερα AGEs τα οποία είναι ενώσεις γλυκιωμένων αμινοξέων με μικρά μόρια.

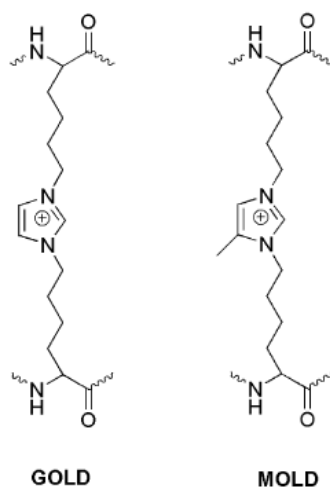


Σχήμα 1.7. Πρόδρομες ενώσεις των AGEs (AGE precursors) και γνωστά AGEs με διαφορετικά χαρακτηριστικά: α) φθορίζοντα και διασταυρούμενης σύνδεσης (fluorescent and crosslinking AGEs) και β) μη φθορίζοντα και μη διασταυρούμενης σύνδεσης (non-fluorescent and non-crosslinking AGEs) (Lin et al., 2018)

Η πεντοσιδίνη (Σχήμα 1.8) είναι προϊόν διασταυρούμενης σύνδεσης που παράγεται κατά την αντίδραση μιας πεντόζης με κατάλοιπα λυσίνης (Lys) και αργινίνης (Arg) των πρωτεϊνών (Wei et al., 2018) (Kutlu, 2016). Εξαιτίας της ετεροκυκλικής δομής της η πεντοσιδίνη φθορίζει. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί κάποιες ακόμα ενώσεις σταυροσυνδέτες (cross-linkers) όπως η γλυοξάλη (GO), η μεθυλογλυοξάλη (MG) και η 3-δεοξυγλυκοζόνη (3-DG), οι οποίες σχηματίζονται από την αντίδραση 2 καταλοίπων Lys και ονομάζονται glyoxal-derived lysine dimer (GOLD), methylglyoxal-derived lysine dimer (MOLD) και 3-deoxyglucosone-derived lysine dimer (DOLD) (Σχήμα 1.8). Ενώ η διασταυρούμενη διασύνδεση ενός καταλοίπου Arg με ένα κατάλοιπο Lys ονομάζεται GODIC (ιμιδαζολική διασύνδεση γλυοξάλης και λυσίνης-αργινίνης), MODIC (ιμιδαζολική διασύνδεση μεθυλογλυοξάλης και λυσίνης-αργινίνης), και DODIC (ιμιδαζολική διασύνδεση 3-δεοξυγλυκοζόνης και λυσίνης-αργινίνης). Οι άλλοι εκπρόσωποι της κατηγορίας η Νε-καρβοξυμεθυλο-λυσίνη (CML), η Νε-καρβοξυαιθυλο-λυσίνη (CEL) και η πυρραλίνη, περιέχουν ένα κατάλοιπο λυσίνης και δεν είναι φθορίζοντα.



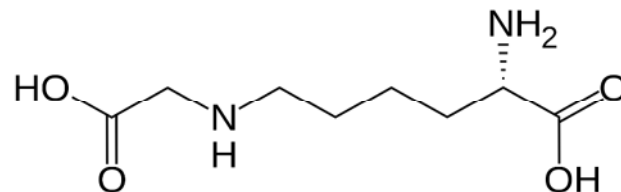
Σχήμα 1.8. Σχηματισμός CML, CEL και πεντοσιδίνης (*Khan et al., 2020*).



Σχήμα 1.9. Η δομή των GOLD και MOLD (*Hidalgo and Zamora, 2005*).

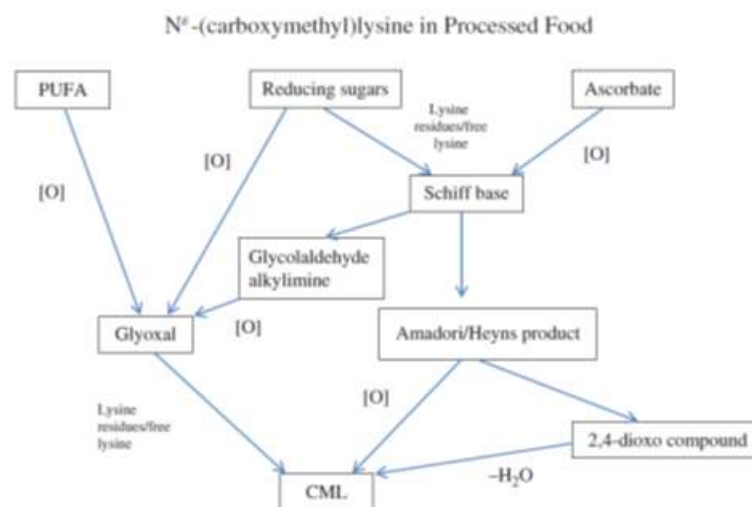
Τα AGEs έχουν ταυτοποιηθεί σε ιστούς, πλάσμα, ούρα και δάκρυα διαβητικών ασθενών, ενώ η συγκέντρωσή τους στο ανθρώπινο σώμα αυξάνεται με την ηλικία (*Uribarri et al. 2010*). Εκτός από τα AGEs που σχηματίζονται εντός του σώματος, αυτή η κατηγορία ενώσεων έχει βρεθεί και στα τρόφιμα. Αναφορές υπάρχουν σχετικά με την παρουσία τους σε μη επεξεργασμένα (άψητα) ζωικά προϊόντα ενώ τα AGEs σχηματίζονται και κατά το μαγείρεμα των τροφίμων. Συγκεκριμένα, το ψήσιμο στη σχάρα, το μαγείρεμα σε κατσαρόλα ή στο φούρνο και το τηγάνισμα ευνοούν το σχηματισμό νέων AGEs, τα οποία χαρακτηρίζονται ως διατροφικά παραγόμενα Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (dAGEs) (*Wei et al., 2018*).

Ειδικότερα η CML αποτελεί τον περισσότερο ευρέως μελετημένο εκπρόσωπο της κατηγορίας των AGEs και χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον σχηματισμό των AGEs στα τρόφιμα. Η ένωση της οποίας η δομή δίνεται στο Σχήμα 1.10. Έχει μοριακό βάρος 204 g/mol και μοριακό τύπο $C_8H_{16}N_2O_4$. Απαντάται συνήθως στη συνδεδεμένη μορφή σε κατάλοιπα λυσίνης πεπτιδίων και πρωτεϊνών καθώς αυτή η μορφή είναι η πλέον σταθερή.



Σχήμα 1.10. Καρβοξυμέθυλο λυσίνη (*Carboxy methyl lysine-CML*).

Ο μηχανισμός σχηματισμού της στα τρόφιμα αποδίδεται με απλοποιημένο τρόπο στο Σχήμα 1.11 (Nguyen et al. 2014, Han et al.2013) και οφείλεται σε πέντε διαφορετικές οδούς.



Σχήμα 1.11. Τα μονοπάτια σχηματισμού της CML στα τρόφιμα [O] =οξειδωτικοί παράγοντες (Nguyen et al., 2014).

1. Από την οξείδωση των προϊόντων Amadori ή Heyns. Συνήθη προϊόντα Amadori είναι η φρουκτοζολυσίνη, λακτουλοζολυσίνη ή ταγατοζολυσίνη όταν τα αναγωγικά σάκχαρα είναι η γλυκόζη, η λακτόζη και η γαλακτόζη αντίστοιχα. Στην πορεία της

ίδιας οδού η CML μπορεί να σχηματιστεί μέσω αφυδάτωσης των 2,4-διοξο-ενώσεων, που παράγονται από τα προϊόντα Amadori. Σε αντίθεση με τις άλλες οδούς που περιγράφονται στο Σχήμα, στην συγκεκριμένη δεν απαιτείται η παρουσία κάποιου οξειδωτικού παράγοντα σε κανένα στάδιο. Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί η αναγκαία συγκέντρωση οξειδωτικού παράγοντα που απαιτείται για το σχηματισμό της CML.

2. Η γλυοξάλη αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν στο σχηματισμό της CML. Η μία οδός σχηματισμού της είναι η οξείδωση της γλυκόζης (pH =7.4). Η γλυοξάλη είναι μια πολύ δραστική δικαρβονυλική ένωση και αντιδρά γρήγορα με κατάλοιπα λυσίνης επί των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό της CML.
3. Η CML μπορεί επίσης να σχηματιστεί μέσω της πορείας Namiki. Στην πορεία των αντιδράσεων Namiki, που λαμβάνουν χώρα κατά τα αρχικά στάδια της Maillard, το σάκχαρο διαχωρίζεται από τη βάση Schiff και σχηματίζεται η γλυκολαδεύδη αλκυλιμίνη. Η τελευταία οξειδώνεται προς γλυοξάλη και ακολουθείται η πορεία σχηματισμού της CML όπως και στην προηγούμενη περίπτωση. Από πειράματα έχει φανεί ότι ο σχηματισμός της CML ευνοείται περισσότερο από αλδόζες παρά από κετόζες και ότι από τις αλδόζες πλέον δραστική είναι η γαλακτόζη σε σχέση με τη γλυκόζη σε συστήματα λυσίνης-σακχάρου και καζεΐνης-σακχάρου.
4. Η γλυοξάλη όπως αναφέρθηκε και στην αρχή αυτού του κεφαλαίου μπορεί να παραχθεί και από την υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), όπου αντιδρώντας στη συνέχεια με κατάλοιπα λυσίνης επί των πρωτεϊνών καταλήγει στο σχηματισμό της CML.
5. Τέλος η CML μπορεί να σχηματιστεί μέσω της αντίδρασης του ασκορβικού οξέος με τη λυσίνη σε συνθήκες φυσιολογικού pH και θερμοκρασίας παρουσία αέρα. Η αντίδραση εκκινεί με τον κατακερματισμό του δεϋδροασκορβικού οξέος σε L-θρεόζη.

Παρότι η CML αποτελεί ένα από τα περισσότερο μελετημένα AGEs, ενδέχεται να υπάρχουν κενά στη γνώση σχετικά με την διατροφικώς παραγόμενη CML. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η διατροφικώς παραγόμενη CML συμβάλλει στη αύξηση των επιπέδων CML στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Αναστολή των AGEs

Τα AGEs εμπλέκονται στην παθογένεση μικροαγγειακών επιπλοκών, όπως νεφροπάθεια, αρτηριοσκλήρωση και διαβήτης. Οι μεταβολές αυτές στον ανθρώπινο οργανισμό συμβαίνουν προοδευτικά και είναι μη αναστρέψιμες. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να αποφευχθεί, όσο γίνεται, η έναρξη των αλλαγών αυτών (Joglekar et al., 2013). Για την αντιμετώπιση των επιβλαβών επιδράσεων των dAGEs στην υγεία, αλλά και τη γήρανση, έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις, όπως ο περιορισμός τους στη διατροφή, η παρεμπόδιση σχηματισμού τους με χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως πολυφαινόλες από καρπούς, η μεσογειακή διατροφή, καθώς και η χρήση αναστολέων AGEs (Nowotny et al., 2018). Ειδικότερα η εύρεση και χρήση αναστολέων των AGEs αποτελεί μια πιθανή λύση στην ανάσχεση των παθολογικών καταστάσεων που προκύπτουν από την παρουσία τους. Οι ενώσεις αναστολείς των AGEs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους συνθετικούς και τους φυσικούς αναστολείς (Khan et al., 2020).

Και στις δύο κατηγορίες περιλαμβάνονται ενώσεις με αντιοξειδωτική ικανότητα, ικανές να αναστέλλουν τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην παθολογική ανάπτυξη πολλών σημαντικών ασθενειών (καρδιαγγειακές, νευροεκφυλιστικές, διαβήτη, κ.α.). Οι ενώσεις αυτές δρουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μέσω μηχανισμών δέσμευσης ελεύθερων ριζών ή με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής κατάστασης, αντίστοιχα. Μία τέτοια κατηγορία ενώσεων που απαντάται στη φύση είναι οι τερπενικές ενώσεις, που εμφανίζουν μεγάλο εύρος βιολογικών και φαρμακολογικών εφαρμογών, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Αναφέρεται ότι τα τερπένια παρέχουν σχετική προστασία σε συνθήκες οξειδωτικού stress σε διάφορες από τις ασθένειες που προαναφέρθηκαν, καθώς και σε διαδικασίες γήρανσης (Gonzales-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012).

2.1 Συνθετικοί αναστολείς των AGEs

Διάφοροι μηχανισμοί σχετικά με την αναστολή του σχηματισμού των AGEs, έχουν προταθεί. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: η αναγωγή της αλδόζης, η αντιοξειδωτική δράση, η δέσμευση των δραστικών δικαρβονυλικών ενώσεων, η αναστολή της αυτοξειδωσης των σακχάρων, και η δέσμευση της αμινομάδας (Uribarri et al., 2015).

Για την αναστολή του σχηματισμού των AGEs έχουν επίσης μελετηθεί διάφορες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες εμπλέκονται είτε στην ανάσχεση του σχηματισμού των AGEs είτε στην αποικοδόμησή τους όπως είναι η **αμινογουαδινίνη** και η **μετφορμίνη**. Η **ασπιρίνη** εμποδίζει αποτελεσματικά τη γλυκίωση καθώς ανταγωνίζεται για τη δέσμευση αμινοξέων, ενώ άλλες ενώσεις διασπούν τα προϊόντα διασταύρωσης των α-δικαρβονυλικών ενώσεων. Στους αναστολείς της πρωτεϊνικής γλυκίωσης περιλαμβάνονται και γνωστά αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E και χηλικοί παράγοντες μετάλλων όπως η πενικιλλαμίνη (προϊόν υδρόλυσης της πενικιλίνης, ισχυρό συμπλεκτικό μέσο βαρέων μετάλλων).

Η αμινογουαδινίνη η οποία είναι ο πρώτος συνθετικός αναστολέας AGEs που ανακαλύφθηκε το 1986, και βοήθησε κατά του διαβήτη τύπου 2, δρα μέσω της δέσμευσης των δραστικών ενδιάμεσων προϊόντων της αντίδρασης Maillard (MGO, GO και 3-DG) (Khan et al., 2020). Η **πυριδοξίνη** είναι ένας άλλος αναστολέας της οποίας η δράση περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της οξείδωσης των προϊόντων της MR, τη δέσμευση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των δραστικών καρβονυλικών και δικαρβονυλικών ενώσεων καθώς και τη δέσμευση μετάλλων που καταλύουν τις αντιδράσεις οξείδωσης (δρώντας ως χηλικός παράγοντας).

Το ενδιαφέρον πλέον στρέφεται στην αναζήτηση ενώσεων φυσικής προέλευσης που μπορούν να αναστείλουν τη γλυκίωση. Η αποτελεσματικότητα αυτών των ενώσεων μέχρι σήμερα βασίζεται, σε *in vitro* πειράματα επιλογής. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro* δεν είναι αντιπροσωπευτικά για τους εξής λόγους: α) δεν μπορούν να προσομοιάσουν την κατανομή των μεταλλικών ιόντων ή των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στους ιστούς β) η συγκέντρωση σακχάρου και η πίεση του O₂ είναι συνήθως πολύ υψηλότερη στα *in vitro* πειράματα από τις *in vivo* συνθήκες γ) η αυτοξειδωση της γλυκόζης (**Wolff pathway**) ή ο σχηματισμός βάσεων Schiff (**μονοπάτι Namiki**) μπορεί να

κυριαρχούν στα *in vitro* πειράματα όπου συνήθως η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή αλλά όχι *in vivo* όπου τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλότερα και υπάρχει υψηλό επίπεδο οξυγόνου, τέλος, δ) η πολυπλοκότητα των αντιδράσεων Maillard καθιστά δύσκολη την αναγνώριση του μηχανισμού αναστολής της γλυκίωσης. Στη βιβλιογραφία ως ένας αποτελεσματικός μηχανισμός προτείνεται ο εντοπισμός ενώσεων που αναστέλλουν τη γλυκίωση στο μετά-Amadori στάδιο. Η πυριδοξαμίνη, σε αντίθεση με την αμινογουανιδίνη, βρέθηκε να έχει αυτή την δραστηριότητα (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015).

2.2 Φαινολικές ενώσεις στην αναστολή των AGEs

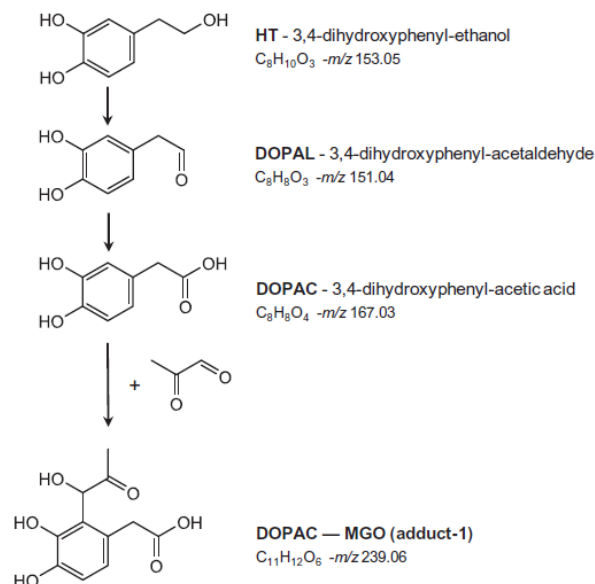
Οι φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, σιλβένια, κουρκουμίνη) έχουν μελετηθεί εκτενώς για την δράση τους στην αναστολή του σχηματισμού των AGEs. Συνήθως παραλαμβάνονται από φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά και από άλλες φυτικές πηγές οι οποίες περιέχουν υψηλές ποσότητες φαινολικών συστατικών σε συνδυασμό και με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η βιταμίνη C, E και τα καροτενοειδή με αποτέλεσμα να διαδραματίζουν υψηλό ανασταλτικό ρόλο. Προστατεύουν τους ιστούς του σώματος από το οξειδωτικό stress καθώς και από άλλες παθολογικές ασθένειες (Uribarri et al., 2015, Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015).

Η δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων στην ανάσχεση των AGEs *in vitro* σχετίζεται με την ικανότητα των φαινολικών συστατικών να δεσμεύουν της ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, πολλές ιατρικές δοκιμές απέτυχαν να αποδείξουν με βεβαιότητα την αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία διαβητικών ασθενών. Η έρευνα σήμερα εστιάζει το ενδιαφέρον της στην εύρεση φυσικών προϊόντων με αντιγλυκαιμική δράση, χαμηλότερου κόστους και με λιγότερες παρενέργειες από αυτές των συνθετικών ενώσεων (Uribarri et al., 2015). Οι φυσικοί αναστολείς μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό των AGEs, τόσο μέσω της διακοπής της γλυκοξείδωσης όσο και μέσω της ικανότητας δέσμησης δραστηκών μορφών οξυγόνου (ROS) (Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos, 2012, Khan et al., 2020).

Η ικανότητα ανάσχεσης των AGEs συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα μιας ένωσης η οποία σχετίζεται με την ικανότητά της να δρα ως δότης

ηλεκτρονίου ή υδρογόνου σε μόρια με ελεύθερες ρίζες. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι πολυφαινόλες και φλαβονοειδή όπως η ρεσβερατρόλη και φυτοϊστρογόνα από σταφύλια, ανάσχεσαν το σχηματισμό των AGEs και ταυτόχρονα μείωσαν το οξειδωτικό στρες σε *in vivo* πειράματα. Επιπλέον παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο σχηματισμό γλυοξάλης (GO) από πολυφαινόλες η οποία αποδόθηκε στην ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τις υπό μελέτη ενώσεις. Οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται τη λυσίνη και την αργινίνη αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό των AGEs (Khan et al., 2020). Ορισμένες πολυφαινόλες δεσμεύουν περισσότερο MGO από ότι η αμινογουανιδίνη (Thornalley, 2003).

Οι Navaro and Morales, 2015 σε *in vitro* πειράματα, διαπίστωσαν ότι η υδροξυτυροσόλη (HT, 3,4-dihydroxyphenylethanol) ανταγωνίζεται τις: λυσίνη, αργίνη και ιστιδίνη στη δέσμευση δικαρβονυλικών ενώσεων με αποτέλεσμα την ανάσχεση σχηματισμού φθοριζουσών πρωτεϊνικών παραγώγων. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό (Σχήμα 2.1) η HT οξειδώνεται σε DOPAC το οποίο αντιδρά με την MGO με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Το προϊόν προσθήκης που σχηματίζεται monoDOPAC-monoMGO, είναι πιθανό να βρίσκεται σε μείγμα δύο ταυτομερών μρφών.

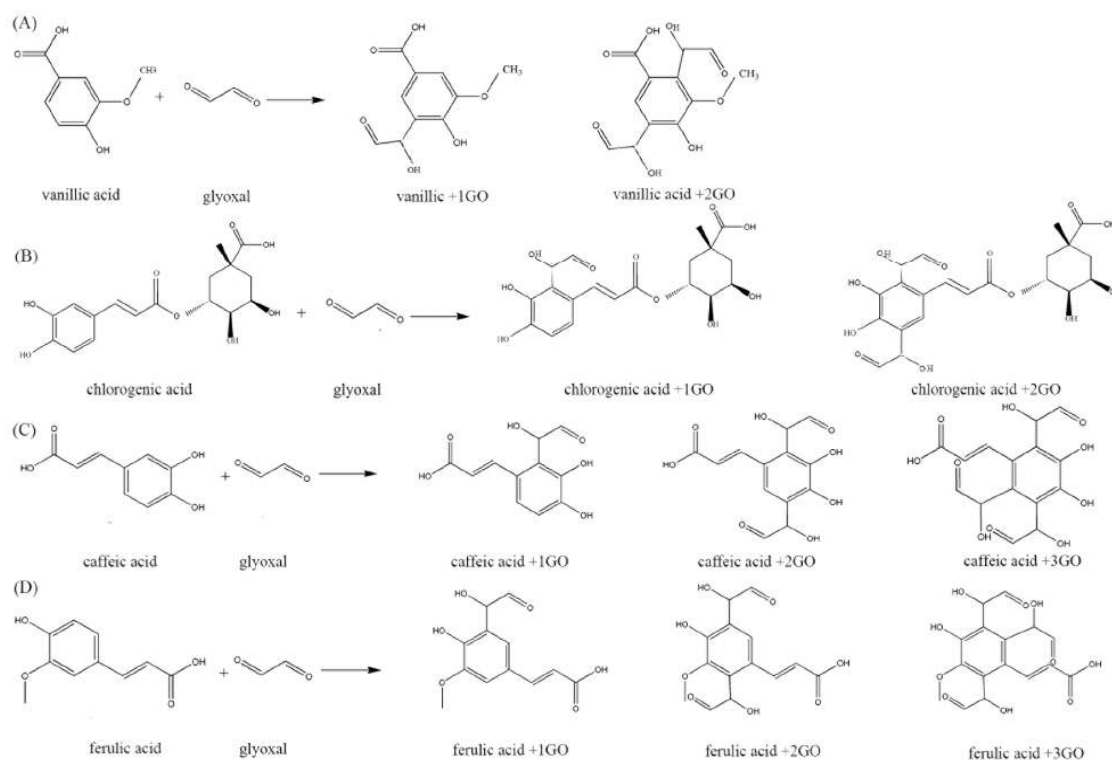


Σχήμα 2.1. Προτεινόμενος μηχανισμός δέσμευσης της MGO από την HT (*in vitro*) (Navarro and Morales, 2015).

Επίσης η ΗΤ και ο οξικός εστέρας της ΗΤ (ΗΤΑ) παρεμποδίζουν τη δημιουργία των προϊόντων Amadori, δρουν παρεμποδιστικά σε όλα τα στάδια της γλυκίωσης των πρωτεϊνών ανασχέοντας το σχηματισμό της CML και της AgrP (argpyrimidine) (Navarro & Morales, 2016).

Συμπερασματικά οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη γλυκίωση δημιουργώντας μονομερή και διμερή προϊόντα προσθήκης. Όσον αφορά στα φλαβονοειδή φαίνεται ότι η σύνδεση συμβαίνει στις θέσεις 6 και 8 στον δακτύλιο Α (Khan et al., 2020).

Τα φαινολικά οξέα επίσης διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vivo* και *in vitro* που οφείλεται στο μηχανισμό δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Ο κύριος τρόπος δράσης τους στην ανάσχεση των AGEs παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2, όπου φαίνεται ότι τα φαινολικά οξέα δεσμεύουν τη GO αποτελεσματικά οδηγώντας στο σχηματισμό μονομερών και διμερών προϊόντων προσθήκης.

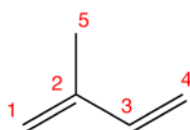


Σχήμα 2.2. Προϊόντα προσθήκης (A) βανιλικού, (B) χλωρογενικού, (C) καφεϊκού και (D) φερουλικού οξέος κατά την αντίδραση με (GO) (Wang et al., 2019).

Συμπερασματικά η ικανότητα ανάσχεσης των φυσικών αναστολέων των AGEs συνδέεται με την ικανότητά τους να παγιδεύουν τις δραστικές δικαρβονυλικές ενώσεις όπως τις MGO, GO και 3-DG οδηγώντας στην δημιουργία μονομερών και διμερών προϊόντων προσθήκης.

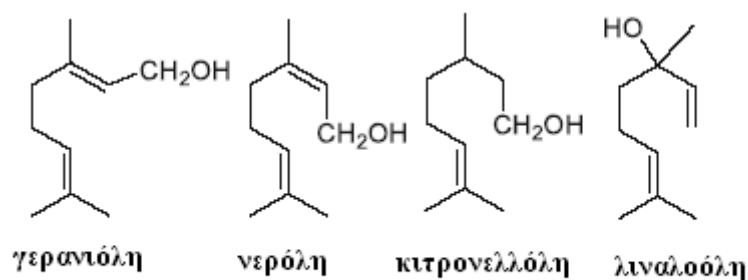
2.3 Δομή των τερπενίων

Τα τερπένια (ή ισοπρενοειδή) είναι μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Η βιοσύνθεσή τους είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά φυσικών ενζυματικών αντιδράσεων που ξεκινά από το οξικό ή το σικιμικό οξύ. Η δομή τους προκύπτει από τη συνένωση κεφαλής – ουράς μονάδων ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο) (Σχήμα 2.3). Ο άνθρακας 1, ονομάζεται κεφαλή της ισοπρενικής μονάδας, ενώ ο άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά της. Όταν τα τερπένια τροποποιηθούν π.χ. με οξείδωση ή αναδιάταξη της ανθρακικής αλυσίδας, οι ενώσεις που προκύπτουν ονομάζονται **τερπενοειδή**.

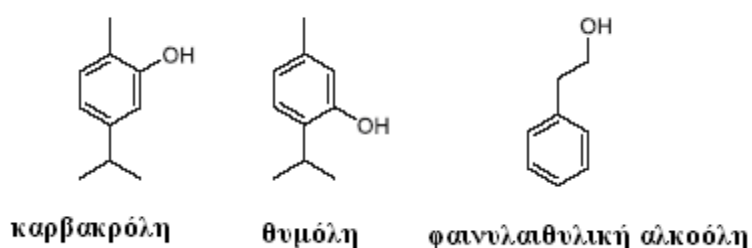


Σχήμα 2.3. Δομή ισοπρενίου (2-μέθυλο 1,3 βουταδιένιο).

Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Τα **μονοτερπένια** είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και βιοσυντίθενται από δύο μονάδες ισοπρενίου, τα **σεσκιτερπένια** έχουν 15 άτομα άνθρακα και προέρχονται από τρία μόρια ισοπρενίου κ.λπ. Τα μονοτερπένια μπορεί να είναι άκυκλα όπως η λιναλοόλη ή κυκλικά όπως το λιμονένιο (Σχήμα 2.4). Μονοτερπένια που η δομή τους περιέχει βενζολικό δακτύλιο όπως το *p*-κυμένιο, η καρβακρόλη, η θυμόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη (Σχήμα 2.5) συναντώνται συχνά ως συστατικά αιθερίων ελαίων αρωματικών φυτών όπως τη ρίγανη (*Origanum* sp.), το θυμάρι (*Thymus* sp.), το θρούμπι (*Satureja* sp.) κ.ά.

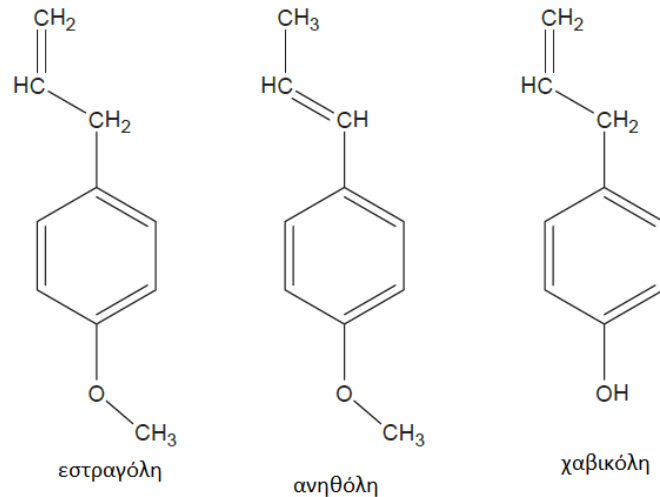


Σχήμα 2.4. Δομές άκυκλων μονοτερπενίων.



Σχήμα 2.5. Δομές κυκλικών μονοτερπενίων.

Στην κατηγορία των μονοτερπενίων ανήκουν και τα φαινυλοπροπανοειδή τα οποία προκύπτουν από διαφορετικό βιοσυνθετικό κύκλο (βιοσύνθεση φαινυλοπροπανοειδών). Οι ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των φαινυλοπροπανοειδών περιέχουν στο μόριό τους ένα βενζολικό δακτύλιο. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η ανηθόλη, η μέθυλο-χαβικόλη (ή εστραγόλη), η ευγενόλη, η κινναμωμική αλδεΐδη και η βανιλίνη (Baser and Demirci, 2007). Η θέση του διπλού δεσμού στην πλευρική αλυσίδα καθορίζει το σχηματισμό των δύο ισομερών της ανηθόλης και της εστραγόλης (Σχήμα 2.6). Η ανηθόλη έχει γεύση γλυκόριζας και αποτελεί την πηγή της γλυκιάς γεύσης του γλυκάνισου και του μάραθου. Η εστραγόλη (μεθυλο-χαβικόλη ή ισο-ανηθόλη) προσφέρει ένα πιο λεπτό και εκλεπτυσμένο άρωμα (Brady, 2013).



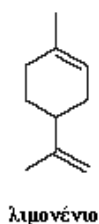
Σχήμα 2.6. Δομές φαινυλοπροπανοειδών.

2.4 Συστατικά αιθερίων ελαίων στην αναστολή των AGEs

Τα αιθέρια έλαια είναι μίγματα 20 - 60 συστατικών σε διάφορες συγκεντρώσεις με κάποιες ενώσεις σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση - (20-70%) και άλλες σε ίχνη. Τα συστατικά με την υψηλότερη συγκέντρωση είναι τα τερπένια, τα τερπενοειδή και μόρια με αρωματικό δακτύλιο. Τα τερπένια όπως και οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική δράση παρέχοντας προστασία σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την οξειδωτική καταπόνηση ([Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos, 2012](#)). Επιπλέον, στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο προστατευτικός ρόλος των τερπενίων στην οξείδωση εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο μέσο, καθώς φαίνεται να διαθέτουν και προοξειδωτική συμπεριφορά σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικές ενώσεις.

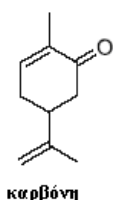
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των τερπενοειδών υδρογονανθράκων έχει προταθεί ότι είναι κυρίως το αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ αλυσίδων που φέρουν υδροϋπεροξειδικές ρίζες (HOO•) με λιπελαϋλικές ρίζες υπεροξυλίου [CH₃(CH₂)₄CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₈]. Η αντίδραση προκαλεί τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης οξείδωσης και αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό στην αναστολή του οξειδωτικού στρες και τον επακόλουθο σχηματισμό AGEs ([Asgary et al., 2014](#)).

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου κύμινου, το οποίο αποτελείται από 80% S-καρβόνη σε σύστημα γλυκόζης-γλυκίνης ανέστειλε τη δημιουργία των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR ενώ διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη της καρβονυλομάδας δεν αποτελεί τον μοναδικό παράγοντα ανάσχεσης (Chawla & Sahu, 2007). Στην ίδια μελέτη η ανηθόλη και η θυμόλη, τα κύρια συστατικά του γλυκού κύμινου, έδρασαν καταλυτικά στις αντιδράσεις του αρχικού σταδίου της MR, προωθώντας την αμαύρωση.



Ανάσχεση στο σχηματισμό των AGEs (πεντοσιδίνη, CML, CEL και MOLD) παρατηρήθηκε από την παρουσία λιμονενίου σε σύστημα BSA και γλυκόζης. Το λιμονένιο προσδένεται στις ενεργές θέσεις γλυκίωσης της πρωτεΐνης μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ένας μηχανισμός που προτάθηκε για πρώτη φορά από τους (Joglekar et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν να μελετηθούν δύο μονοτερπενικές ενώσεις, η λιναλοόλη και η θυμόλη καθώς και το αιθέριο έλαιο του σπόρου του γλυκάνισου ως προς το ρόλο τους στη γλυκίωση της λυσίνης. Στο αιθέριο έλαιο του σπόρου του



γλυκάνισου (anise seed oil) κύριο συστατικό είναι η ανηθόλη (trans - anethole, 1-Methoxy-4-[(1E)-prop-1-en-1-yl]benzene) σε ποσοστό 80-90%, ενώ περιέχονται και μικρά ποσοστά εστραγόλης, ισομερές της ανηθόλης (1-Methoxy-4-(prop-2-en-1-yl) benzene).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Αναλυτικές μέθοδοι ανίχνευσης των AGEs

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ανάλυσης των AGEs, συμπεριλαμβανομένων των φασματοσκοπικών, των κλασικών χρωματογραφικών και ανοσοχημικών μεθόδων, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση υπεριώδους ή φθορισμού (HPLC-UV/FD), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανίχνευση φασματομετρίας διαδοχικής μάζας (UPLCMS/MS) ή η αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Μια πιο τυποποιημένη προσέγγιση για ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των AGEs είναι δύσκολη εξαιτίας της τεράστιας ετερογένειας τους. Παρόλα αυτά, η φθορισμομετρία αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για την αναλυτική μέτρηση κάποιων AGEs λόγω του χαρακτηριστικού φθορισμού τους, όπως για παράδειγμα της πεντοσιδίνης. (Nowotny et al., 2018).

3.1.1 Φθορισμομετρία

Ο όρος φωταύγεια αναφέρεται στην εκπομπή φωτονίων από ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Ανάλογα με τον τύπο προέλευσης της ενέργειας η φωταύγεια προσδιορίζεται με την προσθήκη ενός προθέματος. Στην ανάλυση των τροφίμων χρησιμοποιείται ο όρος φωτοφωταύγεια. Στην περίπτωση αυτή, για την εκπομπή φωτός από μια χημική ουσία απαιτείται προηγουμένως η απορρόφηση UV-Vis ή IR ακτινοβολίας. Φθορισμός και φωσφορισμός είναι οι δύο τύποι της φωτοφωταύγειας που διαφέρουν ως προς τη φύση των βασικών και διεγερμένων καταστάσεων.

Η φωτοφωταύγεια βασίζεται στη διαδικασία διέγερσης των ηλεκτρονίων λόγω των μαγνητικών τους χαρακτηριστικών. Τα άτομα που έχουν μόνο συζευγμένα ηλεκτρόνια, τα διαμαγνητικά, βρίσκονται, δηλαδή, στην απλή κατάσταση, αν τοποθετηθούν σε μαγνητικό πεδίο, δεν υφίσταται κανένας διαχωρισμός ενεργειακών σταθμών και το συνολικό spin είναι μηδέν. Αντίθετα, τα παραμαγνητικά, αυτά δηλαδή που περιέχουν ασύζευκτα (ή μονήρη) ηλεκτρόνια έχουν μαγνητικό πεδίο.

Ο φθορισμός προκύπτει από την απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκεια του φαινομένου, το ηλεκτρόνιο διεγείρεται μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας, χωρίς αλλαγή του spin, με αποτέλεσμα μια βραχεία διεγερμένη κατάσταση (Stavropoulou, 2020). Αντίθετα, στον φωσφορισμό, η διεγερμένη κατάσταση των ηλεκτρονίων συνοδεύεται από αλλαγή του spin και διαρκεί περισσότερο, με τα φαινόμενα αυτά να συμβαίνουν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Η βασική κατάσταση για μια ελεύθερη ρίζα είναι μία διπλή κατάσταση η οποία μεταδίδει ελαφρώς διαφορετικές ενέργειες στο σύστημα. Όταν η διπλή αυτή κατάσταση δεχθεί ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, διεγείρεται σε υψηλότερες ενέργειες μονής ή τριπλής κατάστασης. Όταν το spin ενός απλού ηλεκτρονίου αντιστραφεί, το μόριο θα βρεθεί στην τριπλή κατάσταση, με δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ολικό spin διαφορετικό του μηδενός. Επομένως, η διαφορά μεταξύ μονής και τριπλής κατάστασης είναι ότι στην πρώτη περίπτωση το μόριο είναι διαμαγνητικό, ενώ στην τριπλή κατάσταση είναι παραμαγνητικό. Στη συνέχεια ακολουθεί απορρόφηση ή εκπομπή ακτινοβολίας. Μεταβάσεις μεταξύ των δύο διεγερμένων καταστάσεων μπορούν να συμβούν, με πιο συνηθισμένη από μονή σε μονή κατάσταση. Η διάρκεια ζωής των δύο διεγερμένων καταστάσεων διαφέρει. Η διάρκεια ζωής της τριπλής κατάστασης είναι αρκετά μεγαλύτερη ($\sim 10^{-4}$ sec) από της μονής ($\sim 10^{-8}$ sec). Επομένως, το φαινόμενο του φθορισμού προκύπτει από μετάβαση μονής σε μονή κατάσταση, ενώ το φαινόμενο του φωσφορισμού είναι η μετάβαση από τριπλή σε μονή κατάσταση.

3.1.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό

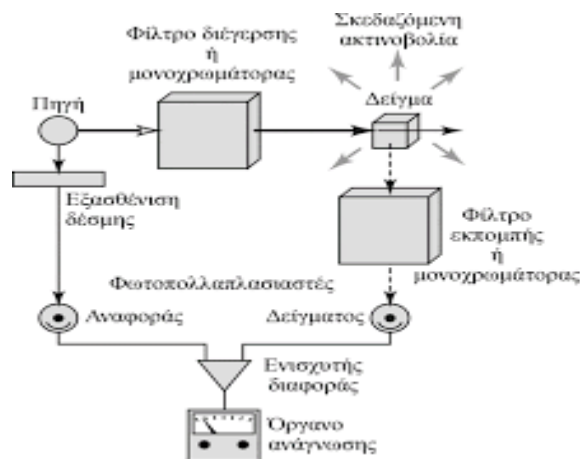
Η δομή των μορίων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να απορροφά ένα μόριο ακτινοβολία UV ή Vis. Οι πιο συνηθισμένες δομές που ευθύνονται για τα φαινόμενα φωσφορισμού ή φθορισμού, είναι οι χημικές ενώσεις, όπου ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας, π, μεταβαίνουν σε π*. Ενώσεις που περιέχουν αρωματικούς πυρήνες παρουσιάζουν φθορισμό με μεγαλύτερη ένταση από ενώσεις με αλειφατικές καρβονυλικές δομές, ενώ απλές ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως το φουράνιο, δε φθορίζουν.

Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την ποσοτική σχέση μεταξύ εντάσεως φθορισμού (ή φωσφορισμού) και συγκεντρώσεως, και προκύπτει από τον νόμο του Beer,

είναι ο συντελεστής κβαντικής απόδοσης, δηλαδή η αναλογία του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων. Έτσι, μια υψηλή τιμή φθορισμού του μορίου πλησιάζει την τιμή 1, ενώ αντίθετα ένα μόριο με πολύ χαμηλό συντελεστή κβαντικής απόδοσης συνεπάγεται χαμηλό φθορισμό. Η ένταση της εκπομπής του φθορισμού εξαρτάται και από το είδος της μετάβασης. Μεταβάσεις με χαμηλή ενέργεια παρατηρούνται πιο εύκολα κατά το φθορισμό. Επίσης, σημαντικό παράγοντα αποτελεί και η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα. Παρατηρείται ότι σε πολύ αραιά διαλύματα η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας.

Τα φαινόμενα διέγερσης και εκπομπής συμβαίνουν σε διαφορετικά μήκη κύματος, σε αντίθεση με την εκπομπή φθορισμού ή φωσφορισμού που μπορεί να συμβεί σε σταθερό μήκος κύματος διαφορετικό από αυτό της διέγερσης. Επομένως, για τις διαφορετικές ενώσεις φθορισμού υπάρχουν ζώνες διέγερσης-εκπομπής.

3.1.1.2 Φθορισμόμετρα



Εικόνα 3.1. Αρχή λειτουργίας φθορισμομέτρου.

Τα όργανα μέτρησης φθορισμού ή φωσφορισμού καθώς και τα φασματοφωτόμετρα παρουσιάζουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Αποτελούνται από μια πηγή φωτός, συνήθως, λυχνία υδραργύρου, που εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

(Εικόνα 4.1) με εύρος μήνων κύματος από 250 – 780 nm. Η κύρια διαφορά τους από τα φασματοφωτόμετρα είναι τα φίλτρα για την επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται, ανιχνεύεται και καταγράφεται ψηφιακά. Ο φθορισμός των AGEs εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) σε αναγνώστη πλάκας VICTOR (Perkin-Elmer).

3.1.1.3 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με φθορισμομετρία

Μία από τις πιο κοινές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των AGEs είναι η φασματοσκοπία φθορισμού. Τα AGEs όταν ακτινοβοληθούν με ακτινοβολία UV-Vis εκπέμπουν φθορισμό. Η ακτινοβολία παράγεται από μία λάμπα υδραργύρου υψηλής τάσης ή λάμπα ξένου και διέρχεται από φίλτρα διέγερσης και εκπομπής. Το μήκος κύματος της διέγερσης καταγράφεται στα 370 nm και της εκπομπής στα 430 nm. Επομένως, επιλέγοντας τα κατάλληλα φίλτρα, τα μόρια του δείγματος διεγείρονται απορροφώντας την ακτινοβολία και η εκπομπή φθορισμού επιτυγχάνεται στα 430 nm. Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται, ανιχνεύεται και καταγράφεται ψηφιακά. Ο φθορισμός των AGEs εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) σε αναγνώστη πλάκας VICTOR (Perkin-Elmer).

Η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί αρκετά εύχρηστη και γρήγορη με σημαντικά αποτελέσματα στην έρευνα της μέτρησης των AGEs στα τρόφιμα (Wei, Liu & Sun, 2018). Χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων των AGEs σε δίαιτες, όπου φάνηκε να παράγονται περισσότερα στις θερμαινόμενες τροφές (Zhu et al., 2011), καθώς και σε διαφορετικά είδη καθημερινών καταναλωτικών τροφίμων, όπου φάνηκε πως εκείνα με την υψηλότερη υγρασία είχαν λιγότερα AGEs από εκείνα με υψηλή πρωτεΐνη (Fang et al., 2014).

Στη φθορισμομετρία τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής για τα AGEs ποικίλουν από 300 – 420 nm και 350 – 600 nm, αντίστοιχα. Αν και είναι μια πολύ ευαίσθητη και σχετικά εύκολη μέθοδος, λόγω έλλειψης εξειδίκευσης, η μέθοδος αυτή

μπορεί να ανιχνεύσει μόνο έναν τύπο AGEs παρά ένα συγκεκριμένο AGE (Wei, Liu & Sun, 2018).

3.1.2 Φασματοφωτομετρία με υπεριώδη-ορατή ακτινοβολία (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία είναι μία τεχνική κατά την οποία χρησιμοποιείται φως για τη μέτρηση της συγκέντρωσης χημικών ουσιών, βασιζόμενη στην ικανότητα των ουσιών αυτών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων.

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis αποτελεί μία μέθοδο ανάλυσης που βρίσκει πολύ συχνά εφαρμογή στην ποσοτική ανάλυση, όπως στην ανάλυση των τροφίμων λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων. Εφαρμόζεται εύκολα και γρήγορα, έχει μεγάλη ευαισθησία και χαμηλό κόστος. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και των μορίων μιας χημικής ένωσης σε μορφή διαλύματος. Όταν το φως (πολυχρωματική ακτινοβολία) προσπίπτει σε ένα διάλυμα μιας ουσίας, γίνεται επιλεκτική απορρόφηση, δηλαδή απορροφούνται μόνο ακτινοβολίες των οποίων τα φωτόνια έχουν ενέργεια ίση με την ενέργεια που χρειάζεται η ουσία για να μεταβεί σε στάθμη υψηλότερης ενέργειας.

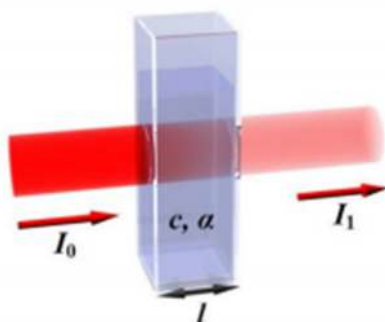
3.1.2.1 Απορρόφηση – Νόμος Lambert-Beer

Για τη φασματοσκοπία ορατού και υπεριώδους το δείγμα-διάλυμα τοποθετείται, συνήθως, σε διάφανες κυψελίδες (cuvettes) με επίπεδες επιφάνειες κατασκευασμένες από υλικό προσαρμοσμένο στις παραμέτρους της μέτρησης (χαλαζίας και γυαλί για την υπεριώδη και την ορατή περιοχή, αντίστοιχα). Το μήκος (l) της κυψελίδας αποτελεί το μήκος της διαδρομής που διανύει η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο εξεταζόμενο δείγμα-διάλυμα.

Η ανάλυση μιας ουσίας με τη χρήση φασματοφωτομετρίας απαιτεί απορρόφηση του φωτός και η απορρόφηση αυτή να διαφοροποιείται από εκείνη που οφείλεται σε άλλες ουσίες του δείγματος. Επειδή οι περισσότερες ουσίες απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία, οι μετρήσεις σε αυτή τη φασματική περιοχή δεν ευνοούν πάντα και γι' αυτό η ανάλυση

περιορίζεται στην ορατή περιοχή του φάσματος. Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν άλλες ουσίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η απορρόφηση στο υπεριώδες.

Επομένως, με τη χρήση λάμπας δευτερίου ή βολφραμίου για τις περιοχές υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας, αντίστοιχα εκπέμπεται μονοχρωματική ακτινοβολία έντασης (I_0) η οποία διέρχεται μέσα από διάλυμα που περιέχει ουσία, συγκέντρωσης (c), που απορροφά (Εικόνα 4.2). Η ένταση της ακτινοβολίας ελαττώνεται σταδιακά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω της απορρόφησης της από την ουσία. Η μείωση της έντασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας και από την απόσταση που διανύει η ακτινοβολία μέσα στο διάλυμα.



Εικόνα 3.2. Νόμος Lambert-Beer.

Η μαθηματική σχέση που εκφράζει τη γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης είναι γνωστή ως **Νόμος Lambert-Beer**:

$$I = I_0 \cdot e^{-alc} \xleftrightarrow{\varepsilon = \alpha \cdot M_r} I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon lc} \quad (1)$$

ή ισοδύναμα

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\varepsilon lc \quad (2)$$

όπου ο λόγος $T = I/I_0$ (διαπερατότητα) καθορίζει το ποσοστό διέλευσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (I_0) από το διάλυμα και λαμβάνει τιμές από 0 έως 1. Στην πράξη, όμως, χρησιμοποιείται συνήθως ο δεκαδικός λογάριθμος του I/I_0 μέσω του οποίου ορίζεται η **απορρόφηση A**:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

όπου I , η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, I_0 , η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, α , απορροφητικότητα όταν η συγκέντρωση, c , του διαλύματος εκφράζεται σε g/L ϵ , ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης με διαστάσεις $[\text{L}/\text{mol} \cdot \text{cm}]$ και M_r , η μοριακή μάζα της ουσίας).

Σύμφωνα, λοιπόν, με την αρχή που περιγράφεται από τον νόμο Lambert-Beer (σχέση (3)), διαπιστώνεται άμεσα ότι η απορρόφηση εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του διαλύματος. Επομένως, από την εξίσωση αυτή μπορεί εύκολα να υπολογιστεί η συγκέντρωση της ουσίας γνωρίζοντας την τιμή της απορρόφησης. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες αποκλίσεις του νόμου που εμποδίζουν την εφαρμογή του, αν δεν ληφθούν υπόψη.

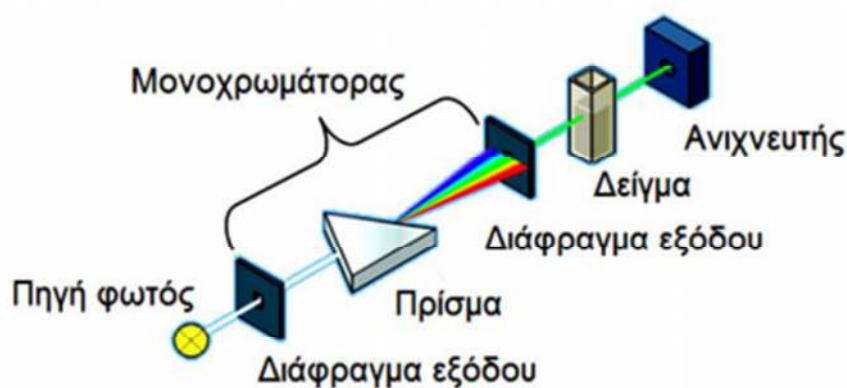
3.1.2.2 Αποκλίσεις του Νόμου Lambert-Beer

Μία από τις πιο σημαντικές αποκλίσεις αποτελεί η συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση της ακτινοβολίας και η οποία πρέπει να είναι σε χαμηλά επίπεδα. Υψηλές συγκεντρώσεις οδηγούν σε χαμηλότερη απορροφητικότητα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Ιδανικά, ο νόμος του Lambert-Beer μπορεί να εφαρμοστεί σε αραιά διαλύματα ($10^{-7} < C < 10^{-2} \text{ M}$).

Άλλες αποκλίσεις που επηρεάζουν καθοριστικά την εφαρμογή του νόμου Lambert-Beer αφορούν στα όργανα μέτρησης, όπως είναι οι διακυμάνσεις στην τάση του ρεύματος και κατά συνέπεια στην ένταση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας, ο τύπος της ακτινοβολίας καθώς και το μήκος της κυψελίδας. Ο νόμος Lambert-Beer μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν επιλέγεται μονοχρωματική πηγή ακτινοβολίας. Μία πολυχρωματική ακτινοβολία μπορεί να επηρεάσει τον νόμο καθώς οι μοριακές απορροφητικότητες κάθε μήκους κύματος διαφέρουν και η σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης της ουσίας δεν είναι πλέον γραμμική. Το διαφορετικό μήκος μεταξύ των κυψελίδων αποτελεί μία ακόμη σημαντική απόκλιση καθώς θα προστεθεί ένα υπόβαθρο στην εξίσωση, το οποίο όμως μπορεί εύκολα να αποφευχθεί επιλέγοντας ίδιου μεγέθους κυψελίδες.

3.1.2.3 Φασματοφωτόμετρα

Η μέτρηση της απορρόφησης του φωτός καθώς και η καταγραφή ενός φάσματος απορρόφησης γίνεται με ειδικά όργανα, τα φασματοφωτόμετρα (Εικόνα 4.3). Τα φασματοφωτόμετρα διακρίνονται σε φασματοφωτόμετρα υπεριώδους ή ορατού ή υπεριώδους-ορατού ή υπερύθρου, σε φασματοφωτόμετρα απλής ή διπλής δέσμης και σε φασματοφωτόμετρα άμεσης ανάγνωσης ή μηδενισμού. Αποτελούνται από μια πηγή φωτός, τον μονοχρωμάτορα, την κυψελίδα με το δείγμα, έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας και το σύστημα μέτρησης που περιλαμβάνει ενισχυτή και όργανο ανάγνωσης.



Εικόνα 3.3. Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου UV-Vis.

Η πηγή της ακτινοβολίας διαφοροποιείται ανάλογα με το επιθυμητό μήκος κύματος. Σε ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis περιέχονται δύο πηγές, μια λυχνία βολφραμίου για το ορατό φάσμα (400 – 800 nm) και μία λυχνία υδρογόνου για το υπεριώδες φάσμα (190 – 400 nm).

Σε κάθε τύπο φασματοφωτομέτρου η πηγή φωτός εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με ένα αριθμό φωτονίων σε μία στενή περιοχή φασμάτων, η οποία περνά μέσω του μονοχρωμάτορα για τον προσδιορισμό του μήκους κύματος. Η στενή αυτή περιοχή του φάσματος είναι απαραίτητη για να μπορεί να ισχύσει ο νόμος του Lambert-Beer.

Στη συνέχεια η ακτινοβολία διέρχεται από την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κυψελίδα το υλικό κατασκευής της κυψελίδας εξαρτάται από το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Στην περιοχή του υπεριώδους

χρησιμοποιούνται κυψελίδες από χαλαζία, ενώ στην περιοχή του ορατού γυάλινες ή πλαστικές. Σημαντικό χαρακτηριστικό της κυψελίδα αποτελούν, επίσης, και οι διαστάσεις της εφόσον καθορίζουν το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα. Οι κυψελίδες για το τυφλό διάλυμα πρέπει να έχουν ίδιες διαστάσεις με του δείγματος, έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί ο νόμος του Lambert-Beer.

Έπειτα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.3. η ακτινοβολία πηγαίνει στον ανιχνευτή που συνήθως είναι ένας απλός φωτοπολλαπλασιαστής, όπου τα φωτόνια που προσπίπτουν μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό ενισχύεται μέσω ενός ηλεκτρονικού κυκλώματος και καταγράφεται σε μια οθόνη.

3.1.2.4 Προσδιορισμός AGEs στα τρόφιμα με Φασματοφωτομετρία UV-Vis

Τα τρόφιμα αποτελούν περίπλοκα συστήματα, αποτελούμενα από διαφορετικά συστατικά με διαφορετικές ιδιότητες, γεγονός που τα καθιστά στη μέτρηση. Για το λόγο αυτό προτιμάται η μέτρηση της αντίδρασης Maillard με τη χρήση μοντέλων συστημάτων που περιλαμβάνουν πρωτογενή αντιδραστήρια, όπως τα ελεύθερα αμινοξέα που περιέχουν ελεύθερες αμινομάδες και αναγωγικά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη. Μετά την απαιτούμενη θέρμανση, η εξέλιξη της αντίδρασης μπορεί να μελετηθεί με διάφορες μεθόδους.

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαφορετικών προϊόντων σε διαφορετικά στάδια της αντίδρασης Maillard με μήκος κύματος που εξαρτάται από τις λειτουργικές ομάδες των προϊόντων σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Συνήθως, επιλέγονται τρία μήκη κύματος που σχετίζονται με τα τρία κύρια στάδια της αντίδρασης. Αρχικά, η ακτινοβολία με μήκος κύματος 280 nm απορροφάται από τα προϊόντα του αρχικού σταδίου, όπως είναι οι βάσεις Schiff και τα προϊόντα Amadori. Στην συνέχεια, τα προϊόντα του ενδιάμεσου σταδίου όπως είναι τα δικαρβονύλια, το φουράνιο και τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου που προέρχονται από αφυδάτωση, οξείδωση και κατακερματισμό των αρχικών προϊόντων, μετρώνται στα 360 nm. Τέλος, τα τελικά προϊόντα της μη ενζυμικής αμαύρωσης όπως οι αρωματικές ενώσεις και τα χρωματισμένα πολυμερή μετρώνται στα 420 nm. Ο χρόνος θέρμανσης σε συνδυασμό με το σήμα της απορρόφησης δημιουργούνε μια καμπύλη που περιγράφει την εξέλιξη της αντίδρασης

Maillard στη διάρκεια του χρόνου, δίνοντας σημαντικά αποτελέσματα. Βέβαια, η φασματοφωτομετρία UV-Vis δεν αποτελεί μια επιλεκτική μέθοδο επειδή κάποιες ενώσεις μπορεί να έχουν παρόμοια δομή και επομένως να απορροφήσουν ακτινοβολία στο ίδιο μήκος κύματος (Stavropoulou, 2020).

3.1.3 Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος που βασίζεται στη μέτρηση του χρώματος που αποκτούν τα προϊόντα κατά τη διάρκεια της χημικής αντίδρασης. Βασίζεται στην αντανάκλαση του φωτισμού που παράγεται από μια πηγή φωτός στην επιφάνεια του παρατηρούμενου αντικειμένου και στην ένταση αυτής της αντανάκλασης που φτάνει στο ανθρώπινο μάτι (Gilchrist & Nobbs, 2000). Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα της χρωματογραφικής μεθόδου είναι το χρωματικό μοντέλο CIE Lab ή $L^* a^* b^*$. Πρόκειται για έναν τρισδιάστατο ομοιόμορφο οπτικά χρωματικό χώρο που προσομοιάζει καλύτερα απ' όλα τα χρωματικά μοντέλα στην ανθρώπινη αντίληψη των χρωματικών διαφορών.

Η μέτρηση του χρώματος αποτελεί πολύτιμη μέθοδο για την εξέταση της ανάπτυξης χρώματος κατά τη θερμική επεξεργασία τροφίμων, όπως για παράδειγμα το χαρακτηριστικό πορτοκαλί έως καφέ χρώμα που αναπτύσσουν οι μελανοειδίνες στην αντίδραση Maillard (Echavarría et al., 2016).

3.1.4 Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης των AGEs

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η HPLC αποτελεί μια χρωματογραφική τεχνική στην οποία το υγρό χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και ένας μεμονωμένος διαλύτης με διαφορετικές πολικότητες ή ένας μικτός διαλύτης με διαφορετικές αναλογίες αντλείται σε μία στήλη με σταθερή φάση χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υψηλής ποιότητας. Τα συστατικά στη στήλη διαχωρίζονται και ανιχνεύονται (Wei, Liu & Sun, 2018).

Χρωματογραφία Αερίου (GC)

Η χρωματογραφία αερίου είναι μια χρωματογραφική τεχνική σχεδιασμένη για τον προσδιορισμό πτητικών ουσιών. Μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των AGEs, εκφρασμένα ως CML, αφού προηγηθεί παραγοντοποίηση των δειγμάτων ή άλλων πτητικών ενδιάμεσων της αντίδρασης Maillard, όπως οι πυραζίνες, το φουράνιο με ακόμη υψηλότερη απόδοση όταν συνδεθούν με φασματόμετρο μάζας (GC/MS) (Milkovska-Stamenova et al., 2015).

Ανάλυση Ανοσοπροσδιορισμού

Είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των AGEs βασισμένη στην αλληλεπίδραση αντιγόνων και συγκεκριμένων αντισωμάτων (Wei, Liu & Sun, 2018). Ο προσδιορισμός αυτός στα τρόφιμα μπορεί να πραγματοποιηθεί με την αλληλεπίδραση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CML, όπως προτάθηκε σε μελέτες (Goldberg et al., 2004). Αν και η τεχνική αυτή είναι αρκετά επιλεκτική και συγκεκριμένη, το κόστος της είναι αρκετά υψηλό και δεν επιλέγεται συχνά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματικό μέρος

4.1 Υλικά και Μέθοδοι

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής είναι η μελέτη της επίδρασης τερπενικών ενώσεων στη γλυκίωση και στο σχηματισμό των AGEs. Για την εξέλιξη της αντίδρασης παρασκευάστηκαν 2 συστήματα γλυκόζης -λυσίνης, ένα ισομοριακό μίγμα (1:1) και ένα με 10πλάσια συγκέντρωση γλυκόζης (10:1), στα οποία προστέθηκαν οι λιναλοόλη, θυμόλη και το αιθέριο έλαιο γλυκάνισου σε συγκεντρώσεις 2, 4, 6 και 8μM. Τα μίγματα αντίδρασης θερμάνθηκαν στους 80° και τους 100° C για χρονικό διάστημα 3 ωρών, με παρακολούθηση ανά μία ώρα της πορεία της αντίδρασης και του τρόπου δράσης των τερπενικών ενώσεων.

4.1.1 Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- PBS, phosphate buffer 0,1M, Bectron, Dickinson and Company
- d-Glucose anhydrous, Acros Organics
- L-Lysine monohydrochloride, Acros Organics
- Tween 80, Serva Electrophoresis GmbH
- Linalool, 97%, Acros Organics, M=154.25 g/mol, CAS: 78-70-6
- Anise Oil, Sigma Aldrich, CAS: 8007-70-3 (nature identical, Synonym: **Anise seed oil**)
- Thymol, Applichem, M=150.24 g/mol, CAS: 89-83-8

Υλικά:

- Ογκομετρικές φιάλες (25, 50, 100, 500, 1000 mL)
- Πιπέτες (10 mL)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι μέτρησης (25, 100 mL)
- ποτήρια ζέσεως (50, 100, 250 mL)
- Πιπέτες Pasteur

- Falcons
- Μαγνήτες

4.1.2 Παρασκευή διαλυμάτων

1. **Διάλυμα PBS (0,1M):** Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 9,23g PBS_(σύμφωνα με τις οδηγίες της συσκευασίας) προστίθεται απιονισμένο νερό και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.
2. **Διάλυμα Γλυκόζης σε PBS (1M):** Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 45,039g γλυκόζης (MW 180,156 g/mol) προστίθεται 8ml PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250ml και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.
3. **Διάλυμα Γλυκόζης σε PBS (0,1M):** Από το διάλυμα γλυκόζης 1M (8ml. 2), μεταφέρονται με σιφώνι πλήρωσης 10ml σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος συμπληρώνεται με PBS μέχρι τη χαραγή.
4. **Διάλυμα Λυσίνης σε PBS (0,1M):** Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 4,57g λυσίνης (MW 146,19g/mol), προστίθεται 8ml PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250ml και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.
5. **Διάλυμα εργασίας Λιναλοόλης (2mM) σε PBS:** Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,03085g λιναλοόλης, προστίθεται μικρή ποσότητα PBS 0,1M, και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.
6. **Διάλυμα εργασίας Anise seed Oil (2mM) σε PBS:** Στο αιθέριο έλαιο του σπόρου του γλυκάνισου (anise seed oil) κύριο συστατικό είναι η ανηθόλη (trans -anethole, 1-Methoxy-4-[(1E)-prop-1-en-1-yl]benzene) σε ποσοστό 80-90%, ενώ περιέχει και μικρά ποσοστά εστραγόλης, ισομερές της ανηθόλης (1-Methoxy-4-(prop-2-en-1-yl) benzene). Η παρασκευή του διαλύματος έγινε βάση του μοριακού βάρους της ανηθόλης Mw 148.20 g/mol. Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,02964g Anise seed Oil, προστίθεται μικρή ποσότητα PBS 0,1M και **0,4g Tween 80** και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε Ultra Turex για περίπου 1min μέχρι να ομογενοποιηθεί και

στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

7. **Διάλυμα εργασίας Θυμόλης (2mM)** σε PBS: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,03004g Θυμόλης, προστίθεται μικρή ποσότητα PBS και 0,4g **Tween 80**. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά σε Ultra Turex για περίπου 1min μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

4.1.3 Προετοιμασία των μιγμάτων αντίδρασης

Σε γυάλινα φιαλίδια με κωνικό πάτο και πώμα σιλικόνης με στρογγυλή φλάντζα τοποθετήθηκε το μίγμα της αντίδρασης όπως φαίνεται στο Πίνακα 5.1

Πίνακας 4.1: Μίγμα αντίδρασης

| Σύστημα | 10:1 (mL) | 1:1 (mL) |
|--------------|-----------|----------|
| Γλυκόζη 1M | 3 | |
| Γλυκόζη 0,1M | | 3 |
| Λυσίνη 0,1M | 3 | 3 |

Στη συνέχεια από το κάθε διάλυμα εργασίας (5), (6) και (7) προστέθηκαν οι ποσότητες που φαίνονται στη 2^η στήλη του Πίνακα 4.2 ώστε τελικά να προκύπτουν οι συγκεντρώσεις A, B, C και D (C (μM) τερπενικών ενώσεων) στο μίγμα της αντίδρασης.

Πίνακας 4.2: Συγκέντρωση τερπενικών ενώσεων στο μίγμα αντίδρασης

| α/α | V(μL) τερπενικών ενώσεων από το διάλυμα εργασίας | C (μM) τερπενικών ενώσεων στο μίγμα αντίδρασης |
|-----|--|--|
| A | 6,25 | 2 |
| B | 12,50 | 4 |
| C | 18,75 | 6 |
| D | 25,00 | 8 |

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα αναδεύεται και τοποθετείται σε Thermo Shaker LLG, Unithermix 1 Pro όπου θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 80°C και στους 100°C για 3 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται κάθε μία ώρα, αποσύροντας 1 σωλήνα

(για κάθε χρονικό σημείο). Για κάθε θερμοκρασία παρασκευάστηκαν 4 τυφλά δείγματα (blanks) που περιέχουν: 6 mL διαλύματος PBS 0,1M (σε αντικατάσταση του μίγματος αντίδρασης) και τις A, B, C και D συγκεντρώσεις τερπενικών ενώσεων αντίστοιχα. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου (**controls**) αποτελούμενα από τα μίγματα αντίδρασης 10:1 και 1:1 χωρίς την προσθήκη τερπενικών ενώσεων. **Η πειραματική πορεία που περιγράφεται στον Πίνακα 4.3 πραγματοποιήθηκε εις διπλούν (2 βιολογικές επαναλήψεις).**

Πίνακας 4.3: Πειραματική πορεία

| Χρόνος θέρμανσης | Σύστημα 10:1, 80°C C τερπ | Σύστημα 10:1, 100° C C τερπ | Σύστημα 1:1,80°C C τερπ | Σύστημα 1:1, 100°C C τερπ |
|------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 1h | A | A | A | A |
| 1h | B | B | B | B |
| 1h | C | C | C | C |
| 1h | D | D | D | D |
| 2h | A | A | A | A |
| 2h | B | B | B | B |
| 2h | C | C | C | C |
| 2h | D | D | D | D |
| 3h | A | A | A | A |
| 3h | B | B | B | B |
| 3h | C | C | C | C |
| 3h | D | D | D | D |

4.2 Μέθοδοι παρακολούθησης της αντίδρασης

Η παρακολούθηση της αντίδρασης MR έγινε μέσω μη εξειδικευμένων δεικτών όπως είναι ο σχηματισμός φθοριζουσών ουσιών και η μεταβολή του χρώματος του μίγματος αντίδρασης. Στα πρώτα στάδια της αντίδρασης MR τα ανάγοντα σάκχαρα αντιδρούν με τα αμινοξέα οδηγώντας στο σχηματισμό άχρωμων προϊόντων τα οποία δεν απορροφούν στην περιοχή του ορατού φάσματος και η παρακολούθηση του σχηματισμού τους γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm ενώ τα προϊόντα στο ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης απορροφούν στα 360nm. Στα τελευταία στάδια της αντίδρασης παράγονται υψηλού μοριακού βάρους μελανοΐδινες, που διαθέτουν χρωμοφόρα τμήματα τα οποία απορροφούν στα 420nm (browning intensity).

4.2.1 Μέτρηση χρώματος των προϊόντων της αντίδρασης Maillard (MRPs)

Το χρώμα σε κάθε πειραματικό σημείο προσδιορίστηκε με χρωματόμετρο Lovibond LC100. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινη κυψελίδα. Το δείγμα φωτίστηκε με D65-τεχνητό φως της ημέρας (10° σάνταρ γωνία) σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Για τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε το χρωματικό μοντέλο CIELab και οι συντεταγμένες L^* , a^* και b^* . Η συνιστώσα L αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα, με το πολύ φωτεινό να μεταφράζεται ως $L=100$ και το σκοτεινό ως $L=0$. Η συνιστώσα a αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ του πράσινου ($-a$) και του κόκκινου ($+a$) και η συνιστώσα b αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ του μπλε ($-b$) και του κίτρινου ($+b$) (Figura & Teixeira, 2007). Η μεταβολή του χρώματος συμβολίζεται ως ΔE και ισούται με:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^{\circ})(a^* - a^{\circ}) + (b^* - b^{\circ})} \quad (1)$$

όπου L° , a° και b° είναι το χρώμα των δειγμάτων ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο θέρμανσης (1, 2, και 3h) και θερμοκρασία (80° και 100° C).

Η κάθε τιμή ΔE χρώματος είναι ο μέσος όρος δύο προσδιορισμών για κάθε βιολογική επανάληψη.

4.2.2 Μέτρηση φθορισμού των AGEs

Η μέτρηση του αυθόρμητου φθορισμού των AGEs πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο με φίλτρα σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 370 και 420 nm, αντίστοιχα (excitation/emission 370/430nm). Για τον σκοπό αυτό τοποθετήθηκαν 200μL από κάθε πειραματικό σημείο καθώς και από τα δείγματα ελέγχου σε μικροπλάκα 96 θέσεων (κάθε πειραματικό σημείο τοποθετήθηκε σε δύο θέσεις σε κάθε βιολογική επανάληψη). Ο φθορισμός των AGEs εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) σε αναγνώστη πλάκας Victor 801 (Perkin-Elmer, Singapore Pte Ltd). Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχέση (2)

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{Fluo_{control} - Fluo_{sample}}{Fluo_{control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

όπου $Fluo_{control}$ ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης (10:1 και 1:1) στην κάθε θερμοκρασία και χρόνο θέρμανσης χωρίς την προσθήκη τερπενικών ενώσεων, και $Fluo_{sample}$ ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης με την προσθήκη τερπενικών ενώσεων.

4.2.3 Μέτρηση απορρόφησης

Η μέτρηση της απορρόφησης στα 360nm και 420nm πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο με μικροπλάκες Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA). Για την μέτρηση τοποθετήθηκαν 200μL από κάθε πειραματικό σημείο καθώς και από τα δείγματα ελέγχου σε μικροπλάκα 96 θέσεων (κάθε πειραματικό σημείο τοποθετήθηκε σε δύο θέσεις για κάθε βιολογική επανάληψη). Η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης JASCO V-530 UV-Vis (Jasco, Tokyo), όπου τα δείγματα και τα controls τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία 1cm. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχέση (3)

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{Abs_{280_360_420_control} - Abs_{280_360_420_sample}}{Abs_{280_360_420_control}} \right) \times 100 \quad (3)$$

όπου, $Abs_{280-360-420_control}$ και $Abs_{280-360-420_sample}$ η απορρόφηση των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων σε καθένα από τα 3 μήκη κύματος για κάθε θερμοκρασία και χρονικό σημείο της αντίδρασης.

4.3 Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics Centurion XVI.I. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Στο διάστημα αυτό η κρίσιμη τιμή P-value, κάτω από την οποία τα δείγματα που εξετάζονται διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους είναι 0.05.

Για τον προσδιορισμό των στατιστικών διαφορών πραγματοποιήθηκε έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων (multiple sample comparison). Για το σχολιασμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν θηκογράμματα τα οποία αποτελούν μία τεχνική διερευνητικής ανάλυσης των δεδομένων από την οποία αντλούνται πληροφορίες ενώ δεν είναι μια διαδικασία εξαγωγής οριστικών συμπερασμάτων. Σε μία συμμετρική κατανομή, η διάμεσος εμφανίζεται στο μέσο του θηκογράμματος και οι μύστακες έχουν το ίδιο μήκος. Στις κατανομές που εμφανίζουν θετική ασυμμετρία η διάμεσος απομακρύνεται από την επάνω βάση του ορθογωνίου και μετακινείται προς τα κάτω. Προφανώς όσο πιο έντονη γίνεται η θετική ασυμμετρία τόσο περισσότερο μετακινείται η διάμεσος προς τα κάτω. Επιπλέον, ο πάνω μύστακας είναι μεγαλύτερος από τον κάτω. Καθώς αυξάνεται η θετική ασυμμετρία, ο πάνω μύστακας γίνεται ολοένα μεγαλύτερος. Αντίστροφα, στην αρνητική ασυμμετρία η διάμεσος μετακινείται προς την επάνω βάση του θηκογράμματος και μεγαλώνει το μήκος του κάτω μύστακα. Η **διάμεσος (median)** της κατανομής του δείγματος είναι ένας αριθμός για τον οποίο ισχύει ότι το πολύ 50% των τιμών του δείγματος (των παρατηρήσεων) είναι μικρότερες από αυτόν και επίσης το πολύ 50% των τιμών του δείγματος είναι μεγαλύτερες από αυτόν. Εκφράζει την *κεντρική θέση* της κατανομής του δείγματος και γι' αυτό στη βιβλιογραφία συναντάται και ως **μέσος θέσης (position average)**. Τα ***p-ποσοστιαία σημεία (quantiles)*** της κατανομής του δείγματος συμβολίζονται με x_p , $0 < p < 1$. Αποτελούν γενίκευση της έννοιας της *διαμέσου* και βοηθούν στην πληρέστερη περιγραφή της θέσης της κατανομής του δείγματος αλλά και της μεταβλητότητας των τιμών του και της μορφής της κατανομής του.

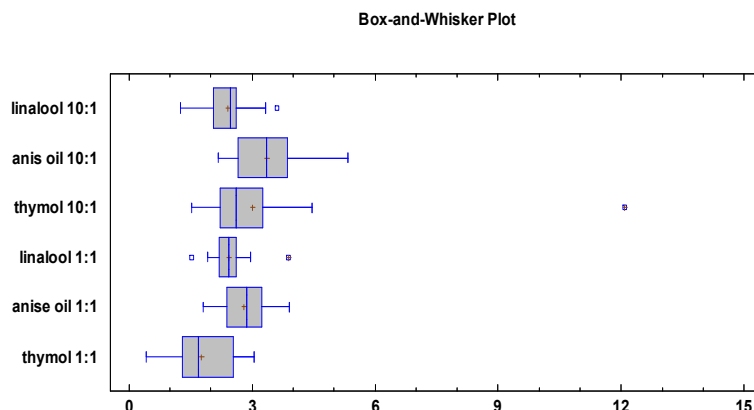
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αποτελέσματα

5.1 Επίδραση τερπενικών ενώσεων στη μεταβολή του χρώματος

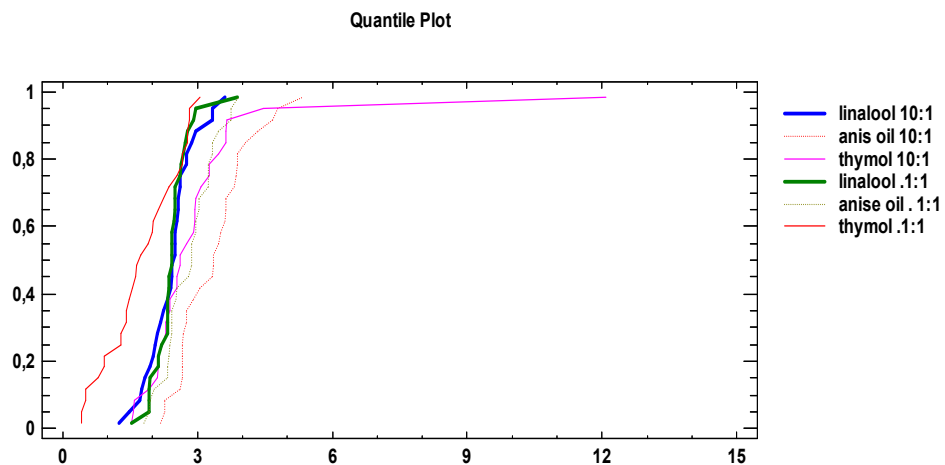
5.1.1 Θερμική επεξεργασία στους 80 °C

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ΔΕ στο σύστημα 10:1 και 1:1 στους 80 °C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.1) παρατηρείται, στο σύστημα 10:1, θετική ασυμμετρία στην κατανομή τιμών γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της θυμόλης (median=2,62%) και αρνητική ασυμμετρία στην περίπτωση της λιναλοόλης (median=2,46%). Το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου παρουσιάζει συμμετρική κατανομή και στα δύο συστήματα (σύστημα 10:1 median=3,35%, σύστημα 1:1 median= 2.86%) ενώ ίδια κατανομή παρατηρείται στο σύστημα 1:1 στην λιναλοόλη (median=2,43%). Η θυμόλη, στο σύστημα 1:1, παρουσιάζει θετική ασυμμετρία (median =2,86%). Τα δεδομένα στην περίπτωση της θυμόλης που είναι μεγαλύτερα από την διάμεσο έχουν μεγαλύτερη διασπορά από εκείνα που είναι μικρότερα και στα δύο συστήματα. Επίσης, το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της λιναλοόλης είναι μικρό γεγονός που εξηγεί τη μικρή μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις της τερπενικής αυτής ένωσης κατά τα διαστήματα 1,2 και 3 h θέρμανσης στους 80 °C, και στα δύο συστήματα, ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στην περίπτωση της θυμόλης και του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου. Τέλος, οι τιμές 3,60 στην περίπτωση της λιναλοόλης και 12,09% της θυμόλης στο σύστημα 10:1 καθώς και η τιμή 3,89% (στο σύστημα 1:1) στην λιναλοόλη θεωρούνται ακραίες ή έκτροπες και μπορεί να είναι λανθασμένες.



Σχήμα 5.1. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά τις τιμές ΔE στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους $80^\circ C$. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1° και 3° τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα **p-ποσοστιαία σημεία (quantiles)** της κατανομής του δείγματος αποτελούν γενίκευση της έννοιας της διαμέσου και βοηθούν στην πληρέστερη περιγραφή της θέσης της κατανομής του δείγματος (αλλά και της μεταβλητότητας των τιμών του και της μορφής της κατανομής του). Τα p-ποσοστιαία σημεία σε ομαδοποιημένες παρατηρήσεις μπορούν να υπολογισθούν από το πολύγωνο αθροιστικών σχετικών συχνοτήτων σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων. Τα p-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.2) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση της θυμόλης σε όλες τις συγκεντρώσεις και καθ' όλη τη διάρκεια της θέρμανσης στο σύστημα 1:1 επέφερε την μικρότερη μεταβολή στο χρώμα. Η προσθήκη λιναλοόλης σε όλες τις συγκεντρώσεις και καθ' όλη τη διάρκεια της θέρμανσης και στα δυο συστήματα επηρέασε κατά τον ίδιο τρόπο την εξέλιξη του χρώματος και συνεπώς τον σχηματισμό προϊόντων πολυμερισμού.



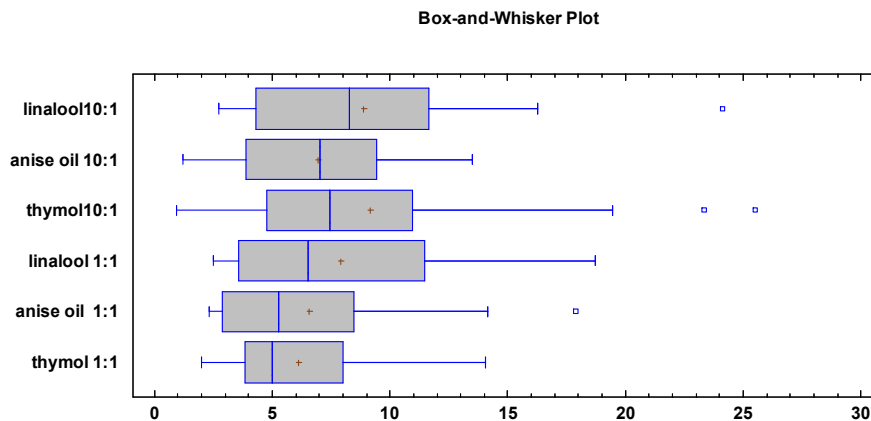
Σχήμα 5.2. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των τιμών ΔE στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C.

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) διαπιστώθηκε ότι η μεταβολή στο χρώμα στο σύστημα 10:1 στους 80 °C ήταν μικρότερη όταν προστέθηκε λιναλοόλη (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) χωρίς όμως να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την αντίστοιχη μεταβολή μετά την προσθήκη αιθέριου ελαίου γλυκάνισου ή θυμόλης. Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές ΔE (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) στο σύστημα 1:1 στους 80 °C, όπως υπολογίστηκαν για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους θέρμανσης για τις τρεις υπό εξέταση τερπενικές ενώσεις. Επίσης φαίνεται ότι η μεταβολή στο χρώμα ήταν σημαντικά μικρότερη όταν προστέθηκε θυμόλη.

5.1.2 Θερμική επεξεργασία στους 100 °C

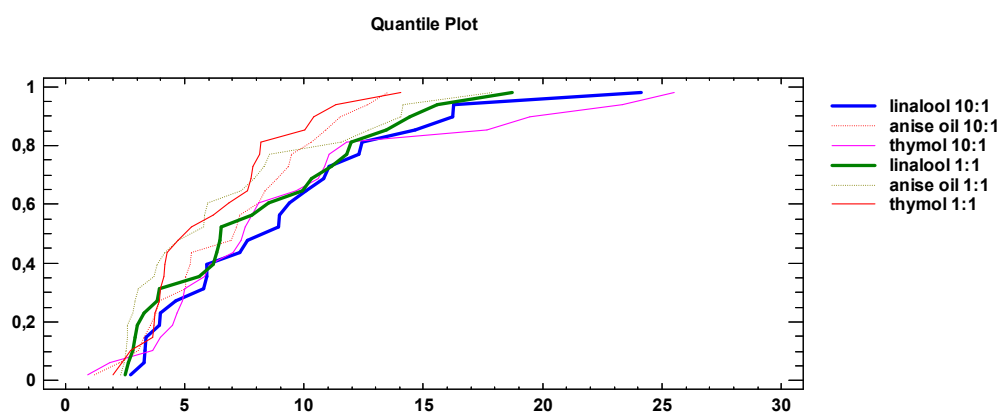
Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis (Σχήμα 5.3), δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ΔE και στα δύο συστήματα κατά τη θέρμανση στους 100 °C. Η διασπορά των τιμών ΔE στους 100° C είναι μεγαλύτερη από αυτήν στους 80° C. Η κατανομή στο σύστημα 10:1 στην λιναλοόλη (median=8,28%) και στην θυμόλη (median=7,45%) παρουσιάζει θετική ασυμμετρία, ενώ στο αιθέριο έλαιο του γλυκάνισου (median=

7,05%) η διάμεσος συμπίπτει με τον αριθμητικό μέσο. Το σύστημα 1:1 στους 100 °C παρατηρείται θετική ασυμμετρία στην κατανομή τιμών γύρω από τη διάμεσο σε όλες τις περιπτώσεις (median thymol = 5,75%, median linalool= 6,415%, median anise seed oil=4,45%). Επίσης το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της θυμόλης είναι μικρότερο από τα υπόλοιπα γεγονός που εξηγεί την μικρότερη μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις της τερπενικής αυτής ένωσης κατά το διάστημα των 3 h θέρμανσης στους 100 °C, στο σύστημα 1:1, ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται στην περίπτωση της λιναλοόλης στο ίδιο σύστημα. Τέλος οι τιμές 23,34% και 25,52% στην περίπτωση της θυμόλης και 24,13% στην λιναλοόλη στο 10:1 και η τιμή 17,89% του αιθερίου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου στο 1:1 θεωρούνται ακραίες ή έκτροπες και μπορεί να είναι λανθασμένες.



Σχήμα 5.3. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την διαφορά των τιμών ΔΕ στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C .Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα p -ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.4) επιβεβαιώνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίδραση των υπό μελέτη τερπενικών ενώσεων στην ανάσχεση του χρώματος και συνεπώς στον σχηματισμό προϊόντων πολυμερισμού. Το γεγονός επιβεβαιώνεται και από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.



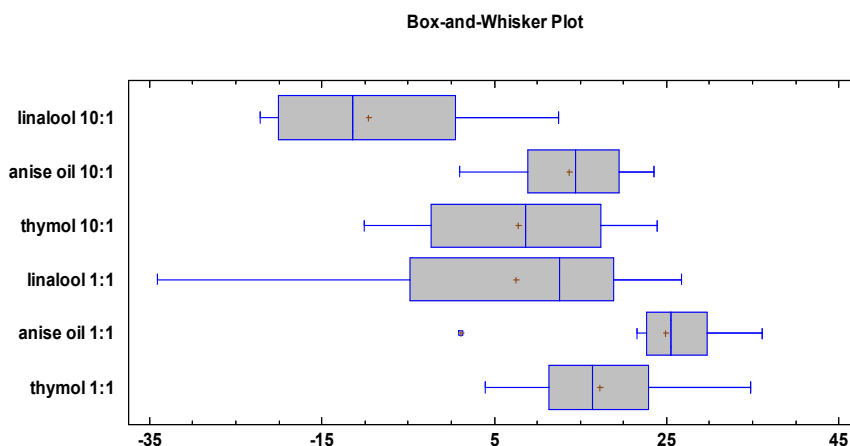
Σχήμα 5.4. p -ποσοστιαία σημεία (quantiles) σε αύξουσα διάταξη των τιμών ΔE στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C.

5.2 Επίδραση τερπενικών ενώσεων στο σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων

5.2.1 Θέρμανση στους 80 °C

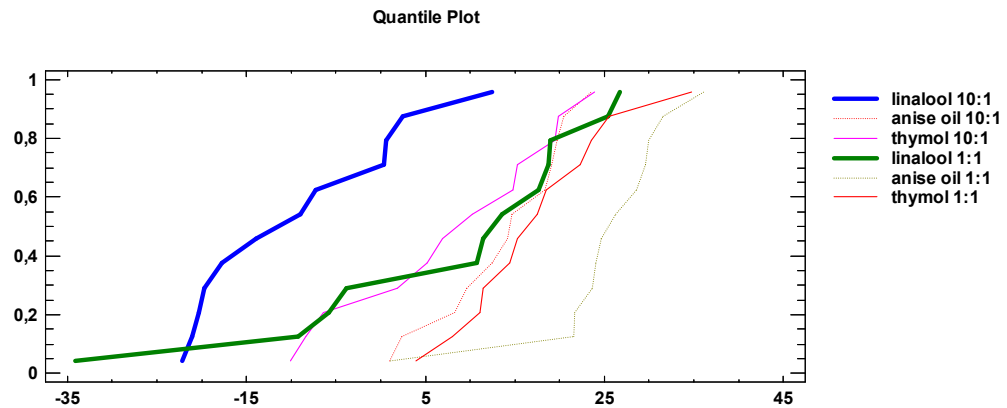
Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis (Σχήμα 5.5), παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ανάσχεσης του φθορισμού και στα δυο συστήματα (10:1 και 1:1) στους 80°C. Από το θηκόγραμμα, στο σύστημα 10:1 παρατηρείται θετική ασυμμετρία στην κατανομή τιμών γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της λιναλοόλης (median=-11,44%) και συμμετρία στην περίπτωση της θυμόλης (median=8,60%) και του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median=15,385%). Τα δεδομένα στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου έχουν την μικρότερη διασπορά σε σύγκριση με τις άλλες δύο τερπενικές ενώσεις και εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά τα διαστήματα 1,2 και 3 h θέρμανσης

στους 80 °C. Το ίδιο συμβαίνει και στο σύστημα 1:1 κατά την προσθήκη του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median = 25,455%). Οι τιμές της ανάσχεσης στην περίπτωση της θυμόλης (median = 16,41%) παρουσιάζουν συμμετρική κατανομή (γύρω από την διάμεσο) ενώ στη λιναλοόλη υπάρχει αρνητική ασυμμετρία (median =12,525%) και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα. Τέλος η τιμή 1,18% στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου στο σύστημα 1:1 θεωρείται ακραία τιμή και μπορεί να είναι λανθασμένη.



Σχήμα 5.5. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση του φθορισμού (%) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα p-ποσοστιαία σημεία (Σχήμα 5.6) ως μέτρα θέσης επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου και στα δυο συστήματα (10:1 και 1:1) σε όλες τις συγκεντρώσεις και καθ'όλη τη διάρκεια της θέρμανσης καθώς και η θυμόλη στο σύστημα 1:1 ανασχέουν τον σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων στους 80° C.



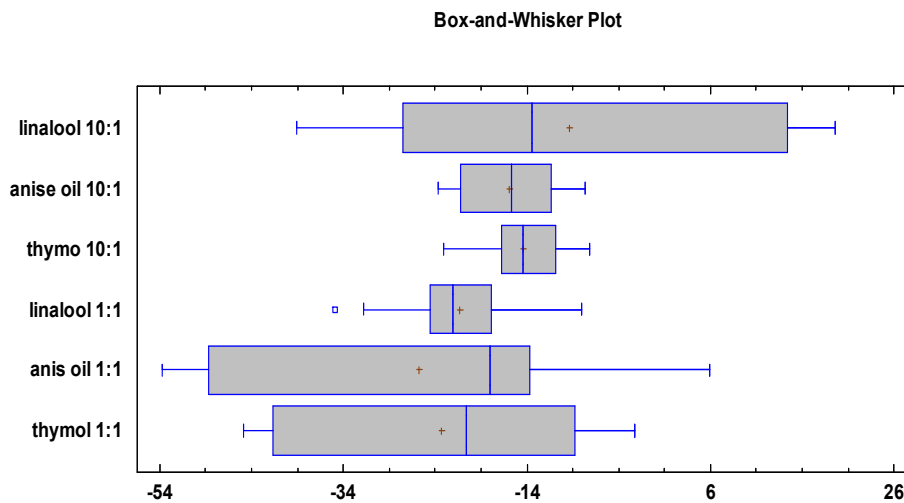
Σχήμα 5.6. *p*-ποσοστιαία σημεία (quantiles) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης του φθορισμού (%) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) διαπιστώθηκε ανάσχεση στο φθορισμό στο σύστημα 1:1 στους 80 °C όταν προστέθηκε αιθέριο έλαιο σπόρου γλυκάνισου (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την αντίστοιχη ανάσχεση μετά την προσθήκη θυμόλης. Οι τιμές ανάσχεσης από την προσθήκη λιναλοόλης διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και στα δυο συστήματα (10:1 και 1:1) από αυτές των λοιπών δύο υπό μελέτη τερπενικών ενώσεων.

5.2.2 Θέρμανση στους 100 °C

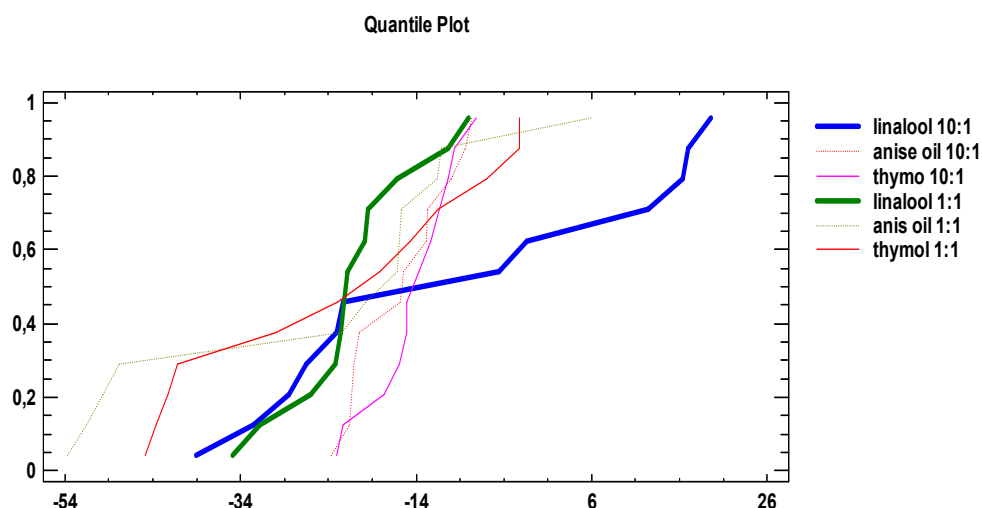
Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης, παρατηρήθηκε στατιστικώς μη σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ανάσχεσης του φθορισμού και στα δυο συστήματα 10:1 και 1:1 στους 100 °C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.7), στο σύστημα 10:1, παρατηρείται θετική ασυμμετρία στην κατανομή τιμών γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της λιναλοόλης (median= -13,405%) και συμμετρία στην περίπτωση της θυμόλης (median=-14,375%) και του αιθέριου ελαίου σπόρου γλυκάνισου (median=-15,64%). Αντίθετα στο σύστημα 1:1 οι τιμές ανάσχεσης από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου σπόρου γλυκάνισου (median = -17,975%) και θυμόλης (median = -20,535%) παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία ενώ οι τιμές ανάσχεσης από την προσθήκη

λιναλοόλης παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία (median = -22,01%). Η ανάσχεση στο φθορισμό που παρατηρείται στην περίπτωση της λιναλοόλης στο σύστημα 10:1 εμφανίζεται στην 1^η ώρα θέρμανσης, με μέγιστη τιμή ανάσχεσης 19,6% σε συγκέντρωση λιναλοόλης D. Σε όλες τις άλλες υπό μελέτη περιπτώσεις και στα δυο συστήματα στους 100 °C η παρουσία των τριών τερπενικών ενώσεων προώθησαν τον φθορισμό. Τέλος η τιμή -34,86% στην περίπτωση της λιναλοόλης στο σύστημα 1:1 θεωρείται ακραία τιμή και μπορεί να είναι λανθασμένη.



Σχήμα 5.7. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την διαφορά των τιμών φθορισμού στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα p-ποσοστιαία σημεία (Σχήμα 5.8) ως μέτρα θέσης επιβεβαιώνουν ότι η παρουσία των τριών τερπενικών ενώσεων και στα δυο συστήματα (10:1 και 1:1) στους 100 °C προώθησαν το φθορισμό.



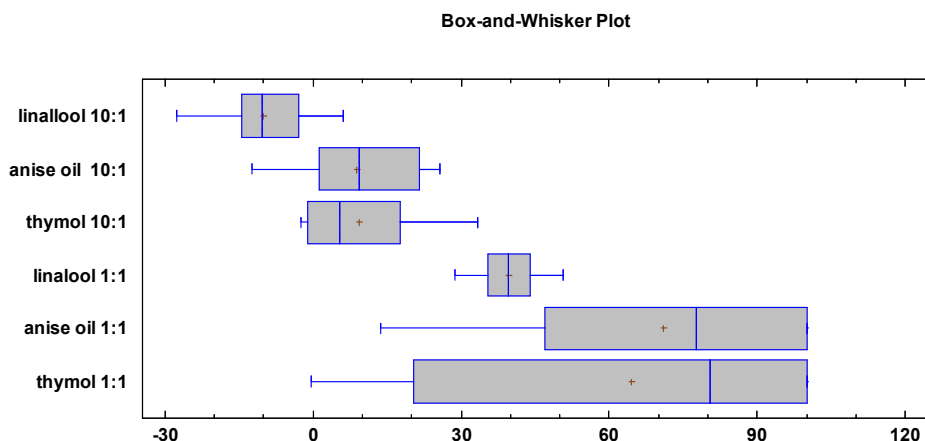
Σχήμα 5.8. *p*-ποσοστιαία σημεία (quantiles) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης του φθορισμού (%) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100° C

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) διαπιστώθηκε ότι στο σύστημα 10:1 στους 100 °C (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από την προσθήκη και των τριών τερπενικών ενώσεων.

5.3 Αξιολόγηση της εξέλιξης της αντίδρασης Maillard με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

5.3.1 Επίδραση στην εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR (μέτρηση απορρόφησης στα 280 nm)

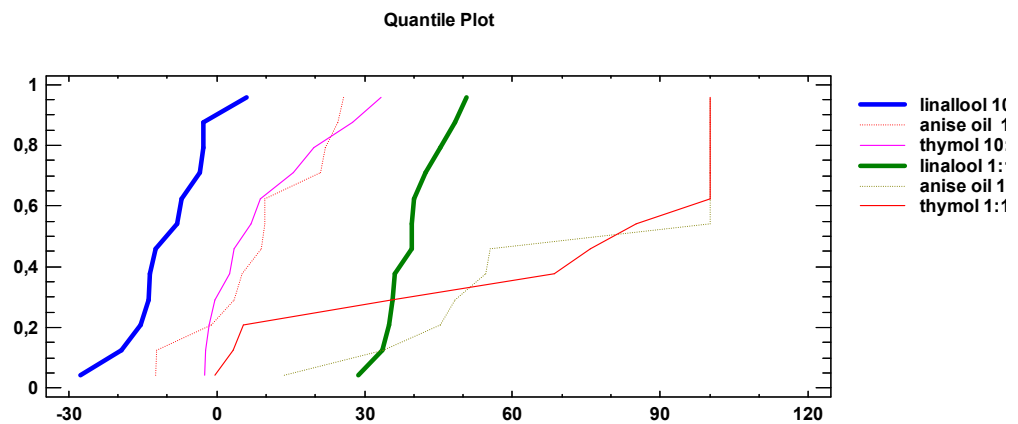
Ο σχηματισμός των αρχικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, της αντίδρασης Maillard, παρακολουθείτε με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm, ενώ τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τα επόμενα στάδια της αντίδρασης απορροφούν στα 360 nm. Τα τελευταία στάδια της αντίδρασης χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους, γνωστές ως μελανοϊδίνες, των οποίων το χρωμοφόρο τμήμα παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 420 nm (Morales and Jimenez-Perez, 2004).



Σχήμα 5.9. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (280 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διαμέσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR στο σύστημα 10:1 και 1:1 στους 80° C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.9) στο σύστημα 10:1, παρατηρείται θετική ασυμμετρία στην κατανομή των τιμών γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της θυμόλης (median=5,35%) και συμμετρική κατανομή στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median=9,35%) και της λιναλοόλης (median=-10,25%). Τα δεδομένα στο σύστημα 1:1 παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία στην περίπτωση της θυμόλης (median =80,5%) και του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median =77,7%). Η λιναλοόλη (median=39,6%) παρουσιάζει συμμετρική κατανομή (γύρω από την διάμεσο) που έχει την μικρότερη διασπορά σε σύγκριση με τις άλλες δυο τερπενικές ενώσεις γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά τα διαστήματα 1,2 και 3 h θέρμανσης στους 80 °C. Στο σύστημα 1:1 φαίνεται ότι το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρεμπόδισαν** την εξέλιξη του αρχικού σταδίου έως και 100% κατά τις πρώτες 2 ώρες θέρμανσης στους 80 °C. Η ανάσχεση και των δύο διέφερε στατιστικά σημαντικά από

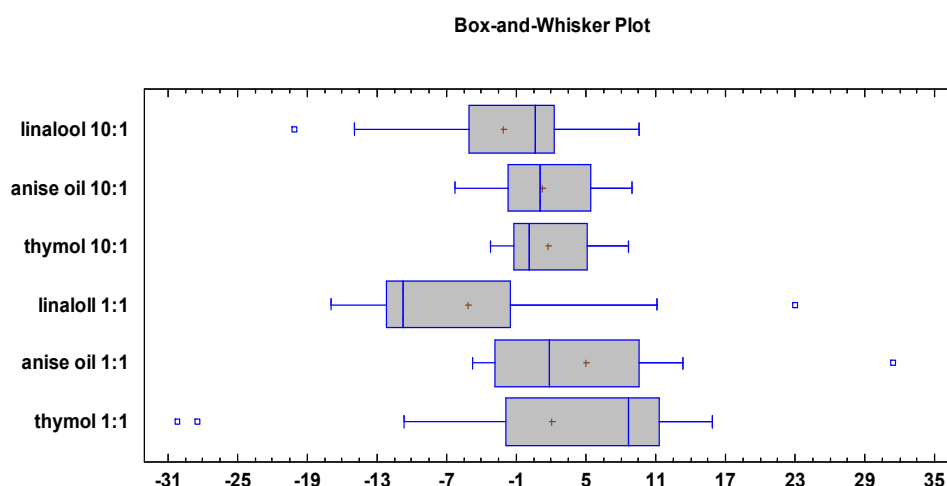
αυτή της λιναλοόλης. Αντίθετα στο σύστημα 10:1 η επίδραση των υπό μελέτη συστατικών στο σχηματισμό των αρχικών προϊόντων της αντίδρασης ήταν μικρή χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, παρ'ότι όπως φαίνεται και από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.9) το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρενέβησαν αποτελεσματικότερα συγκριτικά με τη λιναλοόλη.



Σχήμα 5.10. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (280 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C

Τα *p*-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.10) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του **αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρεμπόδισαν** την εξέλιξη του αρχικού σταδίου στο σύστημα 1:1 σε όλες τις συγκεντρώσεις και καθ'όλη τη διάρκεια της θέρμανσης (**τιμές από τους πίνακες ανάσχεσης στα 280nm**).

Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) στο σύστημα 10:1 στους 80° C (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR. Αντίθετα στο σύστημα 1:1 διαπιστώθηκε ότι η ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR από την προσθήκη **αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου και θυμόλης** διέφερε στατιστικά σημαντικά από αυτήν μετά την προσθήκη λιναλοόλης.

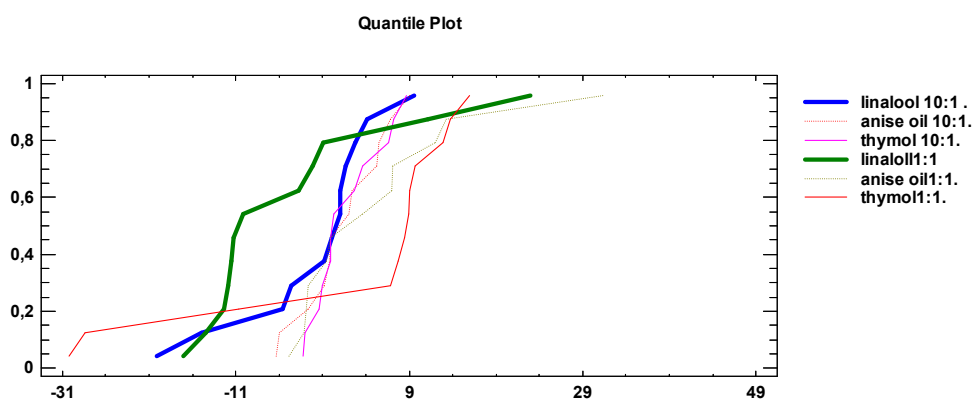


Σχήμα 5.11. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (280 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Με τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, διαπιστώθηκε **στατιστικώς μη σημαντική διαφορά (p =0.052)** μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR στο σύστημα 10:1 και 1:1 στους 100 °C. Το γεγονός επιβεβαιώνεται και από τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.11), στο σύστημα 10:1, παρατηρείται θετική ασυμμετρία στην κατανομή τιμών γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της θυμόλης και του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median=0,15% και 1,0%) και αρνητική ασυμμετρία στην περίπτωση της λιναλοόλης (median=0,6%). Ενώ η κατανομή στο σύστημα 1:1 στην λιναλοόλη (median=-10,75%) και στο αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου (median = 1,8%) παρουσιάζει θετική ασυμμετρία ενώ στην περίπτωση της θυμόλης οι τιμές ανάσχεσης της δημιουργίας προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία (median =8,7%). Επίσης, τα ύψη των ορθογωνίων στο σύστημα 10:1 είναι μικρότερα σε σύγκριση με αυτά στο σύστημα 1:1 γεγονός που εξηγεί τη μικρή μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις των

τερπενικών ενώσεων κατά τα διαστήματα 1,2 και 3 h θέρμανσης στους 100 °C στο σύστημα 10:1. Τέλος, η τιμή -20,1% (10:1) στην περίπτωση της λιναλοόλης καθώς οι -23,0% (λιναλοόλη), 31,4% (αιθέριο έλαιο σπόρου γλυκάνισου), -30,2% και -28,4% (θυμόλη 1:1) θεωρούνται ακραίες ή έκτροπες και μπορεί να είναι λανθασμένες.

Συνολικά παρατηρείται πολύ μικρή επίδραση στην ανάσχεση σχηματισμού των αρχικών άχρωμων προϊόντων της MR από τις υπό μελέτη τερπενικές ενώσεις κατά τη θέρμανση στους 100 °C. Όπως προκύπτει από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.11), το 50% των τιμών ανάσχεσης της απορρόφησης στα 280nm στο σύστημα 1:1 για το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου (μέγιστη ανάσχεση 31,4% 1h, D) και τη θυμόλη (μέγιστη ανάσχεση 15.9% 3h, D) είναι στον θετικό άξονα των τιμών ενώ της λιναλοόλης στον αρνητικό. Η επίδραση των υπό μελέτη τερπενικών ενώσεων στο σύστημα 10:1 ήταν μικρή και η μέγιστη ανάσχεση παρατηρήθηκε από το αιθέριο έλαιο γλυκάνισου (συγκέντρωση C, 3h, 9%) και από τη θυμόλη (συγκέντρωση D, 3h, 8,7%).



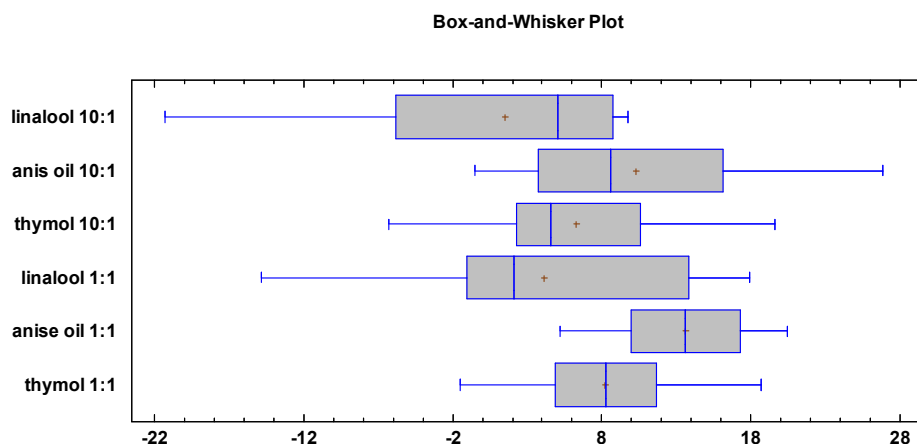
Σχήμα 5.12. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR (280 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C.

Τα *p*-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.12) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του **αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρενέβησαν αποτελεσματικότερα στην εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR, κατά τη θέρμανση στους 100 °C, στο σύστημα 1:1.**

5.3.2 Επίδραση στην εξέλιξη του ενδιάμεσου σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 360 nm)

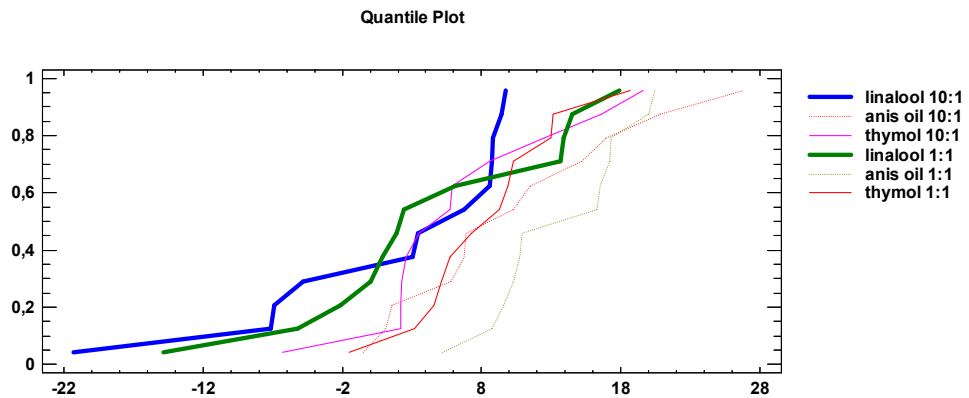
Με τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR στα συστήματα 10:1 και 1:1 στους 80 °C. Πιο συγκεκριμένα, από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.13), στο σύστημα 1:1 το 50% των παρατηρήσεων τόσο για το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου** όσο και τη θυμόλη είναι σε ποσοστά μεγαλύτερα από 13,6% (median) και 8,3% (median), αντίστοιχα. Στη λιναλοόλη στο ίδιο σύστημα το 50% των παρατηρήσεων είναι αρκετά συμπιεσμένο κάτω από το 2,15% (median, θετική ασυμμετρία) ενώ μη αναμενόμενα ο κάτω μύστακας είναι μεγαλύτερος από τον πάνω.

Στο σύστημα 10:1, στους 80 °C, η παρουσία των υπό μελέτη τερπενικών ενώσεων είχε σαν αποτέλεσμα χαμηλότερο ποσοστό ανάσχεσης της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR. Και πάλι το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου** φαίνεται να είναι περισσότερο δραστικό, με το 50% των παρατηρήσεων να δίνουν ανάσχεση πάνω από 8,6% (median) ενώ για τη λιναλοόλη και τη θυμόλη τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 5,05% και 4,6%. Το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου** είναι στατιστικά σημαντικά περισσότερο δραστικό στην ανάσχεση της δημιουργίας προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR από τη λιναλοόλη (Fischer LSD) σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% και στα δύο συστήματα (10:1 και 1:1) στους 80 °C.



Σχήμα 5.13. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση (%) της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (360 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα p-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.14) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του **αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου** σε όλες τις συγκεντρώσεις και καθ' όλη τη διάρκεια της θέρμανσης στους 80 °C και στα δυο συστήματα παρενέβει αποτελεσματικότερα στην εξέλιξη του ενδιάμεσου σταδίου της MR.

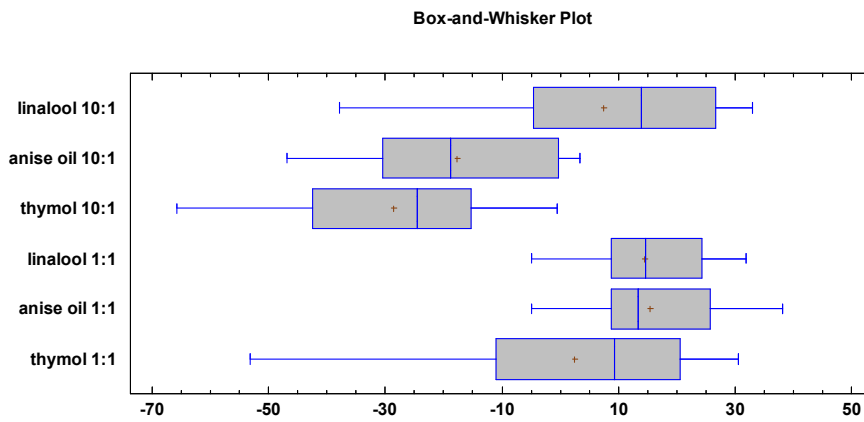


Σχήμα 5.14. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης (%) της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (360 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C.

Με τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ανάσχεσης (%) της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR στο σύστημα 10:1 και στατιστικώς μη σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) στο σύστημα 1:1 στους 100 °C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.15), στο σύστημα 10:1, παρατηρείται αρνητική ασυμμετρία των τιμών ανάσχεσης στην περίπτωση της λιναλοόλης (median=13,85%) και της θυμόλης (median=-24,55%) και θετική ασυμμετρία στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου (median=-18,75%). Στο σύστημα 1:1 οι τιμές παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία στην περίπτωση της προσθήκης αιθέριου ελαίου σπόρου γλυκάνισου (median=13,35%) και αρνητική ασυμμετρία στην περίπτωση προσθήκης θυμόλης (median=9,3%) και λιναλοόλης (median=14,7%).

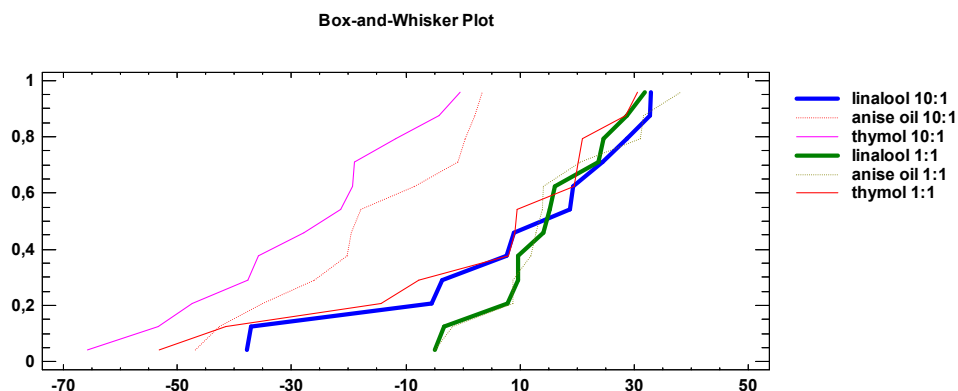
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) διαπιστώθηκε ότι το αιθέριο έλαιο γλυκάνισου (median=-18,75%) και η θυμόλη (median=-24,55%) στο σύστημα **10:1** προώθησαν την δημιουργία των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR, ενώ η **λιναλοόλη** στο ίδιο σύστημα έδρασε παρεμποδιστικά (median=13,85) με στατιστική διαφορά. Και οι τρεις υπό εξέταση τερπενικές ενώσεις στο σύστημα 1:1 στους 100 °C παρεμπόδισαν τη δημιουργία των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR **με μέγιστο ποσοστό ανάσχεσης για τη**

λιναλοόλη 31,9% (συγκέντρωση D, 3h), **το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου 38,2%** (συγκέντρωση D, 2h) **και τη θυμόλη 30,6%** (συγκέντρωση D, 2h).



Σχήμα 5.15. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση (%) της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (360 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα p-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.16) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση του **αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου** και της θυμόλης στο σύστημα 10:1, προώθησαν την δημιουργία των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR.



Σχήμα 5.16. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης (%) της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR (360 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C.

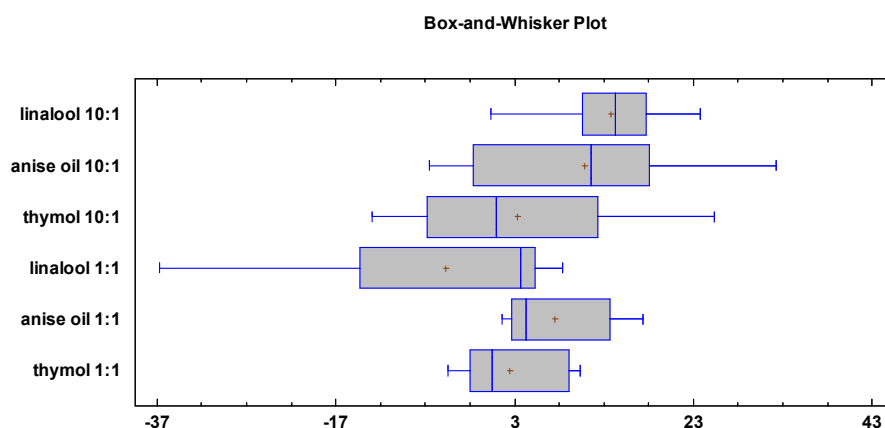
5.3.3 Επίδραση στην εξέλιξη του τελικού σταδίου της MR (μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm)

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της απορρόφησης στα 420 nm στο σύστημα 10:1 και στατιστικώς μη σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) στο σύστημα 1:1 στους 80 °C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.17) παρατηρείται στο σύστημα 10:1 αρνητική ασυμμετρία γύρω από τη διάμεσο στην περίπτωση της λιναλοόλης (median= 14,25) και του αιθέριου ελαίου του γλυκάνισου (median=11,55) και θετική ασυμμετρία στην περίπτωση της θυμόλης (median=0,95). Τα δεδομένα στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου έχουν την μικρότερη διασπορά σε σύγκριση με τις άλλες δύο τερπενικές ενώσεις και εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά τα διαστήματα 1,2 και 3 h στους 80 °C.

Θετική ασυμμετρία των τιμών παρατηρείται στο σύστημα 1:1 όταν χρησιμοποιείται αιθέριο έλαιο σπόρου γλυκάνισου (median=4,25) και θυμόλης (median=0,5) ενώ οι τιμές στην περίπτωση της λιναλοόλης (median=3,65) παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία.

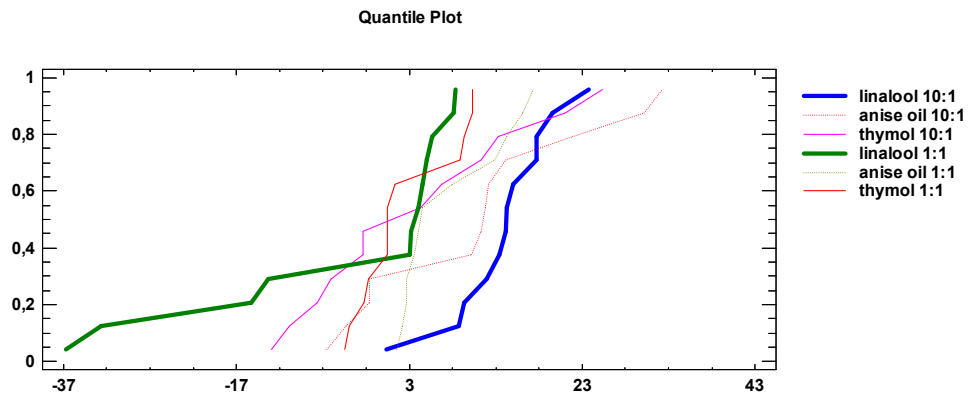
Παρατηρείται ότι η παρουσία τερπενικών ενώσεων παρεμπόδιζε το σχηματισμό των τελικών προϊόντων της αντίδρασης περισσότερο αποτελεσματικά **στο σύστημα 10:1**

στους 80 °C με μέγιστο ποσοστό ανάσχεσης για τη λιναλοόλη 23,7% (συγκέντρωση B, 1h), το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου 32,3% (συγκέντρωση D, 3h) και τη θυμόλη 25,4% (συγκέντρωση D, 3h).



Σχήμα 5.17. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση (%) της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (420 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

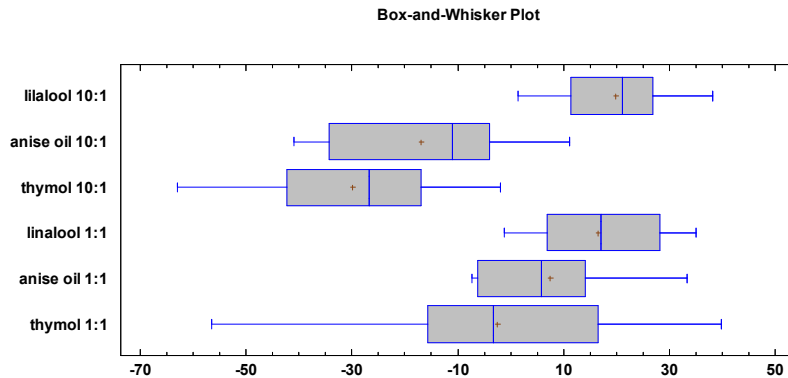
Τα p-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.18) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση των υπό εξέταση τερπενικών ενώσεων παρεμπόδισαν αποτελεσματικότερα τη δημιουργία των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR στο σύστημα 10:1.



Σχήμα 5.18. *p*-ποσοστιαία σημεία (*quantiles*) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης (%) της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (420 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 80 °C.

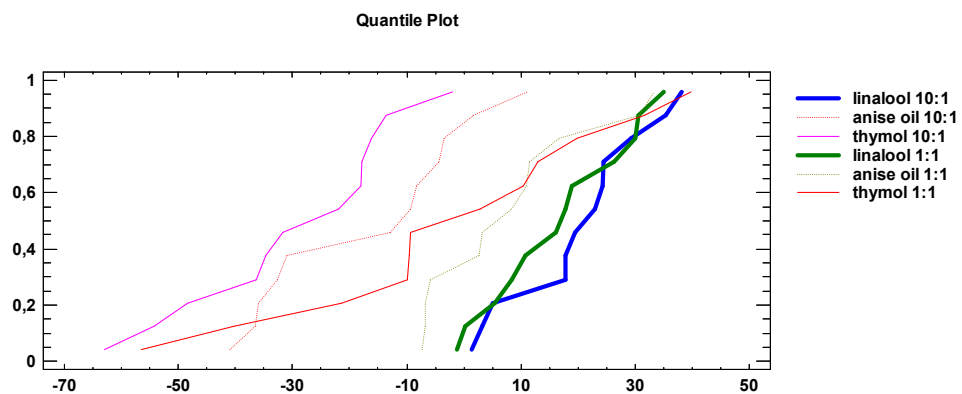
Εφαρμόζοντας τον έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων (Fischer LSD) διαπιστώθηκε ότι οι τιμές ανάσχεσης στην περίπτωση της λιναλοόλης και του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου στο σύστημα 1:1 διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p > 0,05$) ενώ στο σύστημα 10:1 υπάρχει στατικά σημαντική διάφορα στις τιμές ανάσχεσης που λήφθηκαν από τη χρήση λιναλοόλης και θυμόλης.

Πραγματοποιώντας ανάλυση της διακύμανσης μέσω του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των διάμεσων τιμών της ανάσχεσης (%) στα 420 nm στο σύστημα 10:1 και στατιστικώς μη σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) στο σύστημα 1:1 στους 100 °C. Από το θηκόγραμμα (Σχήμα 5.19), στο σύστημα 10:1, παρατηρείται αρνητική ασυμμετρία γύρω από τη διάμεσο σε όλες τις περιπτώσεις: λιναλοόλη (median=21,2%), αιθέριο έλαιο σπόρου γλυκάνισου (median=-11,1%) και θυμόλη (median=-26,8%). Θετική ασυμμετρία των διάμεσων τιμών της ανάσχεσης (%) παρατηρείται στο σύστημα 1:1 για το αιθέριο έλαιο σπόρου γλυκάνισου (median=5,8%) και την θυμόλη (median=-3,2%) και συμμετρική κατανομή των τιμών για τη λιναλοόλη (median=17,05%). **Και στα δύο συστήματα** στους 100 °C η προσθήκη **λιναλοόλης** ήταν περισσότερο αποτελεσματική στην ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR, με μέγιστο ποσοστό ανάσχεσης στο σύστημα 10:1 38,1% (συγκέντρωση D, 3h) και στο σύστημα 1:1, 35,0% (συγκέντρωση D, 3h).



Σχήμα 5.19. Θηκόγραμμα (Box-and-Whisker plot) που αναπαριστά την ανάσχεση (%) της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (420 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C, από την παρουσία τερπενικών ενώσεων. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο.

Τα ρ-ποσοστιαία σημεία ως μέτρα θέσης (Σχήμα 5.20) επιβεβαιώνουν ότι η χρήση της λιναλοόλης και στα δύο συστήματα παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα τη δημιουργία των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR στους 100 °C.



Σχήμα 5.20. ρ-ποσοστιαία σημεία (quantiles) σε αύξουσα διάταξη των παρατηρήσεων της ανάσχεσης (%) της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR (420 nm) στο σύστημα 10:1 και 1:1, στους 100 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Συζήτηση

Η αντίδραση Maillard είναι σίγουρα η πιο κοινή αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του τρόπου δράσης τερπενικών ενώσεων στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Οι παράμετροι που επηρεάζουν το ρυθμό της αντίδρασης είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, το pH, η ενεργότητα του νερού καθώς και η παρουσία ενώσεων που δρουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μέσω μηχανισμών δέσμευσης ελεύθερων ριζών ή με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής κατάστασης (Brady, 2013; Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos, 2012; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2015). Η μελέτη τερπενικών ενώσεων όπως της θυμόλης, της λιναλοόλης και του αιθέριου έλαιου του γλυκάνισου στηρίχθηκε στην ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικές ενώσεις μέσω του μηχανισμού που αναφέρθηκε (Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos, 2012).

Η προσθήκη των υπό εξέταση τερπενικών ενώσεων σε συστήματα γλυκόζης/λυσίνης με διαφορετική μοριακή αναλογία καθώς και η ένταση της θερμικής επεξεργασίας στην οποία υποβλήθηκε το κάθε σύστημα επηρέασε την εξέλιξη της αντίδρασης MR. Ωστόσο η μεταβολή στο χρώμα, η οποία εκφράστηκε ως ΔΕ φαίνεται να επηρεάστηκε περισσότερο από τη θερμοκρασία και όχι από τη μοριακή αναλογία των αντιδρώντων. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε θετική μεταβολή στη μέτρηση του χρώματος. Η παρουσία της θυμόλης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και καθ' όλη τη διάρκεια της θέρμανσης στο σύστημα 1:1 επέφερε την μικρότερη μεταβολή στο χρώμα στους 80 °C, ενώ και οι τρεις τερπενικές ενώσεις φαίνεται ότι προώθησαν τη μεταβολή του χρώματος και των δύο συστημάτων στους 100 °C.

Όσο αφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας φθοριζουσών προϊόντων, μιας ιδιότητας που σχετίζεται με τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs), τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι αυτή επηρεάστηκε από την μοριακή αναλογία των αντιδρώντων, όσο και από τη χημική δομή της τερπενικής ένωσης που χρησιμοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα η προσθήκη λιναλοόλης συνδέεται με περιορισμένη δράση στην ανάσχεση της δημιουργίας των AGEs και στα δύο συστήματα. Στη θερμική επεξεργασία των

80 °C η παρουσία του αιθέριου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές ανάσχεσης στο φθορισμό και στα δύο συστήματα. Η προσθήκη θυμόλης παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα το σχηματισμό των AGEs στο σύστημα με μοριακή αναλογία 1:1 στους 80 °C. Οι παρατηρούμενες διαφορές στον τρόπο που παρεμβαίνουν τα αιθέρια έλαια στην αντίδραση MR μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορά στη δομή τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μεταξύ των τερπενικών ενώσεων (Ruberto and Baratta, 2000) οι φαινολικές ενώσεις θυμόλη και καρβακρόλη χαρακτηρίζονται από την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ακολουθούμενες από μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες όπως το τερπινολένιο και το γ-τερπινένιο τα οποία διαθέτουν μια ενεργή μεθυλενομάδα. Η ανηθόλη και η εστραγόλη, τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του σπόρου γλυκάνισου διαθέτουν 2 και 1 μεθυλενομάδες αντίστοιχα και πιθανώς να είναι υπεύθυνες για την παρατηρούμενη ανάσχεση. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι σε πειράματα η εστραγόλη ανάσχεσε τη δημιουργία των πρωτογενών προϊόντων λιποξειδωσης ενώ η λιναλοόλη, μια τριτοταγής αλκοόλη, είχε προοξειδωτική συμπεριφορά. Κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100 °C και οι τρεις υπό εξέταση τερπενικές ενώσεις προώθησαν τη δημιουργία των AGEs και στα δυο συστήματα.

Κατά τη μελέτη της ανάσχεσης των αρχικών προϊόντων της MR παρατηρήθηκε η ίδια συμπεριφορά με την ανάσχεση στο σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων. Όπως και προηγούμενα στο σύστημα 1:1 το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρεμπόδισαν** την εξέλιξη του αρχικού σταδίου έως και 100% κατά τις πρώτες 2 ώρες θέρμανσης στους 80 °C. Η ανάσχεση και των δύο διέφερε στατιστικά σημαντικά από αυτήν της λιναλοόλης. Αντίθετα στο σύστημα 10:1 η επίδραση των υπό μελέτη συστατικών στο σχηματισμό των αρχικών προϊόντων της αντίδρασης ήταν μικρή χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, παρότι όπως παρατηρήθηκε το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρενέβησαν αποτελεσματικότερα συγκριτικά με τη λιναλοόλη. Από τα προηγούμενα είναι πιθανό η θυμόλη, η ανηθόλη και η εστραγόλη να παρεμβαίνουν στα αρχικά στάδια της αντίδρασης MR γεγονός που εξηγεί και την παρατηρούμενη ανάσχεση της δημιουργίας φθοριζουσών ενώσεων. Παρ'όλα αυτά οι Chawla & Sahu, (2007) παρατήρησαν ότι η παρουσία ανηθόλης και θυμόλης, τα κύρια συστατικά του γλυκού κύμινου (όταν προστέθηκαν σε ισομοριακό σύστημα γλυκόζης-γλυκίνης υπό βρασμό:reflux), έδρασαν καταλυτικά στις αντιδράσεις του αρχικού σταδίου

της MR, προωθώντας την αμαύρωση. Οι τιμές ανάσχεσης της δημιουργίας των αρχικών άχρωμων προϊόντων της MR από τις υπό μελέτη τερπενικές ενώσεις κατά τη θέρμανση στους 100 °C ήταν χαμηλότερες στο σύστημα 10:1 από το 1:1.

Το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν και καθ' όλη τη διάρκεια της θέρμανσης στους 80 °C και στα δυο συστήματα παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα στην εξέλιξη των αντιδράσεων του ενδιάμεσου σταδίου της MR συγκριτικά με τη λιναλοόλη και τη θυμόλη. Κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100 °C και οι τρεις υπό εξέταση τερπενικές ενώσεις προώθησαν τη δημιουργία των AGEs και στα δυο συστήματα.

Κατά τη μελέτη της ανάσχεσης των τελικών προϊόντων της MR παρατηρήθηκε ότι η παρουσία τερπενικών ενώσεων έδρασε αποτελεσματικότερα **στο σύστημα 10:1 στους 80 °C με μέγιστο ποσοστό ανάσχεσης για τη λιναλοόλη 23,7%** (συγκέντρωση B, 1h), **το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου 32,3%** (συγκέντρωση D, 3h) **και τη θυμόλη 25,4%** (συγκέντρωση D, 3h). Ενώ κατά τη θερμική επεξεργασία στους 100 °C και **στα δύο συστήματα** η προσθήκη **λιναλοόλης** ήταν περισσότερο αποτελεσματική με μέγιστο ποσοστό ανάσχεσης στο σύστημα 10:1 38,1% (συγκέντρωση D, 3h) και στο σύστημα 1:1, 35,0% (συγκέντρωση D, 3h).

6.2 Συμπεράσματα

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής είναι η μελέτη της επίδρασης τερπενικών ενώσεων στη γλυκίωση της λυσίνης και στο σχηματισμό των AGEs. Επιλέχθηκαν να μελετηθούν δύο μονοτερπενικές ενώσεις, η λιναλοόλη και η θυμόλη καθώς και το αιθέριο έλαιο του σπόρου του γλυκάνισου αποτελούμενο κυρίως από ανηθόλη σε ποσοστό 80-90% και μικρά ποσοστά εστραγόλης (ισομερές της ανηθόλης).

Η μελέτη κατέληξε στα εξής:

- Η ένταση της θερμικής επεξεργασίας επηρεάζει τη δράση των τερπενικών ενώσεων στις αντιδράσεις MR καθώς στη θερμοκρασία των 100° C παρατηρήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις προ οξειδωτική δράση.

- Η ανάσχεση των αντιδράσεων MR από τις υπό μελέτη τερπενικές ενώσεις παρατηρήθηκε στη θερμική επεξεργασία των 80 °C.
- Από τις υπό μελέτη τερπενικές ενώσεις η θυμόλη και το αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ανάσχεση των MR και στη δημιουργία των AGEs συγκριτικά με τη λιναλοόλη.
- Οι τερπενικές ενώσεις παρεμπόδισαν αποτελεσματικότερα την εξέλιξη των MR στο ισομοριακό σύστημα γλυκόζης/λυσίνης.
- Στο ισομοριακό μίγμα γλυκόζης/λυσίνης το **αιθέριο έλαιο του σπόρου γλυκάνισου και η θυμόλη παρεμπόδισαν** την εξέλιξη του αρχικού σταδίου της MR έως και 100% κατά τις πρώτες 2 ώρες θέρμανσης στους 80 °C.
- Η παρουσία τερπενικών ενώσεων ανάσχεσε αποτελεσματικότερα τη δημιουργία των τελικών προϊόντων της MR **στο σύστημα 10:1 στους 80 °C.**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baser, K.H.C & Demirci, F. (2007). In: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, R.G. Berger (Ed.), Springer, Berlin, 43-86.
- Brady, J.W., 2013. *Introductory food chemistry*. Comstock Pub. Associates, Ithaca.
- Chawla, H. M., & Sahu, S. N. (2007). Effect of spice essential oils on Maillard browning model reaction of glucose and glycine: an UV-visible and reverse phase HPLC analysis. *Journal of Food Science and Technology-Mysore-*, 44(6), 602.
- Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2016). Kinetics of color development in glucose/Amino Acid model systems at different temperatures. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 15-21.
- Fang, H., Wang, L., Zhang, S., Liu, H., & Li, J. (2014). Advanced glycation end products (AGEs) formation in high protein foods processing model system. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 14(2), 28-34.
- Figura & Teixeira, (2007). Book. *Food physics: Physical properties - Measurement and applications*, DOI: 10.1007/978-3-540-34194-9
- Gilchrist, A., & Nobbs, J. (1999). Colorimetry, theory. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, 337-343.
- Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B. S., Uribarri, J., & Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(8), 1287-1291.
- Gonzalez-Burgos, E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current medicinal chemistry*, 19(31), 5319-5341. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>
- Grassmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones*, 72, 505-535.

Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2005). Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), 319-326. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.039>.

Ho, S. C., Chang, P. W., Tong, H. T., & Yu, P. Y. (2014). Inhibition of fluorescent advanced glycation end-products and N-carboxymethyllysine formation by several floral herbal infusions. *International Journal of Food Properties*, 17(3), 617-628.

Joglekar, M. M., Panaskar, S. N., Chougale, A. D., Kulkarni, M. J., & Arvindekar, A. U. (2013). A novel mechanism for antiglycative action of limonene through stabilization of protein conformation. *Molecular BioSystems*, 9(10), 2463-2472.

Khan, M., Liu, H., Wang, J., & Sun, B. (2020). Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, 130, 108933.

Kutlu, T. (2016). Dietary glycotoxins and infant formulas. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*, 51(4), 179.

Lin, J. A., Wu, C. H., & Yen, G. C. (2018). Perspective of advanced glycation end products on human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(9), 2065-2070.

Martins, S. I., Jongen, W. M., & Van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in food science & technology*, 11(9-10), 364-373.

Milkovska-Stamenova, S., Schmidt, R., Frolov, A., & Birkemeyer, C. (2015). GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(25), 5911-5919.

Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2004). Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *European Food Research and Technology*, 218(6), 515-520.

More, T. A., Kulkarni, B. R., Nalawade, M. L., & Arvindekar, A. U. (2014). Antidiabetic activity of linalool and limonene in streptozotocin-induced diabetic rat: a combinatorial therapy approach. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(8), 159-63.

Navarro, M., & Morales, F. J. (2015). Mechanism of reactive carbonyl species trapping by hydroxytyrosol under simulated physiological conditions. *Food chemistry*, 175, 92-99.

Nguyen, H. T., Van der Fels-Klerx, H. J., & Van Boekel, M. A. J. S. (2014). N ϵ -(carboxymethyl) lysine: a review on analytical methods, formation, and occurrence in processed food, and health impact. *Food Reviews International*, 30(1), 36-52.

Nie, S., Huang, J., Hu, J., Zhang, Y., Wang, S., Li, C., ... & Xie, M. (2013). Effect of pH, temperature and heating time on the formation of furan in sugar-glycine model systems. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 87-92.

Nowotny, K., Schröter, D., Schreiner, M., & Grune, T. (2018). Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing research reviews*, 47, 55-66.

O'Brien, J., Morrissey, P. A., & Ames, J. M. (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 28(3), 211-248.

Ottum, M. S., & Mistry, A. M. (2015). Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 57(1), 1-12.

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology*, 6, 76.

Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69(2), 167-174.

Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2015). Prevention of protein glycation by natural compounds. *Molecules*, 20(2), 3309-3334.

Silván, J. M., Assar, S. H., Srey, C., Del Castillo, M. D., & Ames, J. M. (2011). Control of the Maillard reaction by ferulic acid. *Food chemistry*, 128(1), 208-213.

Silván, J. M., van de Lagemaat, J., Olano, A., & Del Castillo, M. D. (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1543-1551.

Stavropoulou, M. (2020). Study of the formation of non-enzymatic Advanced glycation end-products (dAGEs) in food systems. *Postgraduate study, School of Food and Nutritional Sciences, Agricultural University of Athens*.

Thornalley, P. J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 419(1), 31-40.

Troise, A. D. (2019). Maillard reaction and food safety, in: Pasquale Ferranti, Elliot M. Berry, Jock R. Anderson (Ed.), *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Elsevier, pp 364-369.

Troise, A. D. (2018). Analytical strategies to depict the fate of the Maillard reaction in foods. *Current opinion in food science*, 19, 15-22.

Uribarri, J., del Castillo, M. D., de la Maza, M. P., Filip, R., Gugliucci, A., Luevano-Contreras, C., ... & Garay-Sevilla, M. E. (2015). Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Advances in nutrition*, 6(4), 461-473.

Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., ... & Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916.

Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., & Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*, 47(sup1), 3-27.

Wang, Y., Liu, H., Zhang, D., Liu, J., Wang, J., Wang, S., & Sun, B. (2019). Baijiu vinasse extract scavenges glyoxal and inhibits the formation of Nε-carboxymethyllysine in dairy food. *Molecules*, 24(8), 1526.

Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food chemistry*, 128(3), 573-584.

Wei, Q., Liu, T., & Sun, D. W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 32-45.

Zhu, Y., Lan, F., Wei, J., Chong, B., Chen, P., Huynh, L., ... & Liu, Y. (2011). Influence of dietary advanced glycation end products on wound healing in nondiabetic mice. *Journal of food science*, 76(1), T5-T10.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Μεταβολή του χρώματος (ΔΕ)

Πίνακας 5.2: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την ΔΕ σημαντική διάφορα ($p < 0,05$) των μέσων τιμών στα συστήματα 10:1 και 1:1 θερμαίνοντας στους 80 °C.

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 10:1 | 30 | 2,40767 | X |
| Thymol 10:1 | 30 | 2,997 | XX |
| Anis oil 10:1 | 30 | 3,35833 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 1:1 | 30 | 1,757 | X |
| Linalool 1:1 | 30 | 2,42133 | X |
| Anise oil 1:1 | 30 | 2,805 | X |

Πίνακας 5.4: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την ΔΕ σημαντική διάφορα ($p < 0,05$) των μέσων τιμών στα συστήματα 10:1 και 1:1 θερμαίνοντας στους 100 °C.

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Anise oil 10:1 | 24 | 6,92167 | X |
| Linalool 10:1 | 24 | 8,87917 | X |
| Thymol 10:1 | 24 | 9,13417 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 1:1 | 24 | 6,13083 | X |
| Anise oil 1:1 | 24 | 6,58042 | X |
| Linalool 1:1 | 24 | 7,90958 | X |

Φθορισμός

Πίνακας 5.6: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή φθορισμού στα συστήματα 10:1 και 1:1 θερμαίνοντας στους 80 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 10:1 | 12 | -9,5775 | X |
| Thymol 10:1 | 12 | 7,72917 | X |
| Anise oil 10:1 | 12 | 13,6325 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 1:1 | 12 | 7,53917 | X |
| Thymol 1:1 | 12 | 17,205 | XX |
| Anise oil 1:1 | 12 | 24,8883 | X |

Πίνακας 5.8: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή φθορισμού στα συστήματα 10:1 και 1:1 θερμαίνοντας στους 100 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| anise oil 10:1 | 12 | -15,9033 | X |
| thymo 10:1 | 12 | -14,4642 | X |
| linalool 10:1 | 12 | -9,37583 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|--------------|--------------|-------------|---------------------------|
| anis oil 1:1 | 12 | -25,7917 | X |
| thymol 1:1 | 12 | -23,2875 | X |
| linalool 1:1 | 12 | -21,3625 | X |

Φασματοφωτομετρία UV-Vis

Πίνακας 5.10: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 280nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 80 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD(80 C)

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| linalool 1:1 | 12 | 39,5833 | X |
| thymol 1:1 | 12 | 64,425 | XX |
| anise oil 1:1 | 12 | 70,9333 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| linalool 10:1 | 12 | -10,0 | X |
| anise oil 10:1 | 12 | 8,75 | X |
| Thymol 10:1 | 12 | 9,31667 | X |

Πίνακας 5.12: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 280nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 100 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| linaloll1:1 | 12 | -5,125 | X |
| thymol1:1. | 12 | 2,0 | X |
| anise oil1:1. | 12 | 5,03333 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|-----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| linalool 10:1 . | 12 | -2,125 | X |
| anise oil 10:1. | 12 | 1,25 | X |
| thymol 10:1. | 12 | 1,7 | X |

Πίνακας 5.14 Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 360nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 80 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 10:1 | 12 | 1,51667 | X |
| Thymol 10:1 | 12 | 6,28333 | XX |
| Anis oil 10:1 | 12 | 10,2667 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 1:1 | 12 | 4,1 | X |
| Thymol 1:1 | 12 | 8,225 | XX |
| Anise oil 1:1 | 12 | 13,5917 | X |

Πίνακας 5.16: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 360nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 100 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 1:1 | 12 | 2,5 | X |
| Linalool 1:1 | 12 | 14,4667 | X |
| Anise oil 1:1 | 12 | 15,425 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 10:1 | 12 | -28,6167 | X |
| Anise oil 10:1 | 12 | -17,6333 | X |
| Linalool 10:1 | 12 | 7,48333 | X |

Πίνακας 5.18: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 420nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 80 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 10:1 | 12 | 3,31667 | X |
| Anise oil 10:1 | 12 | 10,8417 | XX |
| Linalool 10:1 | 12 | 13,825 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Linalool 1:1 | 12 | -4,675 | X |
| Thymol 1:1 | 12 | 2,43333 | XX |
| Anise oil 1:1 | 12 | 7,5 | X |

Πίνακας 5.20: Ομοιογενείς ομάδες πολλαπλής σύγκρισης που καθορίζουν την μέση τιμή στα 420nm στα συστήματα 10:1 και 1:1 που θερμαίνονται στους 100 °C, υποδεικνύοντας στατιστική σημαντική διάφορα ($p < 0,05$).

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|----------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 10:1 | 12 | -29,8 | X |
| Anise oil 10:1 | 12 | -16,8833 | X |
| Linalool10:1 | 12 | 19,9167 | X |

Method: 95,0 percent LSD

| | <i>Count</i> | <i>Mean</i> | <i>Homogeneous Groups</i> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| Thymol 1:1 | 12 | -2,43333 | X |
| Anise oil 1:1 | 12 | 7,55 | XX |
| Linalool 1:1 | 12 | 16,5583 | X |