



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου
στο σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs)
κατά τη θερμική επεξεργασία στους 80°C

Παρασκευή Γ. Καριαμπά

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Γαρδέλη Χρυσανγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου
στο σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs)
κατά τη θερμική επεξεργασία στους 80°C

Study of the behavior of bioactive components of olive oil
in the formation of non-enzymatic glycation products (dAGEs)
during heat treatment at 80°C

Παρασκευή Γ. Καριαμπά

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια, ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Μαρία Καψοεφάλου, Καθηγήτρια, ΓΠΑ

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής, ΓΠΑ

Μελέτη της συμπεριφοράς βιοδραστικών συστατικών του ελαιόλαδου στο σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης (dAGEs) κατά τη θερμική επεξεργασία στους 80°C

*ΠΜΣ Χημεία Τροφίμων και Διατροφή
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του ανθρώπου
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε η επίδραση της α -τοκοφερόλης (α -toc), της υδροξυτυροσόλης (HT) και του σκουαλενίου (Sq) στην εξέλιξη της αντίδρασης MR. Για την μελέτη της αντίδρασης παρασκευάστηκε ισομοριακό μίγμα (1:1) γλυκόζης : λυσίνης (0,1M) στο οποίο προστέθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις α -toc (15,5 μ M, 29,0 μ M και 58,0 μ M), Sq (40,6 μ M, 1643,2 μ M και 2678,2 μ M) και HT (32,4 μ M, 116,8 μ M, και 233,5 μ M). Τα συστήματα θερμάνθηκαν στους 80^o C για 240 λεπτά. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με μη εκλεκτικές μεθόδους όπως η μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm, 360nm και 420nm και του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min. Επιπλέον για την εξέλιξη της αντίδρασης μετρήθηκε η συγκέντρωση λυσίνης που δεν αντέδρασε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η προσθήκη Sq παρεμπόδισε αποτελεσματικότερα την εξέλιξη της αντίδρασης MR συγκριτικά με την προσθήκη α -toc και HT. Επιπλέον η παρουσία αυτού του τριτερπενικού υδρογονάνθρακα ανάσχεσε το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων, και συνεπώς και των ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των AGEs. Η προσθήκη της α -τοκοφερόλης παρεμπόδισε τη δημιουργία φθοριζουσών προϊόντων, μιας ιδιότητας που σχετίζεται με τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs). Η α -toc φάνηκε αποτελεσματική όπως και το Sq χωρίς όμως η δράση αυτή να σχετίζεται με τη συγκέντρωση. Τέλος η προσθήκη της HT προώθησε όλα τα στάδια της αντίδρασης MR και μάλιστα η δράση αυτή φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η παρουσία της στο σύστημα συνδέθηκε με προστατευτική δράση στις αμινομάδες της λυσίνης υπό τις συνθήκες θέρμανσης που εξετάστηκαν.

Επιστημονική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Αντιδράσεις Maillard, Προϊόντα Προχωρημένης Γλυκίωσης (AGEs)

Study of the behavior of bioactive components of olive oil in the formation of non-enzymatic glycation products (dAGEs) during heat treatment at 80°C

MSc Food Nutrition and Health

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Chemistry and Food Analysis

ABSTRACT

In the present study the effect of α -tocopherol (α -toc), hydroxytyrosol (HT) and squalene (Sq) on the evolution of the MR reaction was investigated. To study the reaction, an equimolar mixture (1: 1) of glucose: lysine (0.1 M) was prepared to which three different concentrations of α -toc (16 μ M, 29 μ M and 58 μ M), Sq (41 μ M, 1643 μ M and 2678 μ M) and HT (32 μ M, 117 μ M, and 234 μ M). The systems were heated to 80 ° C for 240 minutes. Exposure was monitored by non-selective methods such as measuring the absorption at 280nm, 360nm and 420nm and the fluorescence (excitation / emission 370 / 430nm), at 5 different time points: 30min, 60min, 120min 240 min. In addition, for the evolution of the change, the concentration of lysine that did not react was measured using high performance liquid chromatography.

The results showed that the addition of Sq more effectively inhibited the development of the MR reaction compared with the addition of α -toc and HT. In addition to the presence of this triterpene hydrocarbon inhibited the formation of fluorescent compounds, and causes of compounds belonging to the category of AGEs. The addition of α -tocopherol prevented the formation of fluorescent products, a property associated with advanced glycation products (AGEs). α -toc appeared to be as effective as Sq but this effect was not associated with concentration. Finally the addition of HT promoted all stages of the MR reaction and in fact this action seemed to be concentration dependent. Its presence in the system was associated with a protective effect on the amino groups of lysine under the heating conditions examined.

Scientific area: Food Chemistry

Keywords: Maillard Reactions, Advanced Glycation End Products (AGEs)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου, κ. Γαρδέλη Χρυσανγή, που με εμπιστεύτηκε για το κομμάτι των αναλύσεων στο εργαστήριο, καθώς ήταν μία διαδικασία αρκετά σημαντική για την έκβαση του πειράματος. Επίσης την ευχαριστώ πολύ για την έμπρακτη στήριξή της και για την ενθάρρυνσή της σχετικά με την συγγραφή της μελέτης.

Άκόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα, Μικρού Θεανώ, η οποία με βοήθησε ψυχολογικά καθώς και πρακτικά κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο αλλά και κατά την τελειοποίηση της συγγραφής της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συμφοιτητή μου Καλκάνη Παναγιώτη με τον οποίο ανταλλάσαμε απόψεις για την έκβαση της εργασίας αλλά και ενθαρρύναμε ο ένας τον άλλον καθ όλη την διάρκεια της συγγραφής της μελέτης. Όπως επίσης και την κα Παπαντώνη Άρτεμις, μέλος ΕΤΕΠ του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθειά της στη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Λουκά, τη Σοφία, την οικογένειά μου, τους φίλους μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους, για την στήριξή τους τόσο ψυχολογικά αλλά και εμπράκτως, καθώς και για την υπομονή τους από την αρχή έως το τέλος της διπλωματικής μελέτης.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
Κεφάλαιο Α.....	1
1.1. Αντιδράσεις Αμαύρωσης.....	1
1.2. Η αντίδραση Maillard.....	1
1.2.1. Τα στάδια της αντίδρασης Maillard	2
1.2.2. Οι παράγοντες και οι συνθήκες της αντίδρασης	5
1.3. Προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs)	6
1.3.1. Καρβοξυ-μεθυλολυσίνη (CML)	8
1.3.2. Η CML στατρόφιμα	10
1.4. AGEs και υγεία	11
1.4.1. Αναστολείς των AGEs	12
1.5. Τρόποι ανίχνευσης των AGEs.....	16
Κεφάλαιο Β.....	19
2.1. Σκοπός του πειράματος	19
Κεφάλαιο Γ	20
3.1. Πειραματικό μέρος.....	20
3.2. Υλικά και μέθοδοι	21
3.3 Παρασκευή διαλυμάτων.....	22
3.4 Προετοιμασία των μιγμάτων αντίδρασης.....	23
3.3. Στατιστική Ανάλυση	27
Κεφάλαιο Δ	28
Αποτελέσματα	28
4.1.1. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard	28
4.1.2. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης Maillard (360 nm)	35
4.1.3. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard (420 nm)	42
4.1.4. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στον φθορισμό.....	49
4.1.4. Παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης Maillard με ενόργανες μεθόδους-Προσδιορισμός της λυσίνης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	56
Κεφάλαιο Ε.....	57
Συζήτηση.....	57
Κεφάλαιο ΣΤ	61

6.1. Συμπεράσματα.....	61
Κεφάλαιο Ζ.....	62
Βιβλιογραφία.....	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	66

Κεφάλαιο Α

1.1.Αντιδράσεις Αμαύρωσης

Τα τελευταία 150 χρόνια η θερμική επεξεργασία είναι μία κοινή τεχνική στην βιομηχανία των τροφίμων. Μέθοδοι όπως η αποστείρωση ή το ψήσιμο βελτιώνουν τις οργανοληπτικές και τις θρεπτικές ιδιότητες των θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων. Κατά την θέρμανση και την επεξεργασία των προϊόντων, λαμβάνουν χώρα πολλές χημικές αντιδράσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι αντιδράσεις αμαύρωσης (Rufián-Henares, J.A. 2016).

Οι αντιδράσεις αμαύρωσης, λαμβάνουν χώρα τόσο κατά την επεξεργασία των τροφίμων όσο και κατά την απόθηκευσή τους. Αποτελούν αντικείμενο υψηλού επιστημονικού ενδιαφέροντος, αφού έχουν επιπτώσεις στην σταθερότητα και στην τεχνολογία των τροφίμων, κατ' επέκταση και στη διατροφή και την υγεία, καθώς μειώνεται η θρεπτική αξία των προϊόντων και υποβαθμίζεται η ποιότητα των πρωτεϊνών. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στα τρόφιμα και οδηγούν σε αμαύρωση διακρίνονται στην ενζυματική αμαύρωση, η οποία συμβαίνει παρουσία οξυγόνου και αφορά την οξειδωση φαινολών ή πολυφαινολών από οξειδωτικά ένζυμα και στην μη ενζυματική αμαύρωση (αντίδραση Maillard, καραμελοποίηση), όπου εμπλέκονται υδατάνθρακες (Simpson, Benjamin K., 2012).

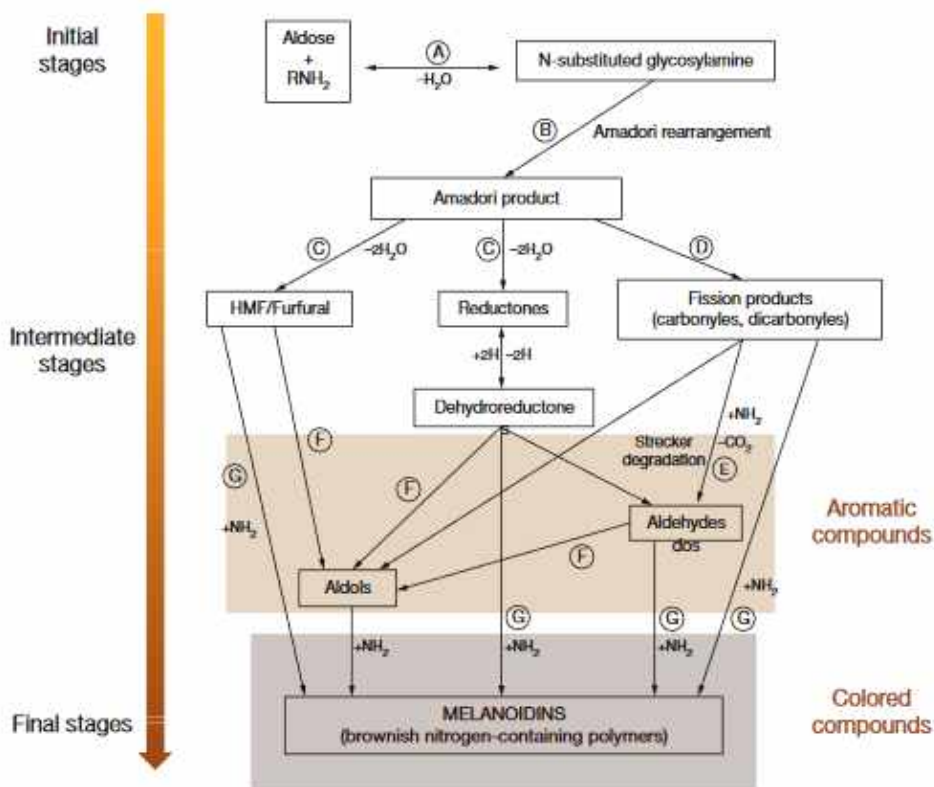
1.2.Η αντίδραση Maillard

Η αντίδραση Maillard (MR) είναι ένα σύνθετο δίκτυο αλυσιδωτών χημικών αντιδράσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση πολλών θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων. Μπορεί να συμμετέχει στην αντίδραση ένας μεγάλος αριθμός ουσιών, υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η χημεία και η κινητική της αντίδρασης δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές. Η αντίδραση Maillard, περιγράφηκε πρώτη φορά το 1912 από τον Louis Camille Maillard (Rufián-Henares, J.A. 2016). Λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων (κυρίως λυσίνη, προλίνη), πεπτιδίων ή πρωτεϊνών και της καρβονυλικής ομάδας ενός αναγωγικού σακχάρου (κυρίως γλυκόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη, λακτόζη), σε διάλυμα

(Simpson, Benjamin K., 2012). Η ανθρώπινη διατροφή περιέχει σημαντική ποσότητα προϊόντων της αντίδρασης Maillard, τα οποία μπορεί να αλλάξουν την πεπτικότητα ή την θρεπτική αξία των αμινοξέων, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις τα προϊόντα αυτά έχουν αντιοξειδωτική δράση. Η MR είναι επιθυμητή σε τρόφιμα όπως ο καφές ή το ψωμί, στα οποία τα παραγόμενα προϊόντα προσδίδουν το χαρακτηριστικό χρώμα και άρωμα, ενώ σε τρόφιμα όπως το γάλα και οι χυμοί φρούτων η MR έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα καθώς μειώνει την οργανοληπτική και τη θρεπτική τους αξία. Είναι η βασικότερη αιτία απώλειας λυσίνης, καθώς η λυσίνη είναι η κύρια πηγή πρωτοταγών αμινών στις πρωτεΐνες, αλλά και της αποικοδόμησης ελεύθερων αμινοξέων σε αλδεΐδες, αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα (βλ. παρακάτω αποικοδόμηση Strecker). Λόγω της MR, μπορεί να μειωθεί η πεπτικότητα του τροφίμου, καθώς δημιουργούνται σταυροδεσμοί μεταξύ των πρωτεϊνών και γενικότερα οξειδώνονται απαραίτητα αμινοξέα. Η MR διακρίνεται σε τρία στάδια, το αρχικό, το ενδιάμεσο και το τελικό (Nooshkam et al., 2018).

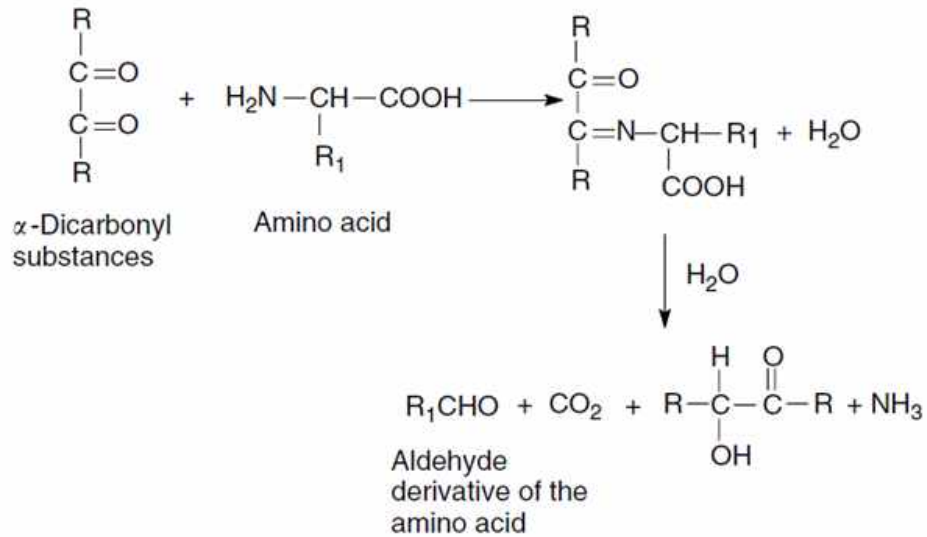
1.2.1. Τα στάδια της αντίδρασης Maillard

Κατά το αρχικό στάδιο της MR, αντιδρά το καρβονυλικό τμήμα ενός αναγωγικού σακχάρου, το οποίο πρέπει να είναι σε μορφή ανοιχτής αλυσίδας, και η αμινομάδα ενός ελεύθερου αμινοξέος, πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης, και σχηματίζεται μία βάση Schiff (ιμίνη), με ταυτόχρονη απελευθέρωση νερού (αφυδάτωση). Στη συνέχεια, η κυκλοποίηση της βάσης Schiff, οδηγεί στο σχηματισμό μιας N-υποκατεστημένης γλυκοζυλαμίνης, η οποία αναδιατάσσεται σε πιο σταθερά προϊόντα αμινοκετόζη ή αλλιώς, ένωση Amadori. Μέχρι αυτό το σημείο, οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι αντιστρεπτές. Αν η αρχική ένωση είναι κετόζη, σε αυτή την περίπτωση σχηματίζονται τα προϊόντα Heyns. Μετά από αυτό στάδιο, οι αντιδράσεις που γίνονται είναι μη αναστρέψιμες. Κατά το αρχικό στάδιο της MR οι ενώσεις Amadori που σχηματίζονται δεν είναι έγχρωμες με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται αύξηση στο χρώμα ή στο φθορισμό (Nursten, H. E. 2005, Nooshkam et al., 2018).



Εικόνα 1.1 Η πορεία και τα στάδια της αντίδρασης Maillard (Rufián-Henares, J.A. 2016)

Το ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης ξεκινά με την αποδόμηση της ένωσης Amadori, η οποία μπορεί να συμβεί μέσω οξείδωσης, ενολοποίησης, αφυδάτωσης κα. Οι αντιδράσεις που θα λάβουν χώρα καθορίζονται από τις συνθήκες που επικρατούν στο μέσο, δηλαδή το pH, τον χρόνο και την θερμοκρασία. Όταν το $pH \leq 7$, τότε το προϊόν Amadori υφίσταται κυρίως 1,2 ενολοποίηση με σχηματισμό φουρφουράλης, εάν το σάκχαρο είναι πεντόζη και με σχηματισμό υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) όταν το σάκχαρο είναι εξόζη. Στις περιπτώσεις που το $pH > 7$, θα λάβει χώρα 2,3 ενολοποίηση στο προϊόν προς σχηματισμό ρεδουκτονών (ενεδιόλες με γειτονική καρβονυλομάδα) και μίας ποικιλίας προϊόντων σχάσης (Oliveira et al., 2014). Υπάρχει και μία άλλη οδός αντίδρασης όπου οι καρβονυλικές ομάδες μπορούν να αντιδράσουν με ελεύθερες αμινομάδες αμινοξέων, με αποτέλεσμα τα αμινοξέα να μετατρέπονται σε αλδεύδες και αμινοκετόνες (απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση αμινοξέος), αυτή η οδός είναι γνωστή ως αποδόμηση Strecker (Martins et al., 2001).



Εικόνα1.2 Η αποδόμηση Strecker.

Στο τελικό στάδιο της αντίδρασης Maillard οι ρεδουκτόνες, οι αλδόλες ή οι αλδεύδες, υφίστανται αντιδράσεις κυκλοποίησης, αφυδάτωσης, ρετροαλδολικής συμπύκνωσης, μετάθεσης, ισομερισμού και περαιτέρω συμπύκνωσης που οδηγούν στο σχηματισμό καφέ πολυμερών. Αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ακόρεστων, καφέ αζωτούχων πολυμερών και συμπολυμερών (3-4% N), καθώς και μη αζωτούχων πολυμερών, οι οποίες ονομάζονται μελανοϊδίνες. Η παραγωγή των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR παρακολουθείται με αύξηση της απορρόφησης στα 420nm. Η χημεία και ο μηχανισμός των ενώσεων που σχηματίζονται σε αυτά τα στάδια της αντίδρασης δεν είναι ακόμα εντελώς γνωστά, αλλά τα τελικά προϊόντα είναι εύκολα αναγνωρίσιμα εξαιτίας των αλλαγών στη γεύση, την οσμή και το χρώμα του τροφίμου (Nooshkam et al., 2018, Oliveira et al., 2014).

1.2.2. Οι παράγοντες και οι συνθήκες της αντίδρασης

Τα πρωτοταγή αμινοξέα είναι αυτά που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα τρόφιμα. Κατά τη μελέτη μοντέλων αμινοξέων-σακχάρων όπως για παράδειγμα γλυκόζης-λυσίνης, γλυκόζης-μεθειονίνης, γλυκόζης-θρεονίνης, στο ίδιο pH, η λυσίνη αναδείχθηκε ως η πλέον δραστική καθώς διαθέτει πλευρική αλυσίδα με δεύτερη αμινομάδα. Τα σάκχαρα που εμπλέκονται είναι τα αναγωγικά, δηλαδή η γλυκόζη, η μαλτόζη, η φρουκτόζη, η λακτόζη και οι πεντόζες, σχηματίζοντας για παράδειγμα λακτολοζυλολυσίνη ή φρουκτοζυλολυσίνη (Simpson, Benjamin K. 2012). Η σειρά δραστικότητας των σακχάρων ακολουθεί την παρακάτω κατάταξη (Rufián-Henares, J.A. 2016):

1. Πεντόζες: ριβόζη>ξυλόζη>αραβινόζη
2. Εξόζες: γαλακτόζη>μαννόζη και γλυκόζη>φρουκτόζη
3. Δισακχαρίτες: μαλτόζη>λακτόζη

Η πορεία της αντίδρασης, εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός των αντιδρώντων, όπως η ενεργότητα του νερού, το pH του συστήματος, η παρουσία μετάλλων, ο χρόνος της αντίδρασης αλλά και η θερμοκρασία, που είναι και ο πιο σημαντικός παράγοντας. Γι' αυτό είναι σημαντικό για την βελτιστοποίηση των συνθηκών επεξεργασίας των τροφίμων, να είναι γνωστή η κινητική των αντιδράσεων (Carabasa-Giribet M, Ibarz-Ribas A. 2000).

- Ενεργότητα νερού (a_w) : ο ρυθμός αμαύρωσης ευνοείται όταν η ενεργότητα του νερού είναι 0.3-0.7. Όταν η $a_w > 0,70$ η ταχύτητα της αντίδρασης μειώνεται, λόγω μείωσης της συγκέντρωσης των αντιδρώντων.
- pH : Η τιμή του pH επηρεάζει κάθε στάδιο της αντίδρασης και συνεπώς καθένα από τα τρία στάδια έχει μία βέλτιστη τιμή. Σε $pH < 3$ η ταχύτητα της αντίδρασης είναι χαμηλή και αυξάνει με την αύξηση του pH στο 10. Η δραστικότητα της αμινομάδας είναι μεγαλύτερη σε pH όπου επικρατεί η ανιονική μορφή του αμινοξέος. Για τα όξινα αμινοξέα (ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ) η ανιονική μορφή επικρατεί σε pH 3 ενώ για τα βασικά αμινοξέα (λυσίνη και αργινίνη) σε pH 10.
- Μέταλλα : για παράδειγμα ο χαλκός (Cu) και ο σίδηρος (Fe), παίζουν καταλυτικό ρόλο στην πορεία της MR.

- Θερμοκρασία και χρόνος : Η MR λαμβάνει χώρα τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (κατά την αποθήκευση) όσο και σε υψηλές θερμοκρασίες (αποστείρωση) με συνέπεια την απώλεια αμινοξέων ανάλογα με το συνδυασμό χρόνου/θερμοκρασίας. Οι απώλειες είναι περίπου ίδιες όταν εφαρμόζονται επεξεργασίες HTST με αυτές χαμηλότερων θερμοκρασιών για μεγαλύτερο χρόνο (Rufián-Henares, J.A. 2016).

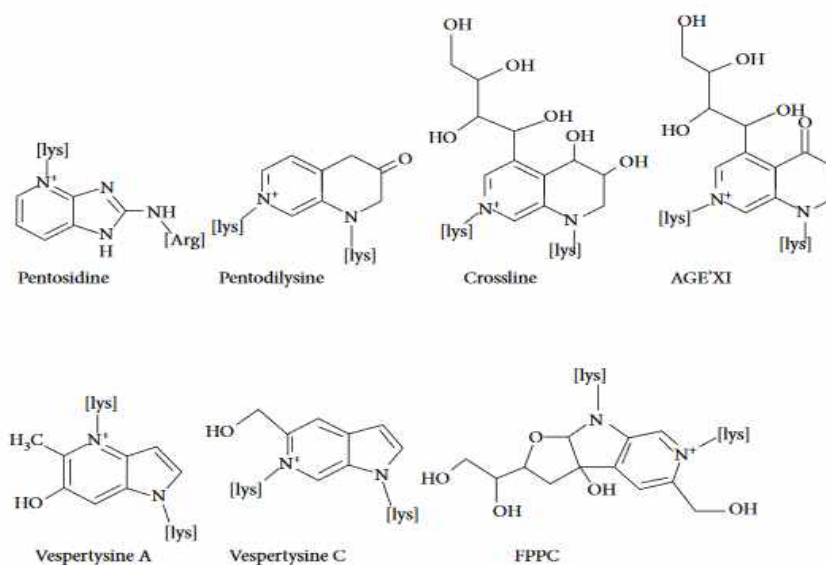
1.3. Προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs)

Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs) μπορούν να σχηματιστούν ως τελικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard, μέσω της οξείδωσης των σακχάρων αλλά και μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Για να σχηματιστούν η καρβονυλική ομάδα ενός αναγωγικού σακχάρου, τα προϊόντα οξείδωσής του ή τα προϊόντα υπεροξείδωσης των λιπιδίων, όπως η γλυοξάλη και η μεθυλογλυοξάλη, θα πρέπει να αντιδράσουν με την ε-αμινομάδα της λυσίνης. Γνωστές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των AGEs και έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι ιμιδαζολόνες, η πεντοσιδίνη, η πυραλίνη, η Νε-καρβοξυαιθυλολυσίνη (CEL) και η Νε-καρβοξυμεθυλολυσίνη (CML) (Nguyen et al., 2014).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs) και τα τελικά προϊόντα υπεροξείδωσης των λιπιδίων (ALEs), έχουν έναν παθογενετικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών, όπως ο διαβήτης, η νεφρική ανεπάρκεια, οι καρδιαγγειακές παθήσεις κ.ά..Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες για την δημιουργία των AGEs και των ALEs όπως περιβαλλοντικοί, το κάπνισμα, τα υψηλά επίπεδα υδατανθράκων στη διατροφή, το μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες κ.ά (Vistoli et al., 2013, Perrone et al., 2020). Αυτό συμβαίνει, καθώς και τα AGEs και τα ALEs, έχουν μία κοινή δομή, επειδή προέρχονται από τις ίδιες πρόδρομες ενώσεις, όπως για παράδειγμα η CML, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συντίθεται από τη γλυοξάλη, η οποία είναι προϊόν αποικοδόμησης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων αλλά και της οξείδωσης των υδατανθράκων. Επίσης παράγονται και οι δύο κατηγορίες από μη ενζυματικές αντιδράσεις και υπάρχει εμπλοκή του οξειδωτικού στρες (Perrone et al., 2020).

Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση Maillard και η υπεροξείδωση των λιπιδίων, είναι αντιδράσεις που ακολουθούν παρόμοια μονοπάτια. Μελέτες έχουν δείξει πως η MR

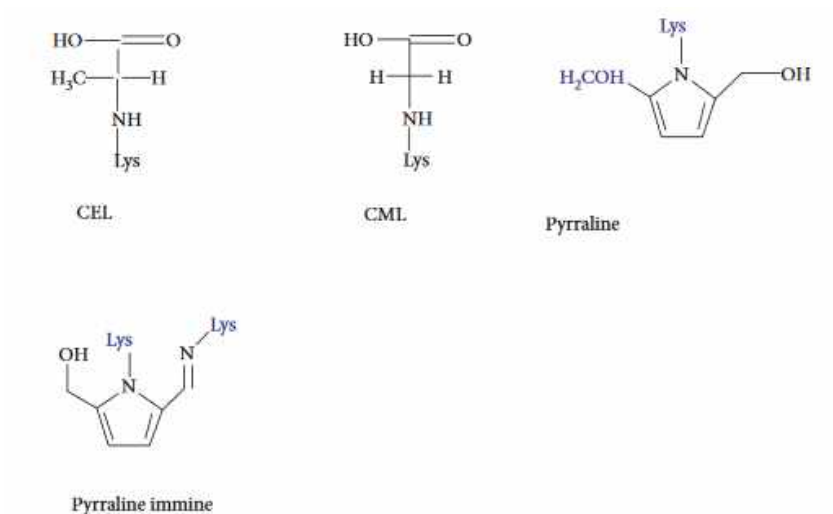
έχει την ικανότητα να προάγει αλλά ή/και να υποβαθμίσει την αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Για παράδειγμα, τα προϊόντα Amadori έχει αποδειχθεί ότι προάγουν την οξειδωσής των φωσφολιπιδίων, από την άλλη τα πολυμερή προϊόντα που παράγονται κατά το τελευταίο στάδιο, δρουν αντιοξειδωτικά μειώνοντας την οξειδωσής των λιπιδίων. Αντίστοιχα, η υπεροξειδωσής των λιπιδίων μπορεί επίσης να τροποποιήσής την αντίδραση Maillard, οδηγώντας στήν παραγωγή ενώσεων διαφορετικών από αυτές που σχηματίζονται απουσία λιπιδίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ανάπτυξη των ευχάριστων γεύσεων και οσμών του ψημένου κρέατος. Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί και από τις δύο αντιδράσεις παράγονται κοινές δραστικές καρβονυλικές ενώσεις όπως η γλυοξάλη και η μεθυλογλυοξάλη. Παρότι οι δύο αντιδράσεις είναι διαφορετικές προτείνεται να εξετάζονται ταυτόχρονα για να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί που εμπλέκονται και τα προϊόντα που σχηματίζονται (Rosario Zamora; Francisco J. Hidalgo 2005 ; 2011).



Εικόνα 1.3 Παραδείγματα σταυροδεσμευμένων AGEs

Τα AGEs ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες με βάση τη χημική δομή τους και την ικανότητά τους να εκπέμπουν φθορισμό. Διακρίνονται σε: 1) φθορίζοντα/ διασταυρούμενης σύνδεσης 2) μη φθορίζοντα/ μη διασταυρούμενης σύνδεσης, 3) μη φθορίζοντα/ διασταυρούμενης σύνδεσης και 4) φθορίζοντα/ μη διασταυρούμενης σύνδεσης. Επιπλέον διακρίνονται σε ελεύθερα ή δεσμευμένα AGEs, τα ελεύθερα είναι

γλυκιωμένα αμινοξέα με μικρά μόρια, ενώ τα δεσμευμένα αναφέρονται σε πρωτεΐνες ή πεπτίδια.



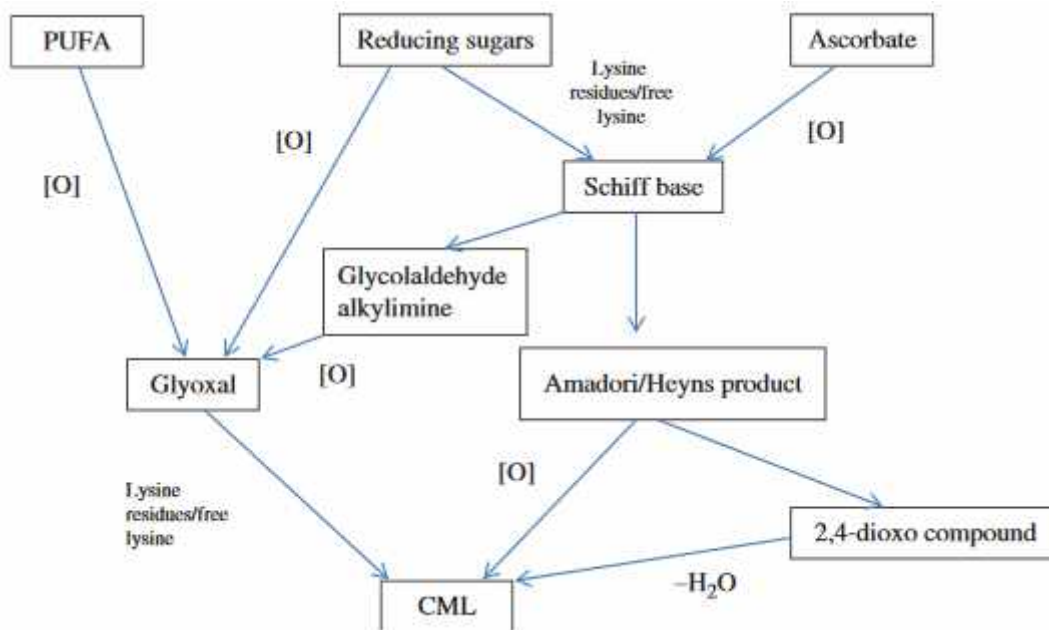
Εικόνα 1.4 Παραδείγματα μη σταυροδεσμευμένων AGEs

Η καρβοξυ-μεθυλολυσίνη (CML), η καρβοξυ-αιθυλολυσίνη (CEL) και η πυρραλίνη ανήκουν στην κατηγορία των μη φθορίζοντων, μη σταυροδεσμευμένων AGEs και περιέχουν υπολείμματα λυσίνης (Wei et al., 2018).

1.3.1. Καρβοξυ-μεθυλολυσίνη (CML)

Η CML είναι ένα από τα περισσότερο μελετημένα AGEs και χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης μέτρησης του σχηματισμού των AGEs στα τρόφιμα και σε βιολογικά συστήματα. Ανακαλύφθηκε το 1985 από τον Δρ Άχμεντ, ως το πρώτο προϊόν γλυκοξειδωσίας από αντιδράσεις γλυκόζης και λυσίνης σε φυσιολογικές συνθήκες. Μερικά χρόνια αργότερα η ένωση ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα σε τρόφιμα (Delgado-andrade, C. 2015) Είναι σταθερή όταν βρίσκεται στη δεσμευμένη μορφή. Η δεσμευμένη μορφή δημιουργείται όταν η καρβονυλική ομάδα των αναγωγικών σακχάρων, των προϊόντων οξειδωσίας της ή των προϊόντων υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, αντιδρά με την ε-αμινομάδα υπολειμάτων λυσίνης από πεπτίδια και πρωτεΐνες. Η ελεύθερη μορφή δημιουργείται όταν η καρβονυλική ομάδα αντιδράσει με την ε-αμινομάδα μιας ελεύθερης λυσίνης, ωστόσο η συγκεκριμένη αντίδραση χρήζει διερεύνησης. Ένα μεγάλο εύρος διατροφικών προϊόντων στο δυτικό

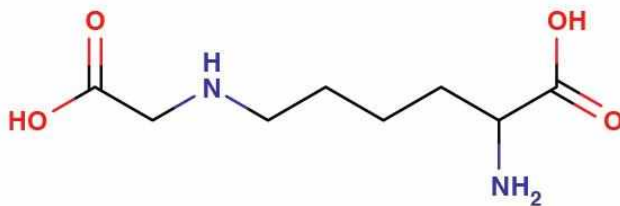
πληθυσμό, εκτίθεται σε θερμικές διεργασίες με σκοπό την ενίσχυση της ασφάλειας ή/ και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Μέσω αυτών των διεργασιών μπορεί να δημιουργηθεί η CML και άλλα AGEs. Πιο συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί πέντε οδοί δημιουργίας της CML στα τρόφιμα, οι οποίες διαφέρουν ως προς τις πρόδρομες ενώσεις και τα ενδιάμεσα προϊόντα (Nguyen et al., 2014).



Εικόνα 1.5 Οδοί σχηματισμού CML στα τρόφιμα [O] =οξειδωτικοί παράγοντες (Nguyen et al., 2014).

- Με την οξείδωση των προϊόντων Amadori/Heyns σχηματίζεται CML. Όταν τα αναγωγικά σάκχαρα είναι γλυκόζη, λακτόζη ή γαλακτόζη δημιουργούνται τα προϊόντα φρουκτοζυλολυσίνη, λακτοζυλολυσίνη ή ταγατοζυλολυσίνη αντίστοιχα, τα οποία με οξείδωση οδηγούν στην δημιουργία της CML. Στην ίδια οδό, γίνεται αφυδάτωση των 2,4-διοξο- ενώσεων, που προέρχονται από τα προϊόντα Amadori, χωρίς όμως την παρουσία οξειδωτικών μέσων. Δεν είναι ακόμη γνωστό ποιά είναι η κατάλληλη συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα για την δημιουργία της CML.
- Η γλυοξάλη έχει σημαντική θέση κατά τον σχηματισμό της CML καθώς είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν το οποίο προέρχεται από την αυτοοξείδωση της γλυκόζης. Είναι μία αρκετά δραστική δικαρβονυλική ένωση πρόδρομη των AGEs, η οποία αντιδρά εύκολα με τα υπολείμματα λυσίνης των πρωτεϊνών προς σχηματισμό της CML.

- Η CML σχηματίζεται επίσης δια μέσω της οδού Namiki. Έτσι ονομάζεται το σημείο, όπου η βάση Schiff θα διαχωριστεί με το σάκχαρο και θα σχηματιστεί η γλυκολαλδεύδη αλκυλιμίνη, η οποία θα οξειδωθεί προς γλυοξάλη για να ακολουθήσει την πορεία προς τον σχηματισμό της CML. Σύμφωνα με μελέτες η δημιουργία της CML ευνοείται περισσότερο από αλδόζες παρά από κετόζες.
- Ο σχηματισμός της CML επίσης λαμβάνει χώρα και κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα η γλυοξάλη παράγεται κατά την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA).
- Άλλη μία οδός σχηματισμού της CML είναι μέσω της αντίδρασης ασκορβικού οξέος και υπολλειμάτων λυσίνης. Λαμβάνουν χώρα με τη σειρά αντιδράσεις οι οποίες θα οδηγήσουν στο σχηματισμό της βάσης Schiff και προϊόντων Amadori όπως η L-τετρολοζυλολυσίνη ή Νε-θρεουλοζυλολυσίνη. Η οξειδωτική διάσπαση των τελευταίων θα οδηγήσει στο σχηματισμό της CML (Suzanne RThorpe; John W Baynes 2002; Nguyen et al., 2014).



Εικόνα 1.6 Carboxy-methyl-lysine

1.3.2. Η CML στα τρόφιμα

Οι νέες διατροφικές συνήθειες του δυτικού κόσμου, έχουν εισάγει στην καθημερινή διατροφή προϊόντα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, για λόγους, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, ασφαλείας ή/και οργανοληπτικούς. Τέτοιου είδους τρόφιμα είναι κυρίως προϊόντα αρτοποιίας και προϊόντα καφέ. Βέβαια, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες γύρω από ένα εύρος προϊόντων όπως κρέας, ψάρια, δημητριακά, γαλακτοκομικά, σάλτσες, φρούτα, κ.ά., όλα τους μαγειρεμένα ή/και θερμικά επεξεργασμένα σε κάποιο βαθμό. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα

γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση CML, ως αποτέλεσμα των θερμικών επεξεργασιών στις οποίες πρέπει να υποβληθούν προκειμένου να διατεθούν στο καταναλωτικό κοινό.

Σε μελέτη των [Hull et al. \(2012\)](#), υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν και σε προϊόντα δημητριακών, σε ψωμί καθώς και σε γλυκά και σνακ. Αντίθετα, η CML βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε φρούτα και λαχανικά, γεγονός που κατά κάποιο τρόπο επιβεβαιώνει την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας (αποστείρωση, εξάτμιση κλπ) στα προϊόντα ([Delgado-andrade, C. 2015](#)). Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της CML είναι μεγαλύτερη όταν το τρόφιμο υποβάλλεται σε έντονες θερμικές επεξεργασίες που συνδέονται και με χαμηλή υγρασία, πχ ψήσιμο στη σχάρα ή τηγάνισμα, σε σχέση με αυτήν που δημιουργείται όταν το ίδιο τρόφιμο υποβάλλεται σε πιο ήπιες θερμικές επεξεργασίες (χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή υγρασία) πχ βράσιμο. Επίσης σε κρέας που είχε μαγειρευτεί σε σάλτσα η συγκέντρωση της CML ήταν υψηλότερη σε σχέση με το όταν είχε μαγειρευτεί σε νερό. Αυτό, πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία αναγωγικών σακχάρων στην σάλτσα τα οποία αντιδρούν με την λυσίνη του κρέατος. Ανάμεσα στο κρέας και το ψάρι, ο σολωμός σύμφωνα με τους [Chao et al., \(2009\)](#) παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε CML, γεγονός που αποδόθηκε στη μεγάλη περιεκτικότητα σε PUFA και κατ' επέκταση και στην ευαισθησία του στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, από όπου σχηματίζεται γλυοξάλη, ([Hull et al., 2012](#)). Οι διαφορές στα προφίλ των συστατικών, ο τρόπος μαγειρέματος καθώς και οι συνθήκες επεξεργασίας του κάθε διατροφικού προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα τις διαφορές στην τελική συγκέντρωση της CML ([Nguyen et al., 2014](#)).

1.4.AGEs και υγεία

Το 1981 διαπιστώθηκε ότι η αντίδραση Maillard, κατ' επέκταση και ο σχηματισμός των AGEs, δεν εμφανίζονται μόνο στα συστήματα τροφίμων αλλά και στο ανθρώπινο σώμα. Σύμφωνα με μελέτες, αυξημένα επίπεδα AGEs στον άνθρωπο, μπορούν να προκαλέσουν απόκριση του οξειδωτικού στρες στο ανθρώπινο σώμα ή ακόμα και βλάβες στα νευρικά κύτταρα οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες, όπως για παράδειγμα νευροεκφυλιστικές ασθένειες, φλεγμονές, πρόωρη γήρανση, καρδιαγγειακές παθήσεις και ειδικότερα διαβήτη. Λόγω του ότι έχουν βρεθεί μεγάλα

ποσοστά AGEs κατά τη διάρκεια της γήρανσης αλλά και σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης στο αίμα (όπως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη), ερευνάται ότι συμβάλλουν σε αλλαγές που συσχετίζονται με την ηλικία αλλά και με επιπλοκές του διαβήτη. Από την μία πλευρά η γλυκοζυλίωση μεταβάλλει άμεσα την δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών, από την άλλη ορισμένα προϊόντα έχουν τον ρόλο του διαμεσολαβητή για κυτταρικούς υποδοχείς ενεργοποιώντας οδούς κυτταρικής σηματοδότησης (Nowotny et al., 2018 ; Wei et al., 2018).

Τα αυξημένα επίπεδα των AGEs στον ανθρώπινο οργανισμό, συνδέονται με ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες, καθώς περιέχονται σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά ή/και πρωτεΐνες και έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία ή έχουν μαγειρευτεί σε έντονες συνθήκες (πχ τηγάνισμα). Αυτό συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου της πρόκλησης σοβαρών ασθενειών, όπως ήδη έχει αναφερθεί, αλλά και στη συσσώρευση εξωγενών AGEs στο ανθρώπινο σώμα. Χρειάζονται περαιτέρω κλινικές μελέτες για να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των AGEs που λαμβάνονται από την διατροφή. Ωστόσο η πλειονότητα των μέχρι τώρα ερευνών δείχνει ότι ο περιορισμός των AGEs στην διατροφή βελτιώνει την υγεία (Nowotny et al., 2018 ; Wei et al., 2018). Για τους λόγους αυτούς και κυρίως για τον υψηλό επιπολασμό των ασθενειών που προκύπτουν λόγω της συσσώρευσης των AGEs, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο η αναζήτηση μεθόδων και στρατηγικών αναστολής των AGEs (Navarro,; Morales, 2017).

1.4.1. Αναστολείς των AGEs

Ως αναστολείς των AGEs έχουν αξιολογηθεί διάφορα συνθετικά αλλά και φυσικά προϊόντα τα οποία ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες. Οι συνθετικοί αναστολείς των AGEs, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, 1) στους αναστολείς που μπορούν να παγιδεύσουν τα δραστικά καρβονύλια και να μειώσουν τις πιθανότητες ανάπτυξης καρβονυλικού στρες, 2) σε χηλικές ενώσεις ιόντων μετάλλου που έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν την γλυκοξειδωση και 3) στις ενώσεις οι οποίες μπορούν να διακόψουν την διασταυρούμενη σύνδεση που προκύπτει κατά την δημιουργία των AGEs (Mildner-Szkudlarz et al., 2017). Η πιο γνωστή συνθετική ένωση με τεκμηριωμένη ανασταλτική δράση έναντι των AGEs είναι η αμινογουανιδίνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1986 και βοήθησε στην αντιμετώπιση του

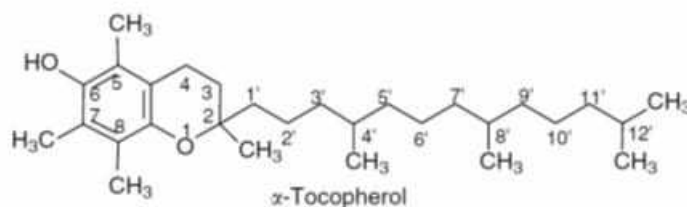
διαβήτη τύπου 2, καθώς δεσμεύει τα δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα της MR. Άλλες ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών αναστολέων είναι ασπιρίνη, η μετφορμίνη, η πυριδοξίνη καθώς και η βιταμίνη A και E κ.ά. (Khan et al., 2020). Όμως, παρόλο που οι συνθετικές ενώσεις επέδειξαν σημαντικές ανασταλτικές ιδιότητες κατά του σχηματισμού των AGEs, μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρές παρενέργειες. Για τον λόγο αυτό, η έρευνα έχει στραφεί στην αναζήτηση φυσικών συστατικών για την αναστολή των AGEs, καθώς αποτελούν μία εναλλακτική λύση για την αντιμετώπισή τους, με αντιγλυκαιμική δράση και με λιγότερες παρενέργειες σε σχέση με τους συνθετικούς αναστολείς (Mildner-Szkudlarz et al., 2017 ; Uribarri et al., 2015)

Υπάρχουν φυσικά συστατικά των τροφίμων τα οποία μπορούν να διαδραματίσουν προστατευτικό ρόλο έναντι του σχηματισμού και της συσσώρευσης των AGEs. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική τους δράση, για την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών ή και για την ικανότητά τους να δρουν ως χηλικές ενώσεις (Navarro,; Morales 2017). Αρκετές ενώσεις προερχόμενες από φαρμακευτικά φυτά, φρούτα και λαχανικά, φαίνεται ότι έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση απέναντι στα AGEs *in vivo*, *in vitro* και στα τρόφιμα. Δεδομένου ότι η οξείδωση είναι μία διαδικασία η οποία εμπλέκεται άμεσα με την αντίδραση Maillard και τον σχηματισμό των AGEs, έχει σημειωθεί ότι οι ανασταλτικές επιδράσεις των φυσικών εκχυλισμάτων οφείλονται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις. Η ανασταλτική τους δράση μπορεί να περιλαμβάνει μία σειρά διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της παγίδευσης των δραστικών καρβονυλικών ενώσεων, της αντιοξειδωτικής δράσης, της αναστολής της αυτοοξειδωσης του σακχάρου και της αναστολής και του ανταγωνισμού στη δέσμευση αμινομάδων. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται την λυσίνη και την αργινίνη κι έτσι και να αναστέλλουν την ανάπτυξη των AGEs. Ενώ υπάρχει πληθώρα μελετών σχετικά με τους αναστολείς των AGEs, έχει δοθεί λιγότερη προσοχή στη δράση των αναστολέων έναντι του σχηματισμού των AGEs σε καθημερινά διατροφικά προϊόντα (Mildner-Szkudlarz et al., 2017; Khan et al., 2020). Στην εν λόγω μελέτη, μελετάται η δράση της α-τοκοφερόλης, του σκουαλενίου και της υδροξυτυροσόλης, κύριων βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου.

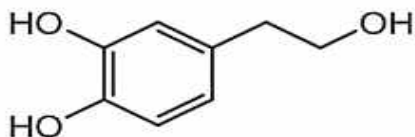
Το ελαιόλαδο και η κατανάλωσή του έχει συσχετιστεί με την μακροζωία και τις ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία καθώς και με την μείωση του κινδύνου για την πρόκληση ασθενειών όπως ο διαβήτης, η υπέρταση, η παχυσαρκία κ.ά. Αυτό έχει αποδοθεί στην υψηλή του περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά όπως η τοκοφερόλη, η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη που είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου, στο σκουαλένιο, σε διάφορες στερόλες, καροτενοειδή κ.ά. (Tsimidou et al., 2003 ; Mikrou et al., 2020). Τα κύρια χαρακτηριστικά της α -τοκοφερόλης, της υδροξυτυροσόλης και του σκουαλενίου περιγράφονται παρακάτω.

α -Τοκοφερόλη

Οι τοκοφερόλες είναι λιπόφιλες ενώσεις που αποτελούνται από έναν δακτύλιο χρωμανόλης και μία υδρόφοβη πλευρική ομάδα. Ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των τοκοφερολών οφείλεται στο φαινολικό υδροξύλιο του χρωμανίου, ενώ ο έντονα λιπόφιλος χαρακτήρας τους και η ουσιαστική μηδενική διαλυτότητά τους στο νερό οφείλεται στην ουρά φυτυλίου. Η α -, β -, γ - και δ - τοκοφερόλη διαφέρουν ως προς τον αριθμό και τη θέση των μεθυλίων και γι'αυτό διαφέρουν σημαντικά ως προς τη βιταμινική τους δράση. Από τις τέσσερις τοκοφερόλες η α -τοκοφερόλη βρίσκεται συνήθως σε μεγαλύτερη αναλογία (ακολουθούμενη από τη γ -τοκοφερόλη) και είναι η πλέον ενεργή από βιολογική άποψη. Η α -τοκοφερόλη αποτελεί το 90% με 95% της συνολικής ποσότητας της τοκοφερόλης του ελαιολάδου και έχει την υψηλότερη δράση βιταμίνης E και αντιοξειδωτική ικανότητα (Tsimidou, 2010). Το ελαιόλαδο θεωρείται μία καλή πηγή βιταμίνης E. Η συνιστώμενη ημερήσια κατανάλωση ελαιολάδου για την προαγωγή της υγείας είναι τα 20 g, τα οποία περιέχουν 4,6 mg α -τοκοφερόλης, ένα ποσό το οποίο καλύπτει το 25% της ημερήσιας προτεινόμενης δόσης (Boskou2015).



Εικόνα 1.7 Δομή α -τοκοφερόλης



Εικόνα 1.9 Δομή υδροξυτυροσόλης

1.5. Τρόποι ανίχνευσης των AGEs

Για τον προσδιορισμό των AGEs χρησιμοποιούνται ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης όπως η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), η αέρια χρωματογραφία (GC), συνδυασμός των δύο προηγούμενων με φασματομετρία μάζας (MS), μέτρηση της έντασης της απορρόφησης ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος με φασματοφωτόμετρο, μέτρηση του φθορισμού κ.ά., καθώς και ανοσοχημικές μέθοδοι με κυριότερη την ELISA (Perrone et al., 2020)

Προσδιορισμός των AGEs με φθορισμομετρία

Η φασματομετρία φθορισμού είναι μία από τις πιο κοινές μεθόδους για τον προσδιορισμό των AGEs. Η ακτινοβολία παράγεται από λάμπες υδραργύρου ή λάμπες ξένου και διέρχεται από φίλτρα διέγερσης και εκπομπής. Το μήκος κύματος της διέγερσης ποικίλει από 300nm έως 420nm και το μήκος κύματος της εκπομπής από 350nm έως 600nm, άρα τα μόρια διεγείρονται απορροφώντας την ακτινοβολία και στη συνέχεια καταγράφεται ψηφιακά η εκπομπή φθορισμού. Η μέθοδος αυτή είναι εύχρηστη και γρήγορη αλλά μπορεί να ανιχνεύσει μόνο έναν τύπο AGEs (Wei et al., 2018).

Προσδιορισμός των AGEs με φασματοφωτομετρία UV-Vis

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των 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.

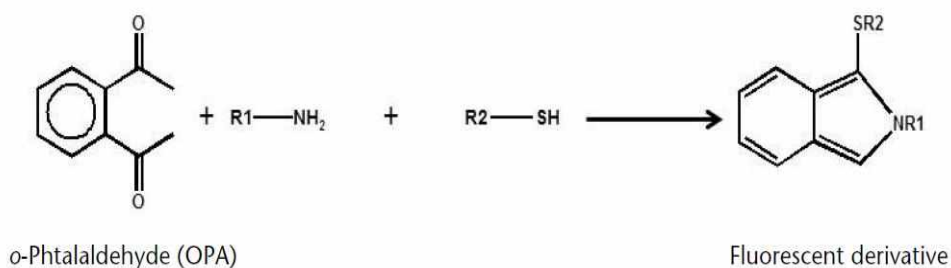
Στην συνέχεια, τα προϊόντα του ενδιάμεσου σταδίου όπως είναι οι δικαυβονυλικές ενώσεις, το φουράνιο και τα δραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από αφυδάτωση, οξείδωση και κατακερματισμό των αρχικών προϊόντων, μετρώνται στα 360 nm. Τα τελικά προϊόντα της μη ενζυμικής αμαύρωσης όπως οι ενώσεις αρώματος και τα έγχρωμα πολυμερή προϊόντα μετρώνται στα 420 nm. Ο χρόνος θέρμανσης σε συνδυασμό με την απορρόφηση δημιουργούν μια καμπύλη που περιγράφει την εξέλιξη της MR στη διάρκεια του χρόνου, δίνοντας σημαντικά αποτελέσματα. Η φασματοφωτομετρία UV-Vis δεν θεωρείται εκλεκτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των προϊόντων MR, καθώς ορισμένες ενώσεις μπορεί να έχουν παρόμοια δομή και επομένως να απορροφήσουν ακτινοβολία στο ίδιο μήκος κύματος.

Η σχέση μεταξύ αύξησης της απορρόφησης (αμαύρωση) και φθορισμού κατά τη διάρκεια της MR δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι έγχρωμες και οι φθορίζουσες ενώσεις δεν είναι απαραίτητα οι ίδιες ενώ επιπλέον οι φθορίζουσες ενώσεις μπορεί να είναι πρόδρομες των πρώτων. Συνήθως, μια περίοδος επαγωγής προηγείται της αμαύρωσης και του φθορισμού με την περίοδο επαγωγής να είναι μικρότερη για τις φθορίζουσες ενώσεις. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, σχηματίζονται σε επαρκή ποσότητα άχρωμες ενδιάμεσες ενώσεις. Ανάλογα με τις συνθήκες (pH, θερμοκρασία, aw και το είδος των αντιδρώντων) ο φθορισμός μπορεί να παρουσιάσει μέγιστο ανάλογα με το χρόνο θέρμανσης, μπορεί όμως να αυξάνεται συνεχώς, ή να παρουσιάζει μια σταθερή τιμή (πλατώ) (Morales and van Boekel, 1997).

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Στις μεθόδους ανάλυσης για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε βιολογικά δείγματα, περιλαμβάνονται η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS), η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού (FLD). Τα περισσότερα αμινοξέα όπως και η CML δεν περιέχουν χρωμοφόρα είτε φθοροφόρα τμήματα στο μόριο τους και επομένως είναι απαραίτητη μια κατάλληλη μέθοδος παραγωγοποίησης. Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης για την ανάλυση αμινοξέων είναι η ο-φθαλαλδεΐδη (OPA) (Zhang et al., 2018). Για να γίνει η αντίδραση της παραγωγοποίησης είναι απαραίτητη η παρουσία μιας θειόλης σε αλκαλικό pH που δίνει ισχυρά φθορίζοντα

και συγχρόνως ηλεκτροχημικά ενεργά παράγωγα. Η διαδικασία της παραγωγοποίησης είναι σχετικά απλή και συμβαίνει σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικά διαλύματα. Επίσης, σε περίπτωση που χρησιμοποιείται μόνο ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής για την ανίχνευση των παραγώγων, δεν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της περίσσειας του OPA από το μίγμα της παραγωγοποίησης διότι δε φθορίζει. Τα παράγωγα του OPA είναι λιγότερο πολικά από τα ελεύθερα αμινοξέα και για το λόγο αυτό είναι ικανός ο διαχωρισμός τους με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Μειονεκτήματα του αντιδραστηρίου είναι : α) αντιδρά μόνο με τα πρωτοταγή αμινοξέα και όχι με τα δευτεροταγή και β) τα παράγωγά του είναι ασταθή. Παραδείγματα θειούχων ενώσεων που είναι απαραίτητες για την αντίδραση είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη, το μερκαπτοπροπιονικό οξύ κ.α. (Μπαλκατζοπούλου, Διδακτορική Διατριβή)



Σχήμα 1.10 Παραγωγοποίηση πρωτοταγών αμινοξέων

Κεφάλαιο Β

2.1. Σκοπός του πειράματος

Η αντίδραση Maillard (MR), τα στάδιά της και τα προϊόντα που δημιουργούνται, είναι ένα αντικείμενο που απασχολεί αρκετά την επιστημονική κοινότητα εδώ και δεκαετίες. Σε αυτή την αλληλουχία αντιδράσεων υπάρχουν σημεία που δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν γίνει μελέτες για την ανάλυση της αντίδρασης Maillard με συνθετικούς αλλά και φυσικούς αναστολείς. Στους φυσικούς αναστολείς το ενδιαφέρον στρέφεται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις, καθώς υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την δράση τους έναντι των προϊόντων της αντίδρασης Maillard. Ωστόσο, η μελέτη των βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου, βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο καθώς τα στοιχεία που υπάρχουν από την βιβλιογραφία είναι περιορισμένα και μη επαρκή.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη της επίδρασης των βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου και συγκεκριμένα της α-τοκοφερόλης (*α-τοc*), της υδροξυτυροσόλης (HT) και του σκουαλενίου (Sq) στο σχηματισμό των AGEs κατά στην εξέλιξη των αντιδράσεων μη ενζυματικής αμάυρωσης σε σύστημα τροφίμων. Για τη μελέτη της αντίδρασης παρασκευάστηκε ισομοριακό (1:1) μίγμα γλυκόζης : λυσίνης (0,1M) στο οποίο προστέθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης, σκουαλενίου και υδροξυτυροσόλης και τα συστήματα υποβλήθηκαν σε θέρμανση στους 80°C για 4 ώρες. Η θερμοκρασία των 80°C και ο χρόνος θέρμανσης επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά των ήπιων-αργών διαδικασιών μαγειρέματος, όπως αυτές που επιτυγχάνονται σε παραδοσιακά πήλινα δοχεία (70-80°C) που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής γαστρονομικής παράδοσης (Pellegrini and Fogliano, 2017).

Κεφάλαιο Γ

3.1. Πειραματικό μέρος

Για την μελέτη της αντίδρασης παρασκευάστηκε ισομοριακό μίγμα (1:1) γλυκόζης : λυσίνης (0,1M) όπου προστέθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης: 16 μM , 29 μM και 58 μM , σκουαλενίου: 41 μM , 1643 μM και 2678 μM και υδροξυτυροσόλης: 32 μM , 117 μM , και 234 μM . Τα συστήματα θερμαίνονται στους 80⁰ C για συνολικά 240 λεπτά. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με μη εκλεκτικές μεθόδους όπως η μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm, 360nm και 420nm και του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min. Επιπλέον για την εξέλιξη της αντίδρασης μετρήθηκε η συγκέντρωση της λυσίνης που δεν αντέδρασε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στο μείγμα της αντίδρασης η συγκέντρωση των υπό εξέταση ενώσεων υπολογίστηκε με βάση την περιεκτικότητά τους στο ελαιόλαδο. Πιο συγκεκριμένα το μείγμα της αντίδρασης σχεδιάστηκε έτσι ώστε η αναλογία γλυκόζης : λυσίνης : ελαιόλαδου (μέσο μοριακό βάρος τριακυλογλυκερόλης 885.48 gr/mol) να είναι 1:1:1, με την συγκέντρωση των αντιδρώντων να είναι 0.1 M (Han et al., 2013). Επομένως με βάση την μέση σύσταση του ελαιόλαδου σε σκουαλένιο, α-τοκοφερόλη και υδροξυτυροσόλη υπολογίστηκε η χαμηλότερη, η μέση και η υψηλότερη συγκέντρωση για κάθε μία από τις τρεις ενώσεις.

Η συγκέντρωση του Sq στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 200 mg/kg έως 7000 mg/kg (Mikrou et al., 2020), αλλά στη βιβλιογραφία για ελληνικά ελαιόλαδα καταγράφονται και πολύ μεγαλύτερες ποσότητες. Για αυτό τον λόγο εκτός από τις δύο ακραίες συγκεντρώσεις εξετάστηκε και ποσότητα σκουαλενίου που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 11000 mg/kg.

Η συγκέντρωση της α-toc κυμαίνεται από 80 mg/kg έως 150 mg/kg. Ομοίως με το σκουαλένιο, στη βιβλιογραφία αναφέρονται και ελαιόλαδα που περιέχουν σχεδόν διπλάσια ποσότητα (Boskou, 2015) και γι αυτό το λόγο εξετάστηκε και συγκέντρωση α-τοκοφερόλης ίση με 300 mg/ Kg.

Η συγκέντρωση της HT στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 50 έως 200 mg/kg (Romero and Brenes, 2012). Για πειραματικούς σκοπούς ελέγχθηκε ποσότητα διπλάσια από την μέγιστη που απαντάται στο ελαιόλαδο (400mg/Kg).

3.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- PBS, Φωσφορικό buffer 0,1M, Bectron, Dickinson and Company
- d-Γλυκόζη άνυδρη, AcrosOrganics (MW = 180,1 g/ mol)
- L-Λυσίνη μονουδροχλωρική, AcrosOrganics(MW = 182,65 g/mol)
- Tween 80, ServaElectrophoresisGmbH
- α -Τοκοφερόλη, 97%, FlukaBiochemika, SigmaAldrich, Mr= 430,71g/mol
- Σκουαλένιο, MERCK-Schuchart, Mr= 410,72g/mol
- Υδροξυτυροσόλη, 98%,SigmaAldrich, Mr= 154,16g/mol

Υλικά:

- Ογκομετρικές φιάλες (25, 50, 100, 500, 1000 mL)
- Πιπέτες (10 mL)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (25, 100 mL)
- ποτήρια ζέσεως (50, 100, 250 mL)
- Πιπέτες Pasteur
- Falcons
- Αυτόματη πιπέτα μεταφοράς (1000 μ L, Brand, Germany)
- Αναλυτικός ζυγός AE20 (METTLER TOLEDO, Ohio, USA)
- Πλάκα θέρμανσης (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Vortex (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Thermomix HCM100-Pro (Sinosource, China)

Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (JASCOV-530, Tokyo, Japan)
- Φθορισμόμετρο 2030 VICTOR X2 (Perkin-Elmer, UK)
- HPLC (JASCO HPLC (JASCO International Co., Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία)

3.3 Παρασκευή διαλυμάτων

1) Διάλυμα Phosphate Buffer Salin 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. Το pH του τελικού διαλύματος είναι 7,2.

2) Διάλυμα D-γλυκόζης 0,1 M

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 9,008 g προστίθεται PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL, και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

3) Διάλυμα L-λυσίνης 0,1 M

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 9,1325g προστίθεται δμ PBS 0,1M και το διάλυμα αναδεύεται. Μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με PBS 0,1M μέχρι τη χαραγή.

4) Διάλυμα ελέγχου

Για τον έλεγχο της συμπεριφοράς των τριών υπό εξέταση ενώσεων 3 mL δ/μα γλυκόζης (0,1 M) και 3mL δμ λυσίνης (0,1 M) θερμάνθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες και ανασύρονταν στα αντίστοιχα χρονικά σημεία από τη συσκευή θέρμανσης. Για τον έλεγχο της δράσης του σκουαλενίου και της α -τοκοφερόλης προστέθηκε ποσότητα TWEEN 0,2 g.

5) Διάλυμα εργασίας α -τοκοφερόλης

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,05 g α -τοκοφερόλης, 0,2 g TWEEN και μικρή ποσότητα PBS (λιγότερο από 50 mL). Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε Κυκλοαναμίκτη για περίπου 1 min μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός (overnight στο ψυγείο). Στην συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 50 mL και συμπληρώνεται με PBS ως την χαραγή. Το διάλυμα που προκύπτει έχει τελική συγκέντρωση α -τοκοφερόλης 1 g/L (2,3mM) και TWEEN 0,4%.

6) Διάλυμα εργασίας σκουαλενίου

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,5 g σκουαλενίου, 0,2 g TWEEN και μικρή ποσότητα PBS (λιγότερο από 50 mL). Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε Κυκλοαναμίκτη για περίπου 1min μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να «σπάσει» ο αφρός (overnight στο ψυγείο). Στην συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 50 mL και συμπληρώνεται με PBS ως την χαραγή. Το διάλυμα που προκύπτει έχει τελική συγκέντρωση σκουαλενίου 10 g/L(24,3 mM) και TWEEN 0,4%.

7) Διάλυμα εργασίας υδροξυτυροσόλης

Σε αναλυτικό ζυγό τοποθετείται ογκομετρική φιάλη των 5 mL και ζυγίζονται 0.01 g υδροξυτυροσόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή. Το τελικό διάλυμα έχει συγκέντρωση 2 g/L (13mM).

3.4 Προετοιμασία των μιγμάτων αντίδρασης

Σε γυάλινα φιαλίδια με κωνικό πυθμένα και πόμα σιλικόνης με στρογγυλή φλάντζα τοποθετούνται 3mL του διαλύματος (2) και 3 mL του διαλύματος (3) που αποτελούν το μίγμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια από το κάθε διάλυμα εργασίας (5), (6) και (7) προστέθηκαν οι όγκοι V (μL) όπως φαίνονται στη 2η στήλη του Πίνακα 3.1 ώστε τελικά να προκύπτουν οι συγκεντρώσεις a, b, και c όπως φαίνονται στη 3η στήλη του ίδιου Πίνακα.

Πίνακας 3.1 : Συγκέντρωση βιοδραστικών ενώσεων στο μίγμα της αντίδρασης

Χημική ένωση		V(μL) βιοδραστικών ενώσεων	C (μM) στο μίγμα της αντίδρασης
α-τοκοφερόλη	a	40	16
	b	75	29
	c	150	58
Σκουαλένιο	a	10	41
	b	400	1623
	c	660	2678
Υδροξυτυροσόλη	a	15	32
	b	54	117
	c	108	234

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα αναδεύεται και τοποθετείται σε ThermoShaker LLG, Unithermix 1 Pro (700 rpm), όπου θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 80°C για 4 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται σε 5 χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min, αποσύροντας 1 σωλήνα (για κάθε χρονικό σημείο). Κάθε φορά που σταματά η ανάδευση για την απόσυρση κάποιου σωλήνα ανοίγονται όλα τα καπάκια για να ανανεωθεί ο αέρας (Lima et al., 2010).

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου (controls) αποτελούμενα από τα μίγματα αντίδρασης 1:1 χωρίς την προσθήκη βιοδραστικών ενώσεων. Η πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Παρακολούθηση της αντίδρασης

Η παρακολούθηση της αντίδρασης MR έγινε μέσω μη εξειδικευμένων δεικτών όπως είναι ο σχηματισμός φθοριζουσών ουσιών και η μεταβολή της απορρόφησης του μίγματος της 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). Επιπλέον η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε και με μέτρηση εξειδικευμένων δεικτών όπως είναι η συγκέντρωση λυσίνης μέσω HPLC.

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 επαναληπτική μέτρηση). 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

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{\text{Abs}_{280_360_420_control} - \text{Abs}_{280_360_420_sample}}{\text{Abs}_{280_360_420_control}} \right) \times 100$$

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

Μέτρηση Φθορισμού

Η μέτρηση της ακτινοβολίας φθορισμού των AGEs πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο με φίλτρα σε μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 370 και 420nm, 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 επαναληπτική μέτρηση). Ο φθορισμός των AGEs εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (AU) σε αναγνώστη πλάκας Victor 801 (Perkin-Elmer, SingaporePteLtd). Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η σχέση (2)

$$(\text{Ανάσχεση}\%) = \left(\frac{\text{Fluo}_{control} - \text{Fluo}_{sample}}{\text{Fluo}_{control}} \right) \times 100$$

Όπου $\text{Fluo}_{control}$ ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης 1:1 στο κάθε χρονικό σημείο θέρμανσης χωρίς την προσθήκη βιοδραστικών ουσιών, και Fluo_{sample} ο φθορισμός του συστήματος αντίδρασης με την προσθήκη των βιοδραστικών ουσιών.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τον προσδιορισμό των αμινοξέων (HPLC), παραγωγή OPA

- Υλικά

Η 2-μερκαπτοαιθανόλη (MCE $\geq 99,0\%$), η φθαλαλδεΐδη (OPA $\geq 99,0\%$) και το διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,1N) προμηθεύτηκαν από την SigmaAldrich (Steinheim, Γερμανία). Το υδροξείδιο του νατρίου ($\geq 98\%$) και το βορικό οξύ ($\geq 99,5\%$) ήταν της εταιρείας Honeywell International Inc (Muskegon, ΗΠΑ). Το όξινο φωσφορικό δι-κάλιο, το δισόξινο φωσφορικό κάλιο και το τριένυδρο οξικό νάτριο προμηθεύτηκαν από την MERCK (Darmstadt, Γερμανία) και όλα τα αντιδραστήρια αναλυτικής ποιότητας (νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο $\geq 99,8\%$) αγοράστηκαν από το Scientific, Lougher.

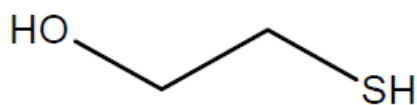
- Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα παρακαταθήκης LYS (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) παρασκευάστηκε σε 0,1 N HCl. Για την παραγωγή, είναι σημαντικό η τιμή pH του προτύπου να είναι στην περιοχή του pH 7. Επομένως, το πρότυπο αραιώθηκε αρχικά 1:1 με 0,1 N NaOH. Το μητρικό διάλυμα στη συνέχεια αραιώθηκε με νερό για να παρασκευαστούν τα τυπικά διαλύματα εργασίας που κυμαίνονταν από 0,1 έως 0,5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ για βαθμονόμηση. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Το αντιδραστήριο παραγωγής παρασκευάστηκε με ανάμειξη 1 mL διαλύματος OPA (10 mg/ mL, μεθανόλη) σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος βορικών (αποτελούμενο από 0,8 M ρυθμιστικό βορικού σε KCl και 0,8 M NaOH με τελικό pH 9,9) και 16 μL μερκαπτοαιθανόλη (MCE). Το αντιδραστήριο παραγωγής είναι σταθερό για 9 ημέρες (Zhang et al., 2018). Για την παρασκευή των δειγμάτων 50 μL , μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 10 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με νερό αναλυτικής καθαρότητας.

Διαδικασία παραγωγής: Η παραγωγή πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη 250 μL του αραιωμένου δείγματος και με 150 μL αντιδραστήριου παραγωγής. Μετά από 2 λεπτά χρόνου αντίδρασης, 50 μL του μίγματος προστέθηκαν σε 200 μL διαλύματος NaOH, 20 μL του τελικού διαλύματος εγχύθηκαν στο σύστημα της HPLC.

- Υγρή χρωματογραφία

Ο προσδιορισμός της λυσίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το Application Note της Phenomenex: Ανάλυση αμινοξέων με παραγωγοποίηση OPA (Αριθμός εφαρμογής: 23092), χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα JASCO HPLC (JASCO International Co., Ltd., Τόκιο, Ιαπωνία), αποτελούμενο από μια τεταρτοταγή αντλία (PU-2089 Plus), έναν αυτόματο δειγματολήπτη (AS-1555) και έναν ανιχνευτή φθορισμού (FP-920). Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη Kinetex EVO C18 (100 mm x 4,6mmid, 2,6μm, Phenomenex, USA). Ο ρυθμός ροής ήταν 0,8 mL/min και ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL. Η κινητή φάση αποτελούνταν από φωσφορικό νάτριο (20 mM, pH 7,2) (A) και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη (50:50, v/v) (B) υπό συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης: 97% - 40% A στα 0-20 λεπτά, 40-97% A στα 20-23 λεπτά και 97% A έως 25 λεπτά. Το μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 340 nm και 455 nm, αντίστοιχα. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο γλυκίνης. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της λυσίνης σε mM έγινε με τη χρήση της εξίσωσης : $y=14x+1.5$ ($R^2=0.998$)



μερκαπτοαιθανόλη

3.3. Στατιστική Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics Centurion XVII. 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.

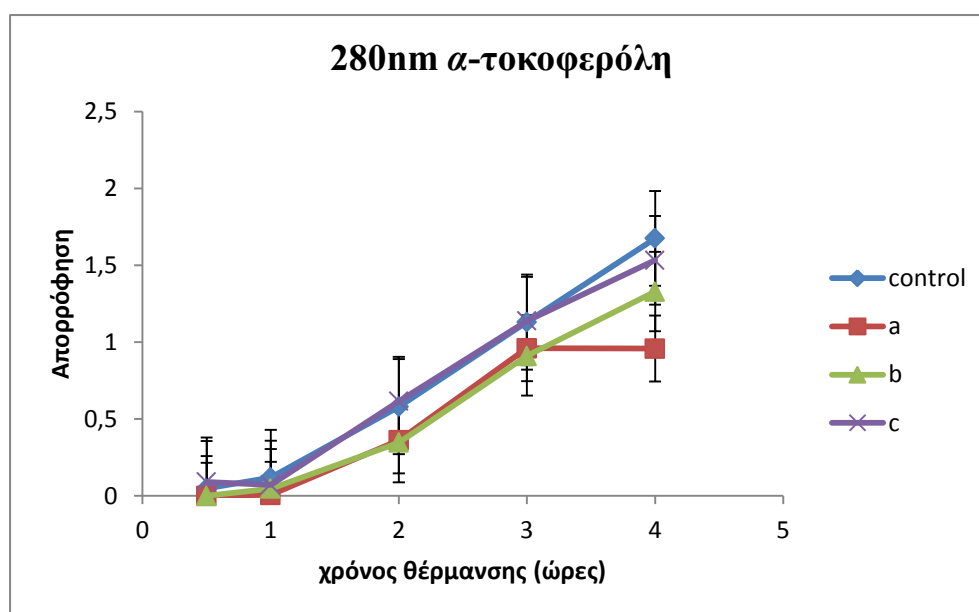
Κεφάλαιο Δ

Αποτελέσματα

4.1.1. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard

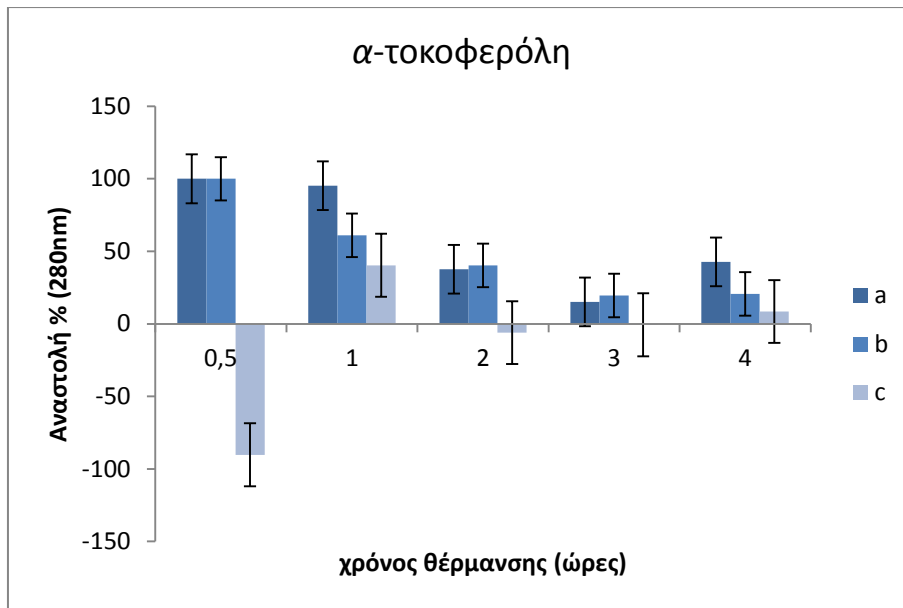
Τα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard (βάση Schiff, προϊόντα αναδιάταξης Amadori) είναι χαμηλού μοριακού βάρους, δεν απορροφούν στο ορατό φάσμα και ο σχηματισμός τους παρακολουθείται με την μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm.

Η επίδραση της α -τοκοφερόλης



Γράφημα 4.1 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης (a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

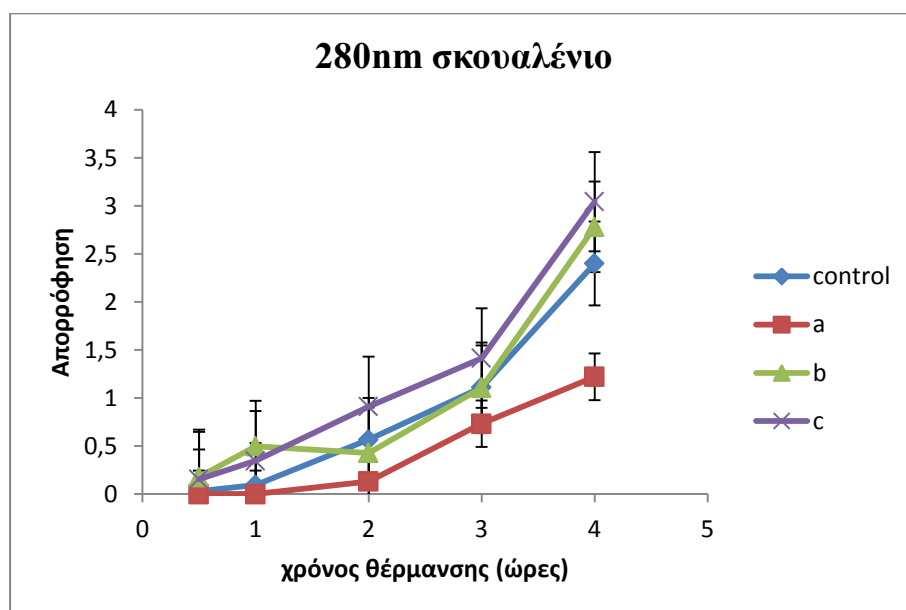
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζης:λυσίνη (0,1M), στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της α -τοκοφερόλης. Η επίδραση στα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.2 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης, $a=16 \mu\text{M}$, $b=29 \mu\text{M}$, $c=58 \mu\text{M}$ στην ανάσχεση (%) των αρχικών προϊόντων γλυκίωσης (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

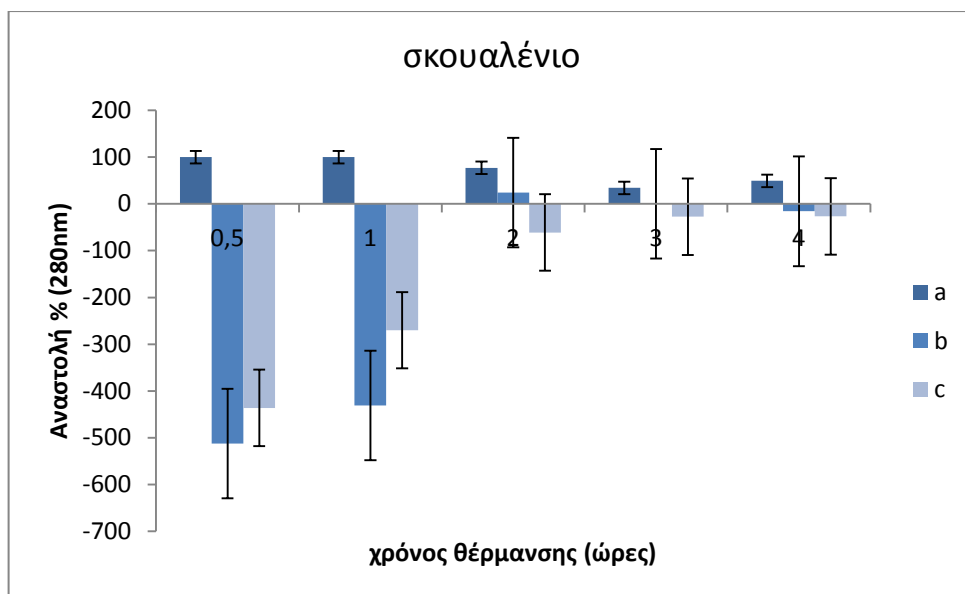
Στο Γράφημα 4.2 απεικονίζεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της α -τοκοφερόλης στην ανάσχεση των προϊόντων που προκύπτουν κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης Maillard. Οι συγκεντρώσεις a και b φαίνεται να ανασχέουν τον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης, κατά 100% κατά το πρώτο χρονικό σημείο (0,5h) έως περίπου 20% μετά από 3 ώρες θέρμανσης στους 80°C . Η μεγαλύτερη συγκέντρωση α -τοκοφερόλης ίση με $58,0 \mu\text{M}$ οδηγεί σε ανάσχεση της αντίδρασης στην 1 ώρα θέρμανσης (περίπου 40%) με μικρή έως καθόλου ανάσχεση στα επόμενα χρονικά σημεία.

Η επίδραση του σκουαλενίου



Γράφημα 4.3 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου (a=41 μ M, b=1643 μ M, c=2678 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

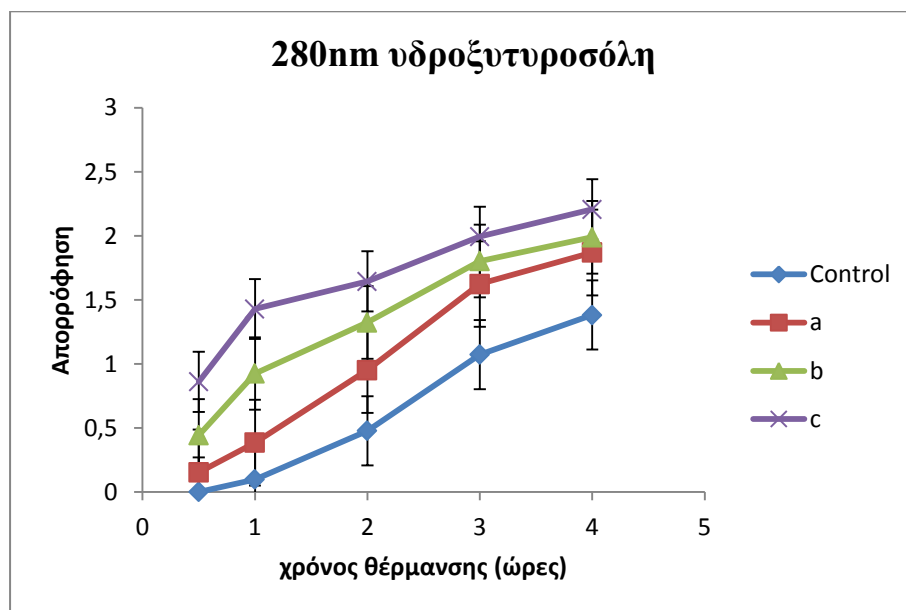
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του σκουαλενίου. Η επίδραση στα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.4 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου a=41 μM , b=1643 μM , c=2678 μM , στην ανάσχεση (%) των αρχικών προϊόντων γλυκίωσης (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

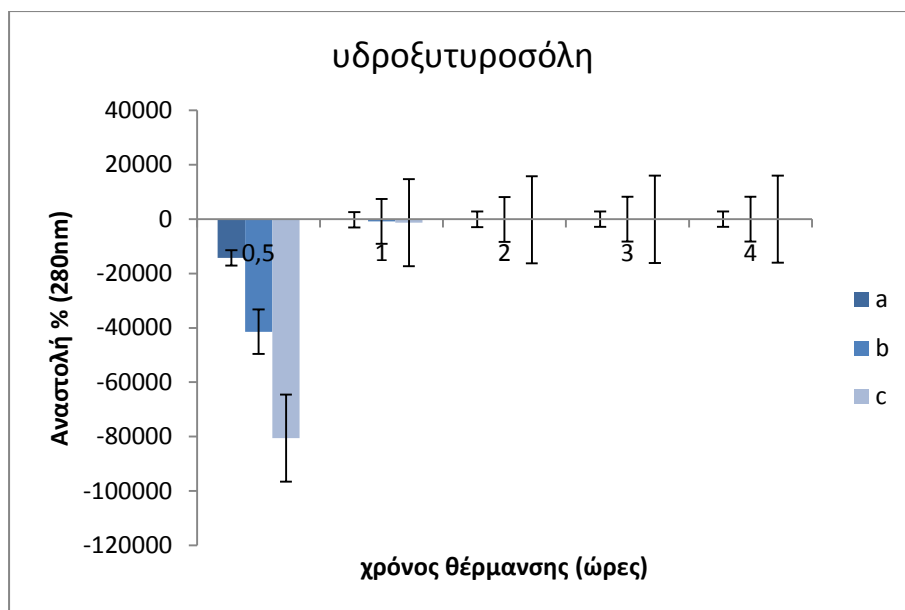
Στο Γράφημα 4.4 απεικονίζεται η ανάσχεση % στο σχηματισμό των αρχικών προϊόντων της MR (280nm) του μοντέλου γλυκόζη-λυσίνη 0,1M παρουσία σκουαλενίου. Σύμφωνα με το διάγραμμα η a συγκέντρωση φαίνεται να ανασχέει την αντίδραση από 100% στο πρώτο χρονικό σημείο (0,5h) έως περίπου 50% μετά από 4 ώρες θέρμανσης στους 80°C. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις b και c που εξετάστηκαν προωθούν το σχηματισμό των προϊόντων της αντίδρασης κυρίως κατά τις δύο πρώτες ώρες θέρμανσης

Η επίδραση της Υδροξυτυροσόλης



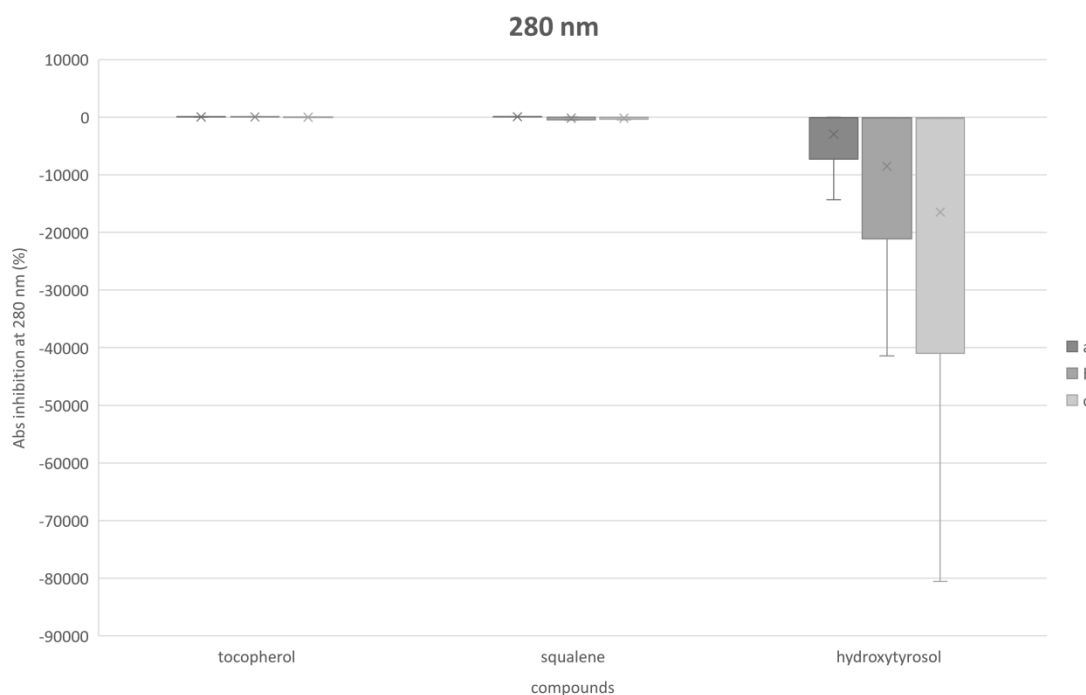
Γράφημα 4.5 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης (a=32μM, b=117μM, c=234μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της υδροξυτυροσόλης. Η επίδραση στα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.6H επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης, a=32 μM, b=117 μM, c=234 μM στην ανάσχεση (%) των αρχικών προϊόντων γλυκίωσης (280 nm) κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

Στο Γράφημα 4.5 απεικονίζεται η ανάσχεση % στο σχηματισμό των αρχικών προϊόντων (280nm) στο μοντέλο γλυκόζη-λυσίνη 0,1M παρουσία υδροξυτυροσόλης. Σύμφωνα με το γράφημα δεν φαίνεται να υπάρχει ανάσχεση (%) από την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται προώθηση της αντίδρασης κατά στην έναρξη της θέρμανσης (0,5 ώρα).

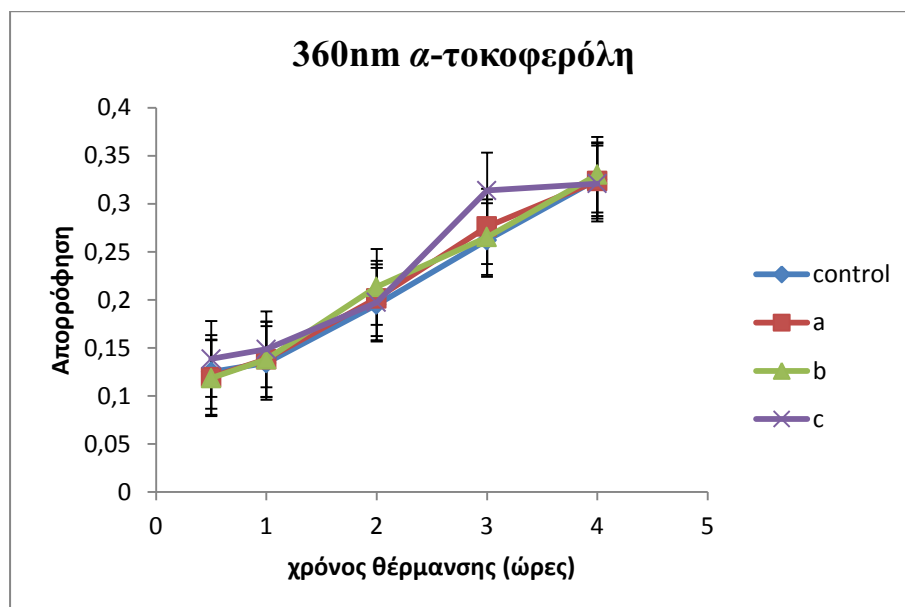


Γράφημα 4.7 Θηκόγραμμα (Box-and-Whiskerplot) που αναπαριστά την ανασχεση της δημιουργίας των προϊόντων του αρχικού σταδίου της MR(280 nm) στο σύστημα γλυκόζη/λυσίνη (0,1M) , στους 80°C, από την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα (*, **, °) εκτός των boxplot υποδεικνύουν ακραίες τιμές.

Στο Γράφημα 4.7 παρατηρείται αρνητική ασυμμετρία από όλες τις συγκεντρώσεις (a, b, c) της υδροξυτυροσόλης, καθώς οι περισσότερες τιμές τοποθετούνται στο Q1, δηλαδή υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα σε αυτό το τεταρτημόριο και οι διάμεσοι βρίσκονται στο μηδέν. Οι συγκεντρώσεις της α-τοκοφερόλης και του σκουαλενίου, με βάση τις διαμέσους τους, που βρίσκονται επίσης στο μηδέν, αλλά και τις τιμές τους, δεν προκύπτει μεγάλη μεταβλητότητα, οπότε παρατηρείται μικρή επίδραση της συγκέντρωσης του κάθε βιοδραστικού στην εξέλιξη της αντίδρασης. Αντιθέτως παρατηρείται ότι υπάρχει προώθηση της αντίδρασης.

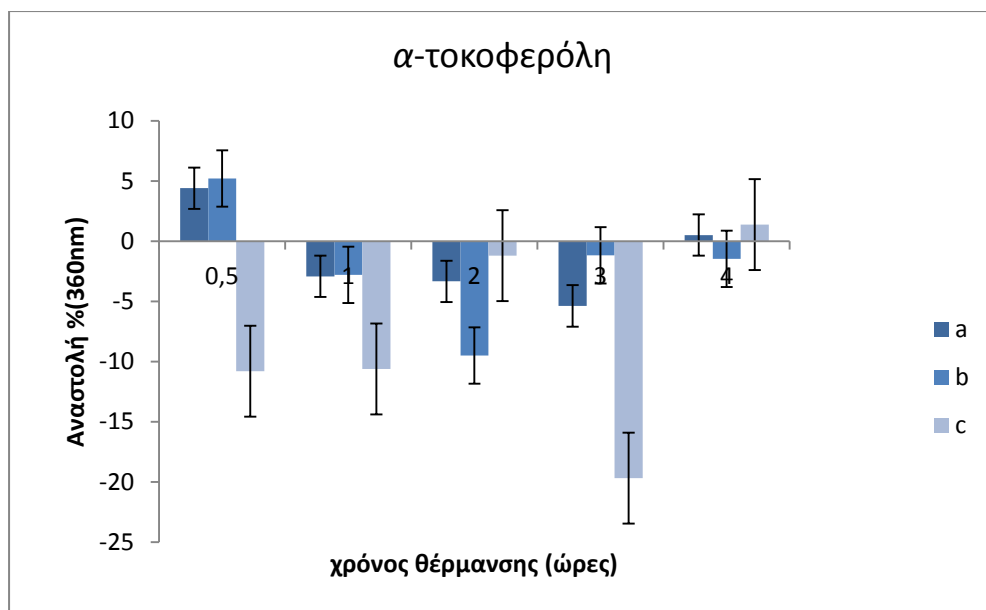
4.1.2. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης Maillard (360 nm)

Η επίδραση της α -τοκοφερόλης



Γράφημα 4.8 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης (a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

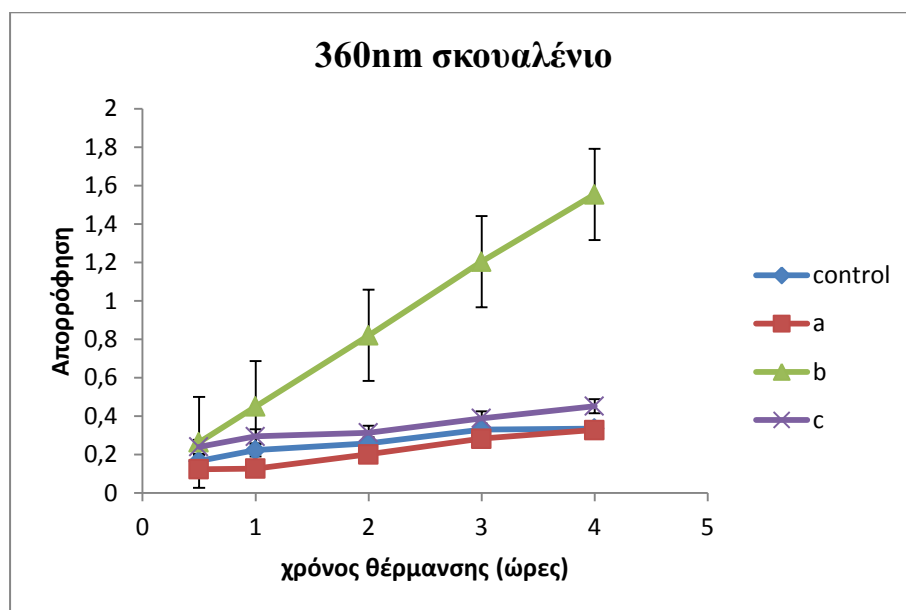
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης. Η επίδραση στα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.9 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης, $a=16 \mu\text{M}$, $b=29 \mu\text{M}$, $c=58 \mu\text{M}$ στην ανάσχεση (%) των ενδιάμεσων προϊόντων γλυκίωσης (360nm) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

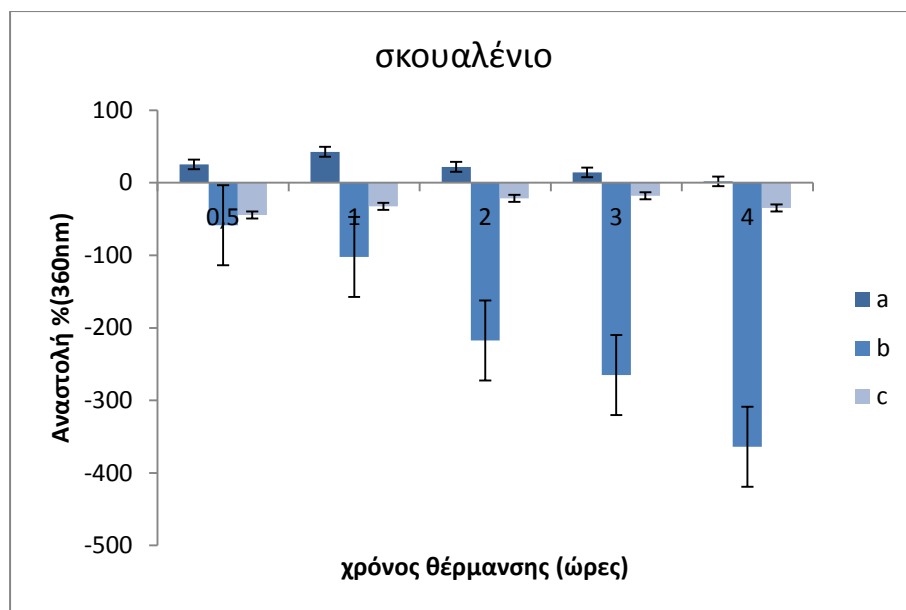
Στο Γράφημα 4.9 απεικονίζεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της α -τοκοφερόλης στην ανάσχεση των προϊόντων που σχηματίζονται κατά το ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης Maillard. Και οι τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις της α -τοκοφερόλης προωθούν την αντίδραση καθόλη τη διάρκεια της θέρμανσης στους 80°C εκτός από τις a και b που οδηγούν σε ανάσχεση της τάξης του 5% στο πρώτο χρονικό σημείο (0,5h).

Η επίδραση του σκουαλενίου



Γράφημα 4.10 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου (a=41μM, b=1643μM, c=2678μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

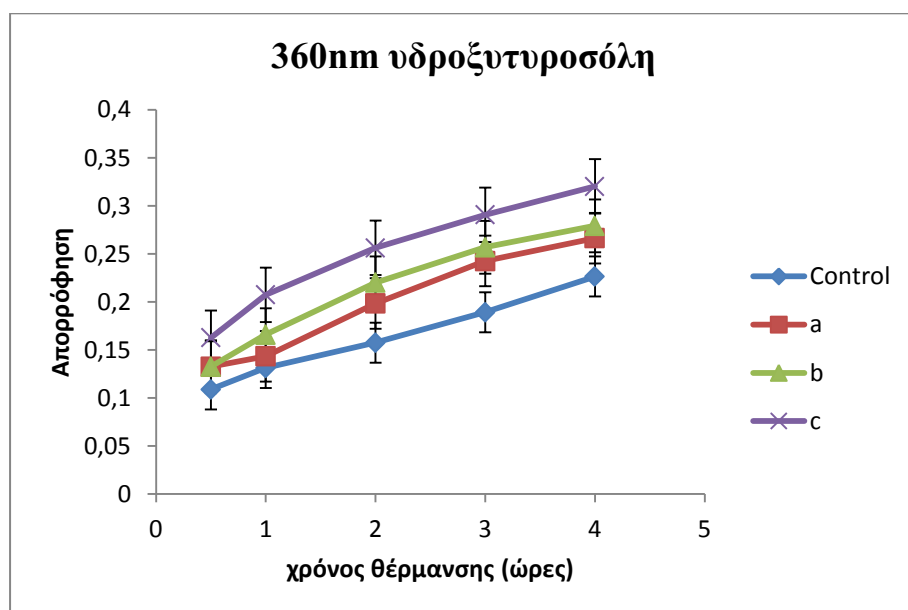
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζης:λυσίνη (0,1M), στο ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του σκουαλενίου. Η επίδραση στα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.11 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου a=41 μ M, b=1643 μ M, c=2678 μ M, στην ανάσχεση (%) των ενδιάμεσων προϊόντων γλυκίωσης (360nm) κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

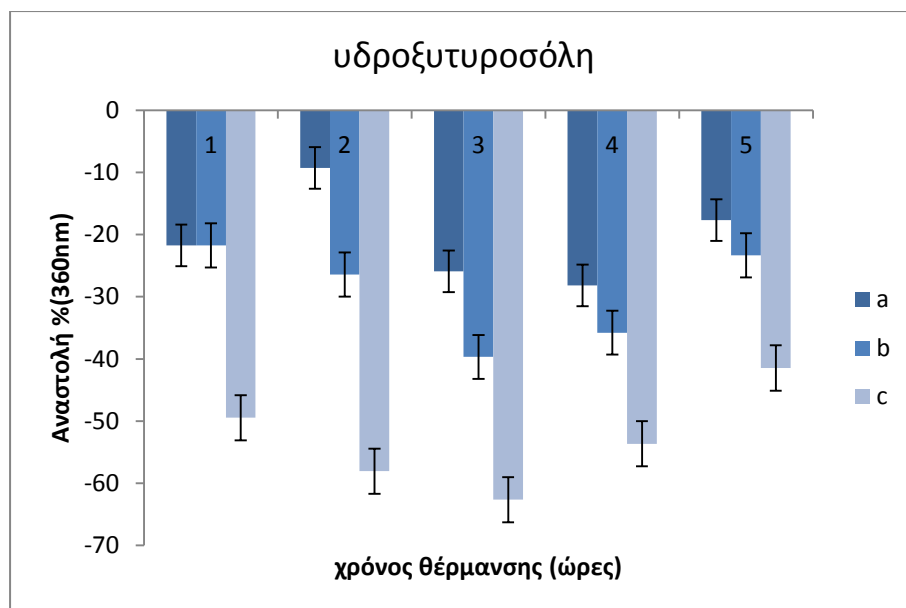
Στο Γράφημα 4.11 απεικονίζεται η ανάσχεση % στο σχηματισμό των ενδιάμεσων προϊόντων της MR (360nm) του μοντέλου γλυκόζη-λυσίνη 0,1M, παρουσία σκουαλενίου. Σύμφωνα με το Γράφημα, μόνο η a συγκέντρωση φαίνεται να ανασχέει την αντίδραση από 25% στο πρώτο χρονικό σημείο (0,5h) έως περίπου 50% μετά από 1 ώρα θέρμανσης στους 80°C. Στα επόμενα σημεία η ανάσχεση μειώνεται στο 14% και 2% στις 3 και 4 ώρες αντίστοιχα. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις b και c που εξετάστηκαν προωθούν το σχηματισμό των προϊόντων της αντίδρασης, με την b να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη επίδραση.

Η επίδραση της υδροξυτυροσόλης



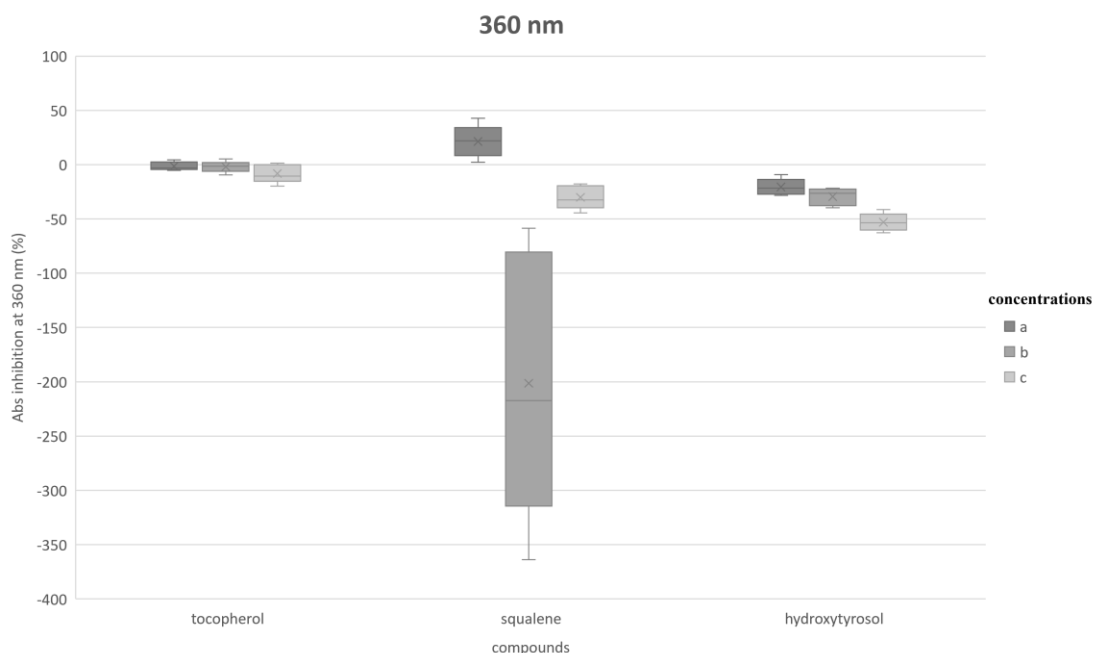
Γράφημα 4.12 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης (a=32μM, b=117μM, c=234μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο ενδιάμεσο στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της υδροξυτυροσόλης. Η επίδραση στα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.13 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης, a=32 μM, b=117 μM, c=234 μM στην ανάσχεση (%) των ενδιάμεσων προϊόντων γλυκίωσης (360nm) κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

Στο Γράφημα 4.13 απεικονίζεται η ανάσχεση % στο σχηματισμό των ενδιάμεσων προϊόντων (360nm) στο μοντέλο γλυκόζη-λυσίνη 0,1M παρουσία υδροξυτυροσόλης. Σε κάθε περίπτωση παρατηρείται προώθηση της αντίδρασης καθόλη τη διάρκεια της θέρμανσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης ευννοείται ο σχηματισμός των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της αντίδρασης.

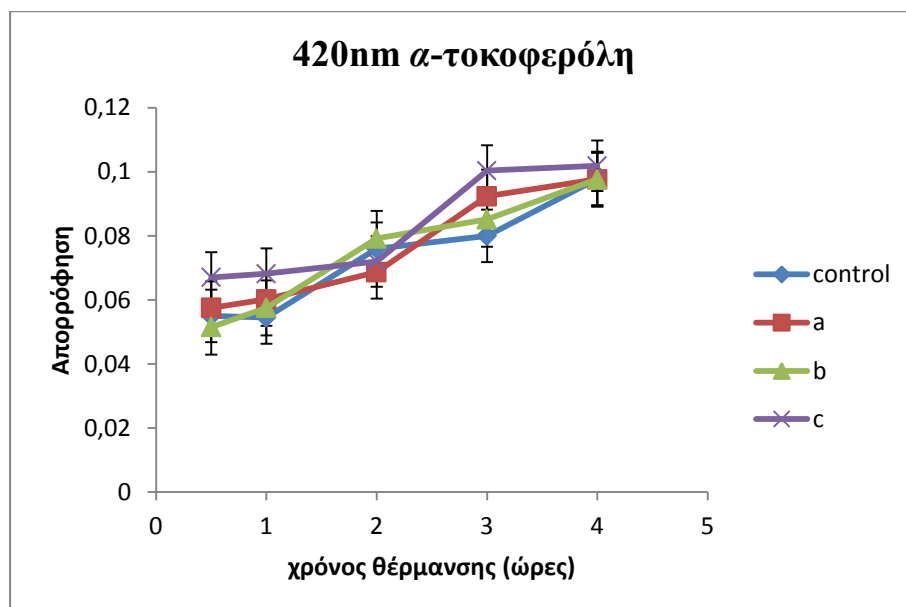


Γράφημα 4.14 Θηκόγραμμα (Box-and-Whiskerplot) που αναπαριστά την ανάσχεση της δημιουργίας των προϊόντων του ενδιάμεσου σταδίου της MR(360nm) στο σύστημα γλυκόζη/λυσίνη (0,1M), στους 80°C, από την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα (*, **, °) εκτός των boxplot υποδεικνύουν ακραίες τιμές.

Από το Γράφημα 4.14 παρατηρείται ότι το ύψος του ορθογωνίου στην περίπτωση της HT, της α-toc και των συγκεντρώσεων a και c του Sq είναι μικρό γεγονός που εξηγεί την μικρή μεταβλητότητα των τιμών ανάσχεσης κατά το διάστημα των 4 h θέρμανσης στους 80°C, ενώ μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρείται μόνο στην περίπτωση της συγκέντρωσης b του Sq. Όσο αφορά τις τιμές ανάσχεσης της τελευταίας περίπτωσης, παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία, καθώς το 50% των παρατηρήσεων βρίσκονται σε ένα διάστημα από περίπου -360 % (minimum) έως περίπου -215 % (median) ενώ το υπόλοιπο 50% βρίσκεται από -215 % (median) έως περίπου -60.% (maximum). Συνολικά παρατηρείται ότι και οι τρεις ενώσεις που εξετάστηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις προωθούν την αντίδραση, εκτός από την συγκέντρωση a του Sq, που παρουσιάζει συμμετρία με τις τιμές να είναι συγκεντρωμένες γύρω από το 22% (median).

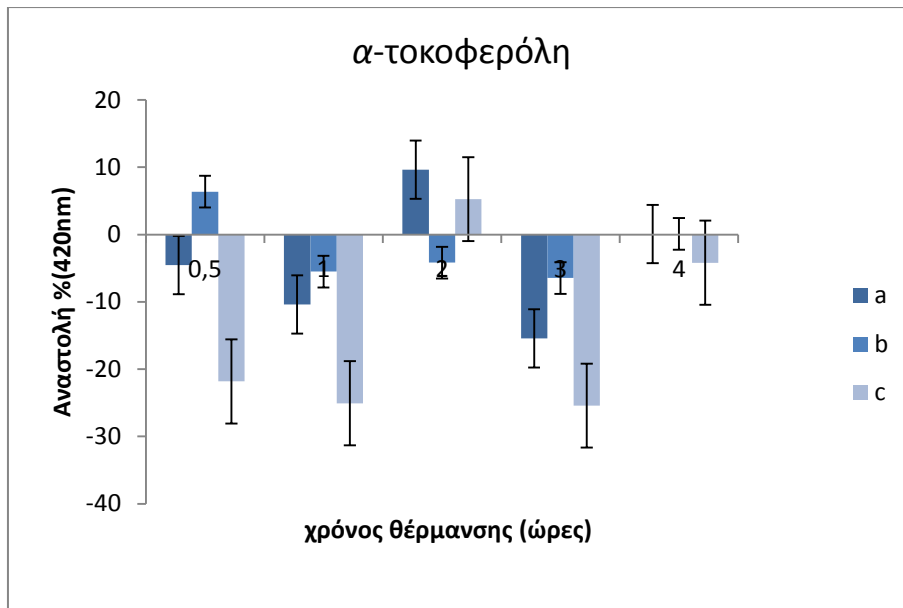
4.1.3. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard (420 nm)

Η επίδραση της α -τοκοφερόλης



Γράφημα 4.15 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης (a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

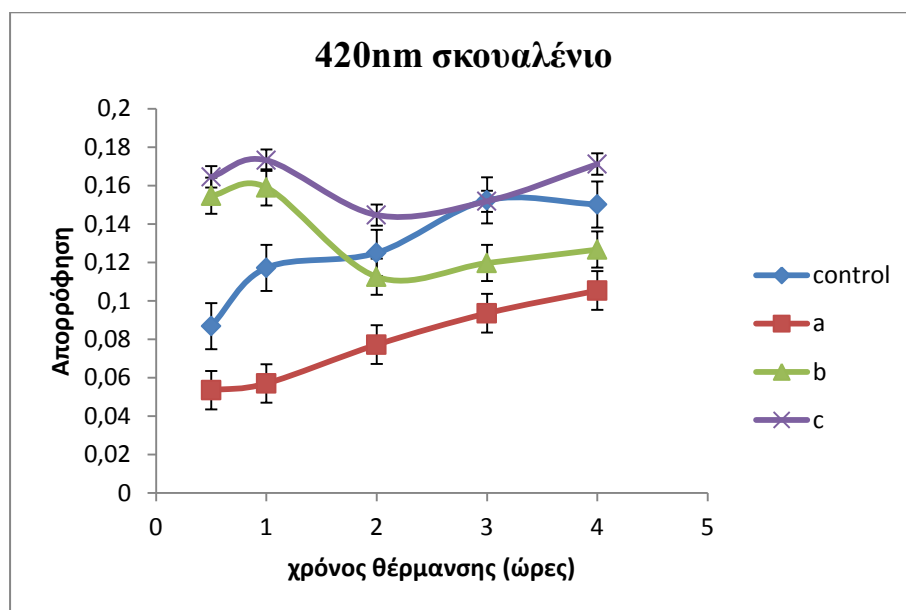
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης. Η επίδραση στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.16 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης, a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M στην ανάσχεση (%) των τελικών προϊόντων γλυκίωσης (420nm) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

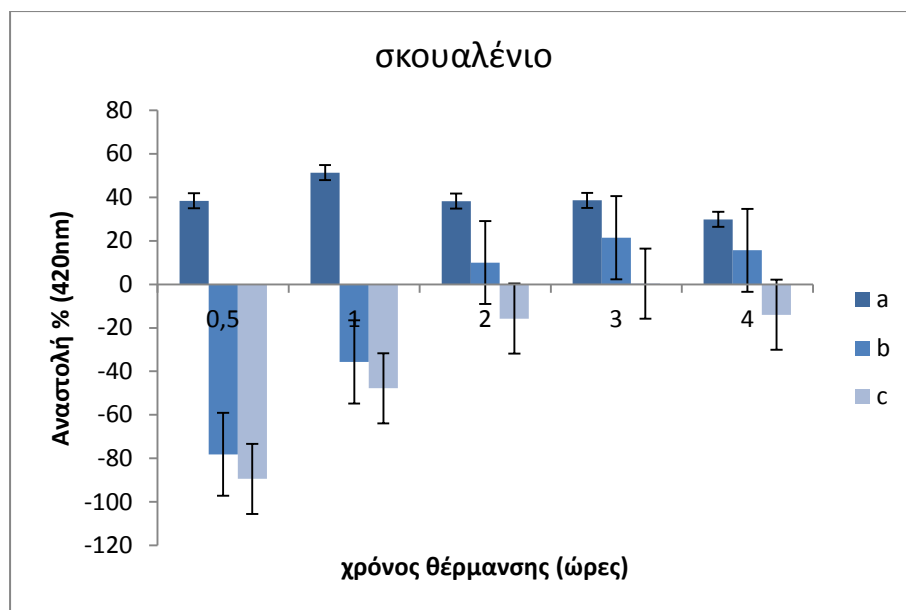
Στο Γράφημα 4.16 απεικονίζεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της α -τοκοφερόλης στην ανάσχεση των προϊόντων που σχηματίζονται κατά το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης Maillard. Οι συγκεντρώσεις a και c φαίνεται να ανασχέουν τον σχηματισμό των προϊόντων του τελικού σταδίου της αντίδρασης, κατά 10% και 5% αντίστοιχα, στις 2 ώρες θέρμανσης στους 80°C χωρίς όμως να παρατηρείται η ίδια δράση στα υπόλοιπα χρονικά σημεία. Αντίθετα η b συγκέντρωση α -τοκοφερόλης οδηγεί σε ανάσχεση της αντίδρασης περίπου 7% μόνο κατά την έναρξη της θέρμανσης (0,5h).

Η επίδραση του σκουαλενίου



Γράφημα 4. Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου (a=41μM, b=1643μM, c=2678μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

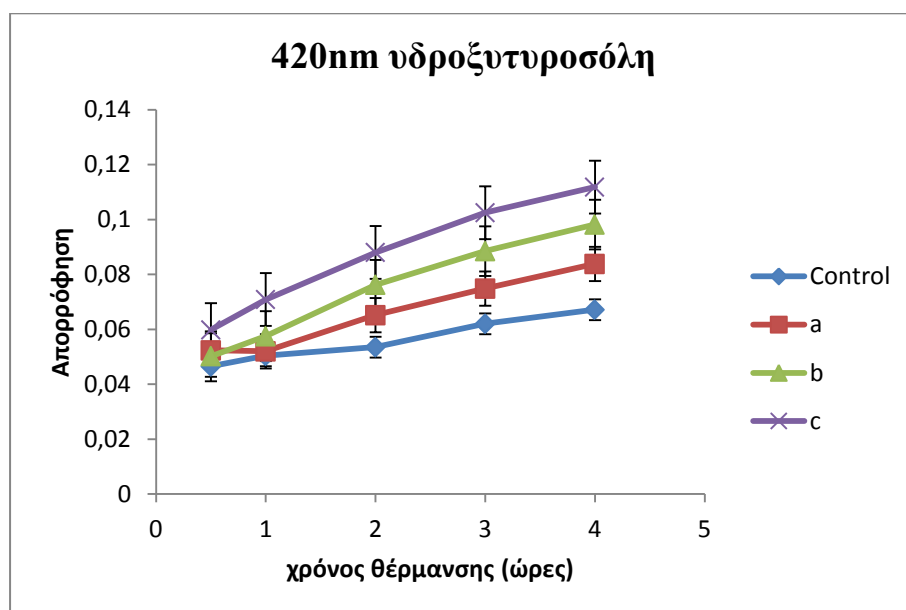
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του σκουαλενίου. Η επίδραση στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.18 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου a=41 μ M, b=1643 μ M, c=2678 μ M, στην ανάσχεση (%) των τελικών προϊόντων γλυκώσεως (420nm) κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

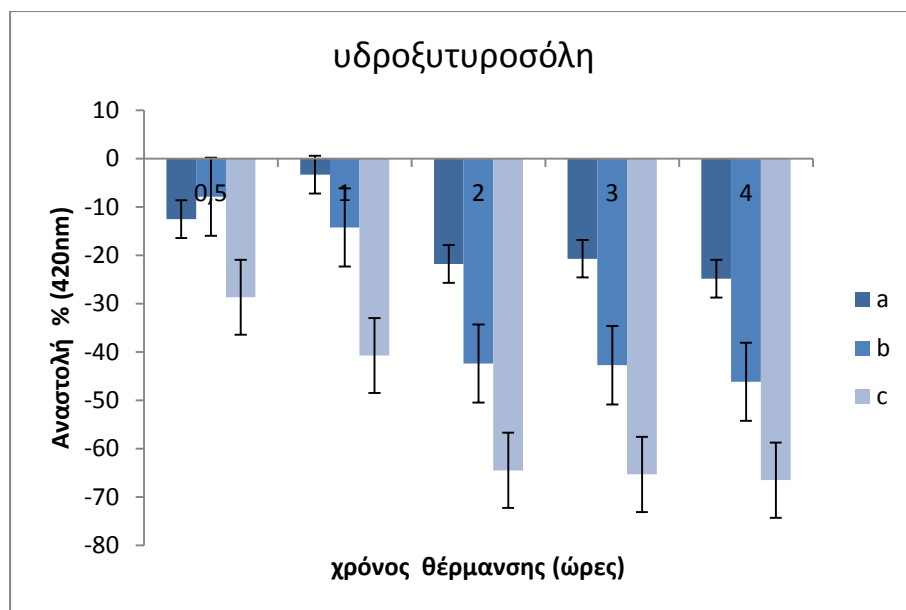
Στο Γράφημα 4.18 απεικονίζεται η ανάσχεση % στο σχηματισμό των τελικών προϊόντων της MR (420nm) του μοντέλου γλυκόζη-λυσίνη 0,1M παρουσία σκουαλενίου. Σύμφωνα με το Γράφημα 4.18 η a συγκέντρωση φαίνεται να ανασχέει την αντίδραση σε όλα τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν. Η ανάσχεση λαμβάνει τιμή κοντά στο 60% στην 1^η ώρα θέρμανσης ενώ στις 4 ώρες θέρμανσης στους 80°C καταλήγει περίπου στο 25%. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις b και c που εξετάστηκαν προωθούν το σχηματισμό των προϊόντων της αντίδρασης στις πρώτες δύο ώρες περίπου. Η b συγκέντρωση σκουαλενίου από το χρονικό σημείο των 2 ωρών και έως το τέλος της αντίδρασης ανασχέει το σχηματισμό των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR έως και 20% (3h). Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε ανάσχεση από την c συγκέντρωση σκουαλενίου σε κανένα χρονικό σημείο.

Η επίδραση της Υδροξυτυροσόλης



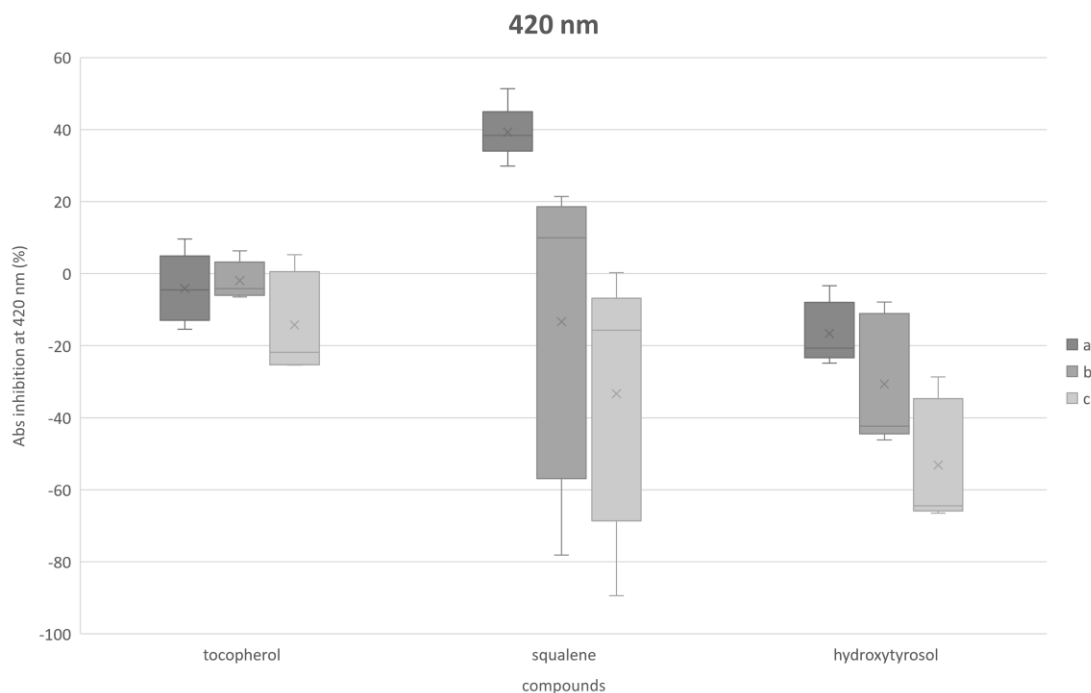
Γράφημα 4.19 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης (a=32μM, b=117μM, c=234μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζονται οι απορροφήσεις του συστήματος γλυκόζης:λυσίνη (0,1M), στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της υδροξυτυροσόλης. Η επίδραση στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.20 Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης, a=32 μ M, b=117 μ M, c=234 μ M στην ανάσχεση (%) των τελικών προϊόντων γλυκίωσης (420 nm) κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

Στο Γράφημα 4.20 απεικονίζεται η ανάσχεση % σχηματισμού των τελικών προϊόντων (420nm) στο μοντέλο γλυκόζη-λυσίνη 0,1M παρουσία ΗΤ. Σύμφωνα με το γράφημα δεν φαίνεται να υπάρχει ανάσχεση (%) από την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται προώθηση της αντίδρασης.

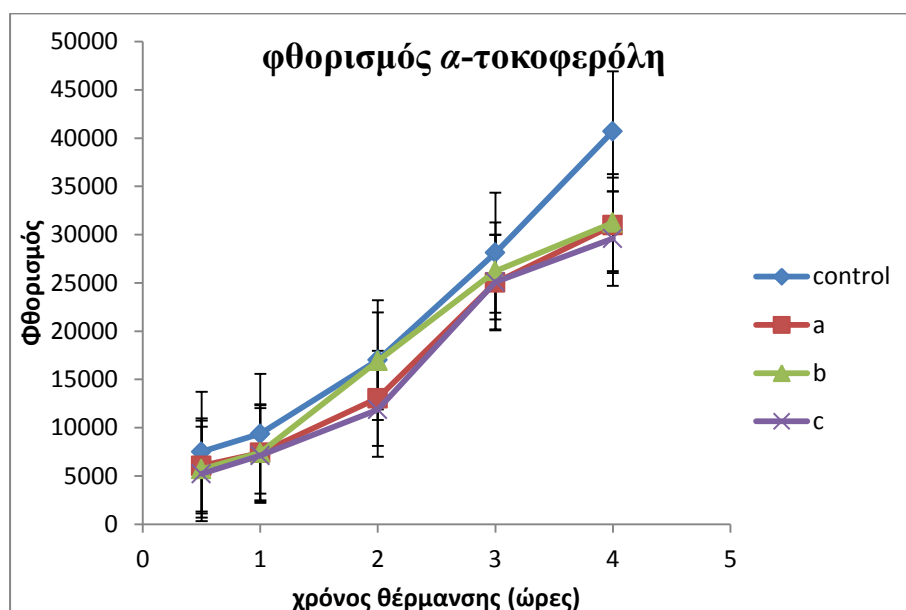


Γράφημα 4.21 Θηκόγραμμα (Box-and-Whiskerplot) που αναπαριστά την ανασχεση της δημιουργίας των προϊόντων του τελικού σταδίου της MR(420 nm) στο σύστημα γλυκόζη/λυσίνη (0,1M) , στους 80°C, από την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαίσιου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα (*, **, °) εκτός των boxplot υποδεικνύουν ακραίες τιμές.

Σύμφωνα με το θηκόγραμμα (Γράφημα 4.21) οι διάμεσες τιμές της α-τοσπαρουσιάζουνητική ασυμμετρία καιβρίσκονται κάτω από το μηδέν, με τις περισσότερες τιμές να συγκεντρώνονται προς το Q3 και στις τρεις περιπτώσεις. Στην περίπτωση της a συγκέντρωσης τουSq παρατηρείται θετική ασυμμετρία και μικρό ύψος του ορθογωνίου, δηλαδή μικρή μεταβλητότητα των τιμών, με την διάμεση τιμή για την ανασχεση της αντίδρασης, να είναι στο 38%. Αντίθετα μεγάλη μεταβλητότητα παρατηρείται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Sq (b και c), καθώς τα ύψη των ορθογωνίων είναι μεγάλα. Πιο συγκεκριμέναη διάμεση τιμή της ανασχεσης στην περίπτωση της b συγκέντρωσης του Sq είναι στο 10% και παρατηρείται αρνητική ασυμμετρία και μεγάλη μεταβλητότητα προς το Q1. Το ίδιο συμβαίνει και με την προσθήκη της c συγκέντρωσης του Sq η οποία έχει διάμεση τιμή κάτω του 0. Όσο αφορά την HT, παρατηρείται προώθηση της αντίδρασης. Τα ορθογώνια παρουσιάζουν θετική ασυμμετρία. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης προωθείται η αντίδραση.

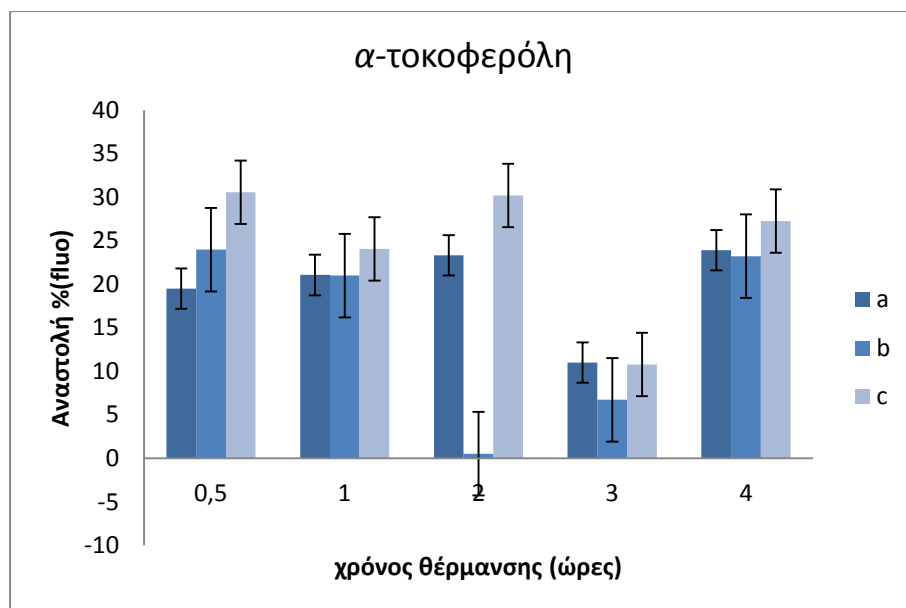
4.1.4. Επίδραση της προσθήκης βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στον φθορισμό

Η επίδραση της α -τοκοφερόλης στον φθορισμό



Γράφημα 4.22 Οι τιμές της απορρόφησης συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης (a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

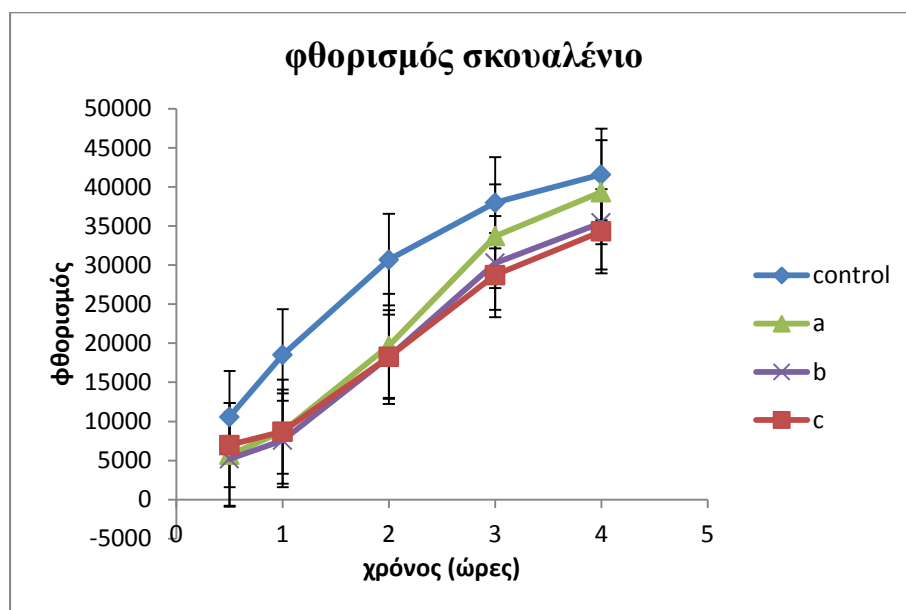
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται ο φθορισμός των προϊόντων της αντίδρασης, του συστήματος γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης. Η επίδραση στον φθορισμό της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.23 Ανάσχεση (%) του φθορισμού από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων α -τοκοφερόλης, a=16 μ M, b=29 μ M, c=58 μ M κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

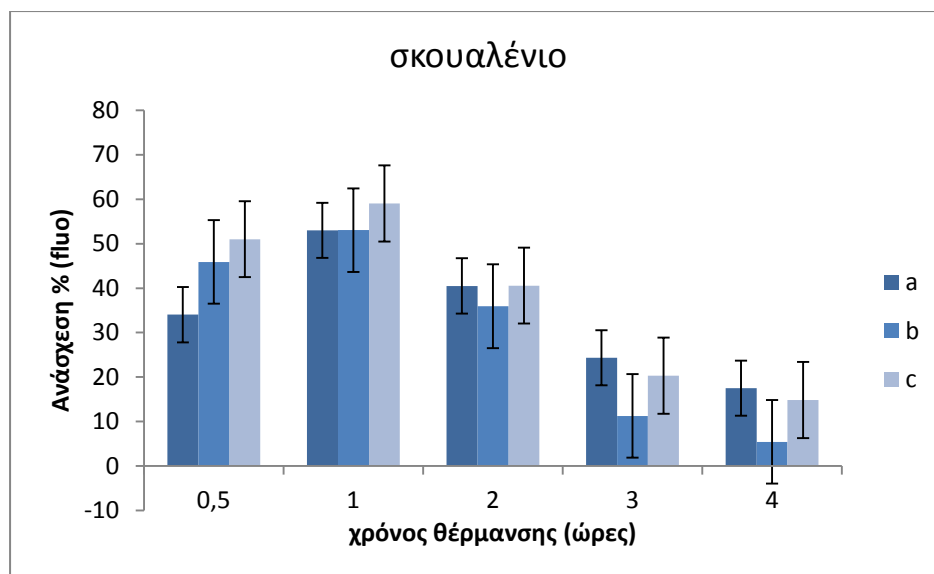
Στο Γράφημα 4.23 απεικονίζεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της α -toc στην ανάσχεση της ακτινοβολίας του φθορισμού. Όλες οι συγκεντρώσεις ανασχέουν τον σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων οι οποίες συνδέονται και με την παρουσία των AGEs στο σύστημα. Περισσότερο αποτελεσματική φαίνεται να είναι η c συγκέντρωση όπου παρατηρείται ότι δρα ανασταλτικά ακόμα και μετά από 4 ώρες θέρμανσης στους 80°C (ανάσχεση 30% περίπου). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και από την a συγκέντρωση.

Η επίδραση του σκουαλενίου στον φθορισμό



Γράφημα 4.24 Οι τιμές του φθορισμού, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου (a=41μM, b=1623μM, c=2678μM) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

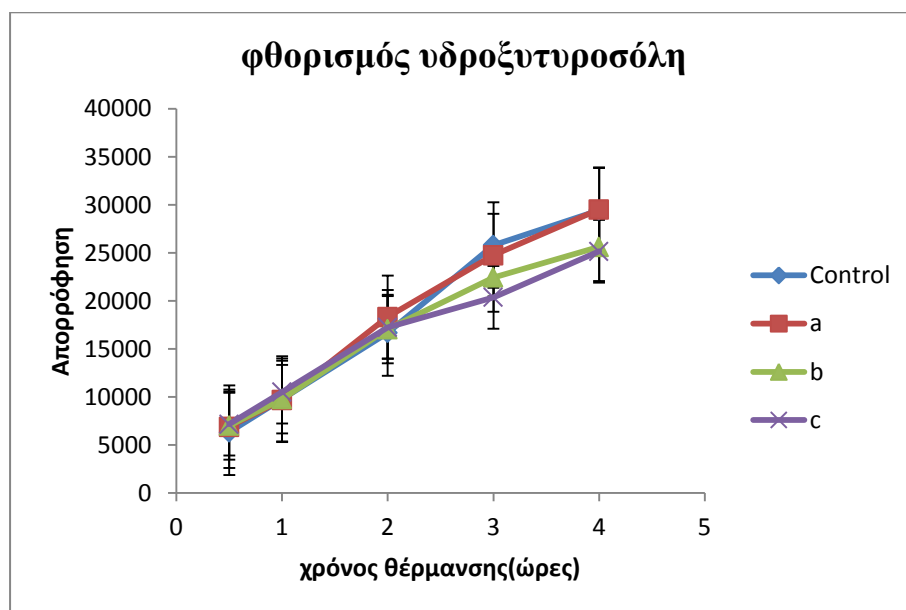
Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται ο φθορισμός των προϊόντων της αντίδρασης, του συστήματος γλυκόζης:λυσίνη (0,1M), έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του σκουαλενίου. Η επίδραση στον φθορισμό της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.25 Ανάσχεση (%) του φθορισμού από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου a=41 μ M, b=1643 μ M, c=2678 μ M, κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

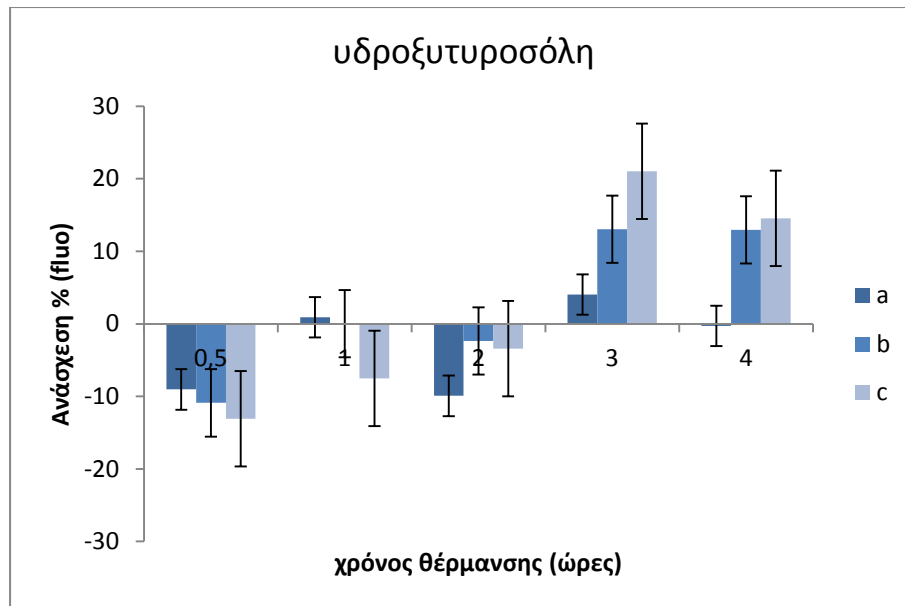
Στο Γράφημα 4.25 απεικονίζεται η ανάσχεση % στον σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων παρουσία σκουαλενίου. Οι τρεις συγκεντρώσεις S_q που εξετάστηκαν επηρέασαν με τον ίδιο τρόπο την ένταση του φθορισμού. Σύμφωνα με το διάγραμμα μέγιστες τιμές ανάσχεσης και από τις 3 συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν κατά την 1^η ώρα θέρμανσης που κυμαίνονται από 53% έως περίπου 60% (για τις a, b και c αντίστοιχα).

Η επίδραση της Υδροξυτυροσόλης στον φθορισμό



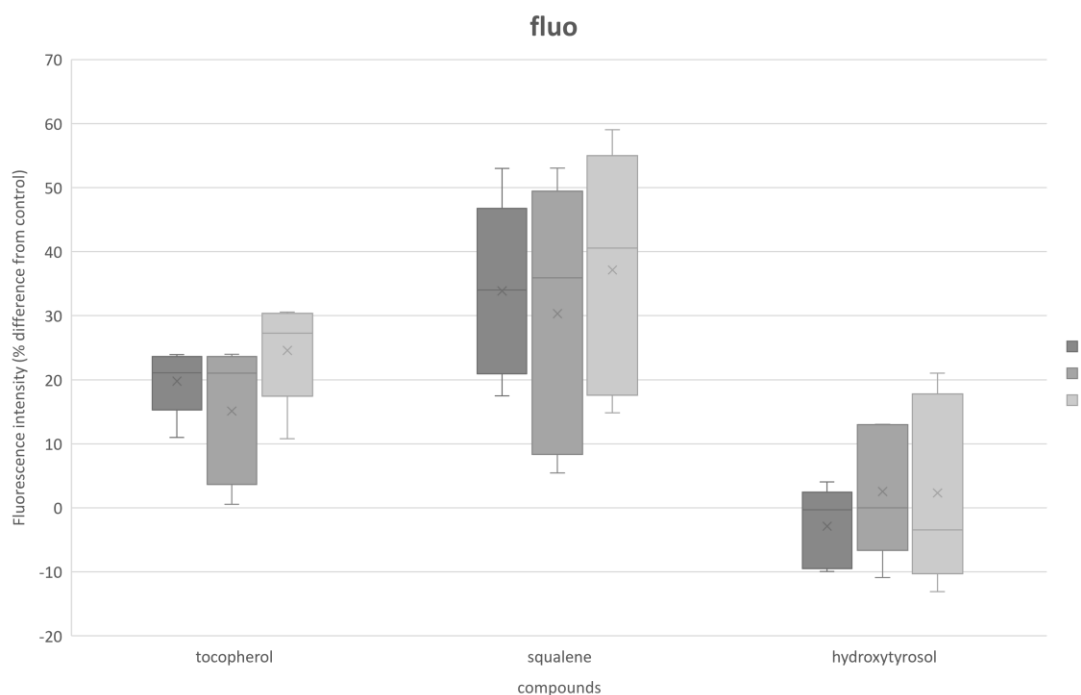
Γράφημα 4.26 Οι τιμές του φθορισμού, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M) από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης (a=33 μ M, b=117 μ M, c=234 μ M) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h.

Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται ο φθορισμός των προϊόντων της αντίδρασης, του συστήματος γλυκόζης:λυσίνη (0,1M), έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της υδροξυτυροσόλης. Η επίδραση στον φθορισμό της αντίδρασης, έπειτα από την προσθήκη των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλυτικότερα περιγράφεται παρακάτω.



Γράφημα 4.27 Ανάσχεση (%) της έντασης του φθορισμού από την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσώλης, a=32 μ M, b=117 μ M, c=234 μ M κατά τη θέρμανση στους 80° C για 4h, συστήματος γλυκόζης:λυσίνης (0,1M)

Στο Γράφημα 4.27 απεικονίζεται η ανάσχεση στο σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων και συνεπώς και των AGEs. Από το Γράφημα παρατηρείται ότι οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις b και c έδρασαν ανασταλτικά μετά από 3 ώρες θέρμανσης στους 80°C. Στα προηγούμενα χρονικά σημεία η παρουσία HT προωθεί τον φθορισμό. Μέγιστη ανάσχεση (21%) σημειώθηκε από τη χρήση της c συγκέντρωσης στις 3 ώρες θέρμανσης στους 80°C.

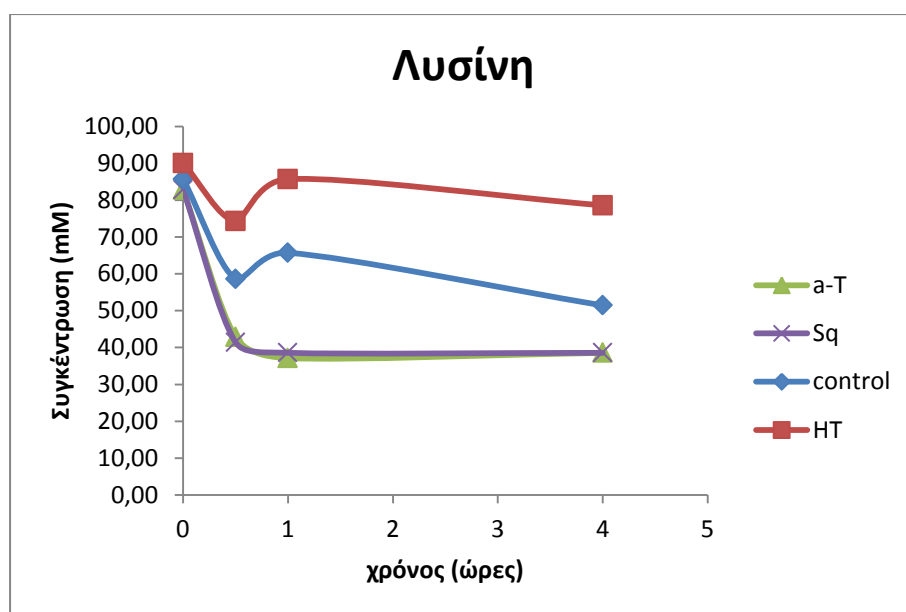


Γράφημα 4.28 Θηκόγραμμα (Box-and-Whiskerplot) που αναπαριστά την ανάσχεση της έντασης του φθορισμού στο σύστημα γλυκόζη:λυσίνη (0,1M), στους 80°C, από την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοδραστικών ενώσεων του ελαιόλαδου. Η αρχή και το τέλος του πλαισίου-κουτιού απεικονίζουν το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο αντίστοιχα (Q1 και Q3), ενώ η γραμμή μέσα στο κουτί τη διάμεσο. Τα σύμβολα (*, **, °) εκτός των boxplot υποδεικνύουν ακραίες τιμές.

Από το θηκόγραμμα (Γράφημα 4.28) παρατηρείται ότι η προσθήκη α -toc και Sq παρεμπόδιε αποτελεσματικά το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων. Λιγότερο αποτελεσματικά έδρασε η HT για την οποία φαίνεται ότι η συμπεριφορά της εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Τα ορθογώνια στην περίπτωση της α -toc παρουσιάζουν αρνητική ασυμμετρία, με τις διάμεσες τιμές ανάσχεσης του φθορισμού να είναι ίσες με 21% για τις a και b και 27% για την c. Τα δεδομένα στην περίπτωση του Sq έχουν την μεγαλύτερη διασπορά που εξηγεί και το μεγάλο ύψος των ορθογωνίων. Οι διάμεσες τιμές ανάσχεσης του φθορισμού μετά από την προσθήκη των a, b και c συγκεντρώσεων Sq είναι ίσες με 34%, 35% και 40% αντίστοιχα. Τέλος στην περίπτωση της HT οι διάμεσες τιμές ανάσχεσης φθορισμού είναι αρνητικές. Παρατηρείται πως αυξανόμενης της συγκέντρωσης της HT, αυξάνει η διασπορά των τιμών και μειώνεται η τιμή της διαμέσου.

4.1.4. Παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης Maillard με ενόργανες μεθόδους-Προσδιορισμός της λυσίνης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Στο Γράφημα 4.29 παρουσιάζεται η μείωση της συγκέντρωσης λυσίνης του συστήματος κατά τη θέρμανση στους 80°C για διάστημα 4 ωρών με την προσθήκη α -τοκοφερόλης 58 μ M (c συγκέντρωση), υδροξυτυροσόλης 117 μ M (b συγκέντρωση) και σκουαλενίου 2678 μ M (c συγκέντρωση).



Γραφημα 4.29 Η συγκέντρωση της λυσίνης στο σύστημα γλυκόζη:λυσίνη 0,1M παρουσία α -Toc, Sq και HT έπειτα από θέρμανση στους 80°C

Όπως φαίνεται στο Γράφημα, σε κάθε περίπτωση η λυσίνη αντιδρά γρήγορα κατά την πρώτη μισή ώρα της θέρμανσης ενώ στη συνέχεια η συγκέντρωσή της παραμένει σταθερή (plateau). Επιπλέον ο ρυθμός μείωσης από τη παρουσία των τριών βιοδραστικών ενώσεων ήταν διαφορετικός. Η προσθήκη των α -toc και Sq αύξησε το ρυθμό απώλειας λυσίνης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control) και στα τρία χρονικά σημεία (0,5 hr, 1hr, 4hr) που εξετάστηκαν. Με την προσθήκη της HT ο ρυθμός απώλειας λυσίνης ήταν μικρότερος με αποτέλεσμα μετά από 4 ώρες θέρμανσης να έχει παραμείνει το 95% λυσίνης στο σύστημα. Με την προσθήκη της α -toc (c =58,0 μ M) και του Sq (c =2678,2 μ M) το ποσοστό της λυσίνης που δεν αντέδρασε βρέθηκε ίσο με 47%, ενώ στο δείγμα ελέγχου (control) το αντίστοιχο ποσοστό ήταν ίσο με 62%.

Κεφάλαιο Ε

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση των βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου στο σχηματισμό προϊόντων μη ενζυματικής γλυκίωσης. Οι σχετικές μελέτες στη βιβλιογραφία είναι περιορισμένες. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με τη χρήση μη εκλεκτικών μεθόδων όπως είναι η μέτρηση της έντασης της απορρόφησης στα 280, 360 και 420nm και της έντασης του φθορισμού (excitation/emission 370/430nm), σε 5 διαφορετικά χρονικά σημεία: 30min, 60min, 120min, 180min, 240min. Επιπλέον εξετάστηκε η απώλεια λυσίνης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης όταν στο σύστημα. Η θερμοκρασία των 80°C και ο χρόνος θέρμανσης επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά των ήπιων-αργών διαδικασιών μαγειρέματος, όπως αυτές που επιτυγχάνονται σε παραδοσιακά πήλινα δοχεία (70-80°C) που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής γαστρονομικής παράδοσης (Pellegrini and Fogliano, 2017).

α-Τοκοφερόλη

Η προσθήκη α-τοκοφερόλης στο υπό εξέταση σύστημα γλυκόζης-λυσίνης 1:1 παρεμπόδισε αποτελεσματικά την εξέλιξη του αρχικού σταδίου της αντίδρασης ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση ή έδρασε προωθητικά στα επόμενα στάδια. Πιο συγκεκριμένα οι μικρότερες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (a και b) ανάσχεσαν τον σχηματισμό των προϊόντων του αρχικού σταδίου της αντίδρασης, κατά 100% κατά το πρώτο χρονικό σημείο (0,5h) και έως περίπου 20% μετά από 3 ώρες θέρμανσης στους 80°C. Όσο αφορά στην ανάσχεση της δημιουργίας φθοριζουσών προϊόντων, μιας ιδιότητας που σχετίζεται με τα προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (AGEs) η α-τοc φάνηκε αποτελεσματική όπως και το Sq χωρίς όμως η δράση αυτή να σχετίζεται με τη συγκέντρωση. Από τον προσδιορισμό της λυσίνης που δεν αντέδρασε όταν στο σύστημα προστέθηκε η συγκέντρωση α-τοc διαπιστώθηκε ότι η απώλεια λυσίνης ήταν μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρήθηκε στο σύστημα ελέγχου καθόλη τη διάρκεια της θέρμανσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η α-τοc ανήκει στις ενώσεις οι οποίες μπορούν να διακόψουν την διασταυρούμενη σύνδεση που προκύπτει κατά την δημιουργία των AGEs ενώ δεν φαίνεται να εμπλέκεται σε αντιδράσεις δέσμευσης της αμινομάδας (Uribarri et al., 2015). Επιπλέον όπως διαπιστώθηκε από την ανάσχεση

του αρχικού σταδίου της MR η α -τοκοφερόλη παρεμποδίζει την καρβονυλοάμινο συμπύκνωση πιθανώς ανάγωντας την καρβονυλομάδα, ενώ δεν είναι δραστική στα μετέπειτα στάδια, κατά τις αντιδράσεις αφυδάτωσης και κατακερματισμού των σακχάρων.

Η α -toc παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση χάρη στο φαινολικό υδροξύλιο του χρωμανίου. Από τη βιβλιογραφία έχει αποδειχθεί ότι διάφοροι αναγωγικοί παράγοντες, όπως η α -toc, όταν βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ένα σύστημα μπορούν να δράσουν και προοξειδωτικά. Για παράδειγμα, σε σύστημα μοντέλου σογελαιίου, η α -toc έδρασε προοξειδωτικά. Κάτι τέτοιο, μπορεί να εξηγήσει σε ένα βαθμό, την δράση της α -τοκοφερόλης στην εν λόγω μελέτη (Wijewickreme, A. N., & Kitts, D. D. 1998). Σε κάθε περίπτωση απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης της.

Υδροξυτυροσόλη

Η προσθήκη της υδροξυτυροσόλης (HT) κατά τη θέρμανση στους 80°C του συστήματος γλυκόζης-λυσίνης 1:1 προώθησε το σχηματισμό των προϊόντων και των τριών σταδίων της αντίδρασης MR. Ειδικότερα παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της HT ευνοείται ο σχηματισμός των προϊόντων του ενδιάμεσου και τελικού σταδίου της αντίδρασης. Όσο αφορά την επίδραση στο σχηματισμό φθοριζουσών προϊόντων διαπιστώθηκε ότι ο παράγοντας συγκέντρωση ήταν σημαντικός. Οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις b (117 μ M) και c (234 μ M) έδρασαν ανασταλτικά μετά από 2 ώρες θέρμανσης στους 80°C. Όσο αφορά την απώλεια λυσίνης όταν προστέθηκε η b συγκέντρωση (117 μ M) HT, διαπιστώθηκε ότι ήταν μικρότερη από κάθε άλλη περίπτωση (σύστημα ελέγχου, α -toc c =58 μ M και Sq c =2678 μ M) με αποτέλεσμα μετά από 4 ώρες θέρμανσης στους 80°C να έχει παραμείνει το 95% λυσίνης στο σύστημα. Από αυτό, ίσως μπορεί να γίνει η διαπίστωση ότι η HT προστατεύει δραστικά την αμινομάδα υπό τις συνθήκες θέρμανσης που εξετάστηκαν και παραμένει δραστική παρεμποδίζοντας την διασταυρούμενη σύνδεση μετά από 2 ώρες θέρμανσης στους 80°C.

Η HT έχει μελετηθεί περισσότερο συγκριτικά με την α -τοκοφερόλη και το σκουαλένιο ως προς την αντιγλυκαιμική της δράση και την ανάσχεση των AGEs. Οι πολυφαινόλες οφείλουν την αντιοξειδωτική τους δράση στο φαινολικό υδροξύλιο, και μπορούν να προστατεύσουν από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που

δημιουργούνται κατά την αντίδραση Maillard, επιβραδύνοντας με αυτόν τον τρόπο την γλυκίωση και την παραγωγή των AGEs. Πιθανότατα, μπορούν να συνδέονται με την πρωτεΐνη-στόχο της γλυκίωσης, δρώντας έτσι ανταγωνιστικά με το σάκχαρο αποτρέποντας την αντίδραση του σακχάρου με τη λυσίνη (Vlassopoulos et al., 2014). Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά που αναφέρονται την βιβλιογραφία. Στη μελέτη των Navarro, Francisco (2016), διαπιστώθηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης στη δέσμευση της γλυοξάλης και της μεθυλογλυοξάλης, κατά τη θέρμανση στους 37°C μετά από 168 ώρες επώασης. Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να έχει ανασταλτική δράση σε φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού, όμως στις συνθήκες μαγειρέματος ή επεξεργασίας των τροφίμων φαίνεται πως χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση.

Οι 80°C θεωρούνται μία αρκετά αντιπροσωπευτική θερμοκρασία μαγειρέματος ειδικότερα για την μεσογειακή διατροφή και μπορεί να διευκολύνει την ανασταλτική δράση ορισμένων ουσιών και σε κάποιες περιπτώσεις να την αποτρέψει (Pellegrini ; Fogliano 2017). Είναι γνωστό πως οι ενώσεις που περιέχουν φαινολικό δακτύλιο, υπό συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης όπως για παράδειγμα θερμοκρασίας ή/και συγκέντρωσης, μπορούν εύκολα και γρήγορα να δράσουν προοξειδωτικά, κατ'επέκταση να προωθήσουν και την αντίδραση γλυκίωσης (Eunok Choe; David B. Min 2009).

Σκουαλένιο

Η προσθήκη Sq στο υπό εξέταση σύστημα γλυκόζης-λυσίνης 1:1 παρεμπόδισε την εξέλιξη και των τριών σταδίων της αντίδρασης MR. Όπως προέκυψε η δράση αυτή ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αφού στις περισσότερες περιπτώσεις πιο δραστική ήταν η μικρότερη συγκέντρωση ($a=41\mu\text{M}$). Η παρουσία αυτού του τριτερπενικού υδρογονάνθρακα (και στις τρεις υπό εξέταση συγκεντρώσεις a, b και c) ανασχέει το σχηματισμό φθοριζουσών ενώσεων, και συνεπώς και των ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των AGEs. Η απώλεια λυσίνης ήταν μεγαλύτερη από 50% μετά από 4h θέρμανσης στους 80°C (όπως παρατηρήθηκε και στην α -toc). Από το τελευταίο φαίνεται ότι το Sq δεν εμπλέκεται σε αντιδράσεις δέσμευσης της αμινομάδας.

Το σκουαλένιο διαθέτει στη δομή του ομάδες μεθυλενίου και σε αυτό μπορεί να οφείλεται η αναστολή που παρατηρείται (Giuseppe Ruberto; Maria T Baratta, 2000) και η ικανότητά του να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Amarowicz 2009). Για παράδειγμα οι Naziri et al. (2016), μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του σκουαλενίου και της α -τοκοφερόλης προερχόμενα από έλαιο κολοκύθας και πράγματι διαπιστώθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση. Μία πρόσφατη έρευνα των Vlassopoulos et al. (2022), που πραγματοποιήθηκε σε παρόμοιες συνθήκες με την παρούσα μελέτη, έδειξε πως οι τερπενοειδείς ενώσεις σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να ρυθμίζουν τις αντιδράσεις Maillard σε συγκεκριμένα στάδια. Επιπλέον, το σκουαλένιο είναι μία σχετικά σταθερή ένωση που δεν επηρεάζεται εύκολα από τις υψηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα σε συνθήκες ψησίματος ή τηγανίσματος δεν παρατηρείται σημαντική απώλεια.

Εν κατακλείδι, η μελέτη αυτή δημιουργεί νέα ερωτήματα για μελλοντική έρευνα. Οι βιοδραστικές ενώσεις του ελαιολάδου μπορούν να έχουν αντιγλυκαιμική ή προγλυκαιμική δράση, ανάλογα με τις συνθήκες και τη συγκέντρωσή τους. Σε κάθε περίπτωση τα ευρήματα δείχνουν να είναι ελπιδοφόρα όσον αφορά το σκουαλένιο, έναντι της αντίδρασης Maillard ενώ η υδροξυτυροσόλη, δείχνει να είναι αποτελεσματική στην παρεμπόδιση της απώλειας λυσίνης. Η βιομηχανία των τροφίμων θα επωφεληθεί από την χρήση φυσικών αναστολέων της αντίδρασης MR, γι αυτό είναι απαραίτητο να βρεθούν οι κατάλληλες ενώσεις, στην κατάλληλη συγκέντρωση, θερμοκρασία και χρόνο θέρμανσης. Οι παράγοντες που μόλις αναφέρθηκαν διερευνήθηκαν στην παρούσα μελέτη, με στόχο να συνεχίσουν να διερευνώνται περισσότερο μελλοντικά.

Κεφάλαιο ΣΤ

6.1.Συμπεράσματα

Το σκουαλενίο, η υδροξυτυροσόλη και η α -τοκοφερόλη είναι βιοδραστικά συστατικά του ελαιολάδου που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν ή να προωθούν την αντίδραση Maillard. Η μελέτη κατέληξε στα εξής:

- Έπειτα από την προσθήκη της a συγκέντρωσης του σκουαλενίου ανασχέεται η αντίδραση κατά το αρχικό (280nm), το ενδιάμεσο (360 nm) αλλά και το τελικό (420 nm) στάδιο
- Κατά κύριο λόγο, αυξανόμενης της προσθήκης της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης, δημιουργείται προώθηση της αντίδρασης
- Με την προσθήκη της a και της b συγκέντρωση της α -τοκοφερόλης υπήρξε αντιγλυκαντική δράση κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης

Ωστόσο, η ακριβής δράση του σκουαλενίου, της υδροξυτυροσόλης και της α -τοκοφερόλης στην αντίδραση Maillard, είναι πιο περίπλοκη και εξαρτάται σημαντικά από τις συνθήκες της αντίδρασης. Η έρευνα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Κεφάλαιο Z

Βιβλιογραφία

Boskou, D., 2015. Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents, in: Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. Elsevier, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50007-0>

Carabasa-Giribet M, Ibarz-Ribas A. 2000. Kinetics of color development in aqueous glucose systems at high temperatures. *J Food Eng* 44 (3): 181–189.

Cengiz, Serdar; Kırmıroğlu, Cemalettin; Şebi, Nur; Şatak, Jale; Yaman, Mustafa (2020). Determination of the most potent precursors of advanced glycation end products (AGEs) in chips, crackers, and breakfast cereals by high performance liquid chromatography (HPLC) using precolumn derivatization with 4-nitro-1,2-phenylenediamine. *Microchemical Journal*

Chao, P., Hsu, C., & Yin, M. (2009). Analysis of glycative products in sauces and sauce-treated foods. *Food Chemistry*, 113 (1), 262–266.

Delgado-andrade, C. (2015). Carboxymethyl-lysine: Thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food Funct.*, doi:10.1039/C5FO00918A

Eunok Choe; David B. Min (2009). Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. , 8(4), 345–358. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00085.

Francisco J. Hidalgo; Rosario Zamora (2005). Interplay between the Maillard Reaction and Lipid Peroxidation in Biochemical Systems. , 1043 (none), 319–326. doi:10.1196/annals.1333.039

G.L.J. Hull, J.V. Woodside, J.M. Ames and G.J. Cuskelly, Nε-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a western style diet, *Food Chem.*, 2012

Giuseppe Ruberto; Maria T Baratta (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. , 69(2), 167–174. doi:10.1016/s0308-8146(99)00247-2

Han, L., Li, L., Li, B., Zhao, D., Li, Y., Xu, Z., Liu, G., 2013. Glyoxal derived from triglyceride participating in diet-derived Nε-carboxymethyllysine formation. *Food Res. Int.* 51, 836–840. doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.051

Khan, M., Liu, H., Wang, J., Sun, B., 2020. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. *Food Res. Int.* 130, doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933

Knauer, Application Note: Determination of Amino acids by UHPLC with automated OPA Derivatization by the Autosampler, 2012

Lima, M., Assar, S.H., Ames, J.M., 2010. Formation of Nε-(Carboxymethyl)lysine and Loss of Lysine in Casein Glucose–Fatty Acid Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1954–1958. <https://doi.org/10.1021/jf903562c>

- 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*, Issue 66, pp. 2065-2070.
- Martins, S. I. F. S., Van Jongen, W. M. F., Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Tech.* 11: 364–373
- Mikrou, Theano; Pantelidou, Elisavet; Parasyri, Niki; Papaioannou, Andreas; Kapsokefalou, Maria; Gardeli, Chrysavgi; Mallouchos, Athanasios (2020). Varietal and Geographical Discrimination of Greek Monovarietal Extra Virgin Olive Oils Based on Squalene, Tocopherol, and Fatty Acid Composition. *Molecules*, 25(17), doi:10.3390/molecules25173818
- Mildner-Szkudlarz, Sylwia; Siger, Aleksander; Szwengiel, Artur; Przygoński, Krzysztof; Wojtowicz, Elżbieta; Zawirska-Wojtasiak, Renata (2017). Phenolic compounds reduce formation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine and pyrazines formed by Maillard reactions in a model bread system. *Food Chemistry*, 231(), 175–184.
- Morales, F.J., n.d. A Study on Advanced Maillard Reaction in Heated Casein/Sugar Solutions: Fluorescence Accumulation 9.
- Navarro, Marta; Morales, Francisco J. (2015). Mechanism of reactive carbonyl species trapping by hydroxytyrosol under simulated physiological conditions. *Food Chemistry*, 175 92–99.
- Navarro, Marta; Morales, Francisco J. (2016). In vitro investigation on the antiglycative and carbonyl trapping activities of hydroxytyrosol. *European Food Research and Technology*, 242(7), doi:10.1007/s00217-015-2614-8
- Navarro, Marta; Morales, Francisco J. (2017). Evaluation of an olive leaf extract as a natural source of antiglycative compounds. *Food Research International*, 92, 56–63.
- Naziri, Eleni; Mitić, Milan N.; Tsimidou, Maria Z. (2016). Contribution of tocopherols and squalene to the oxidative stability of cold-pressed pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo* L.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(6), 898–905. doi:10.1002/ejlt.201500261
- Nguyen, Ha T.; van der Fels-Klerx, H. J.; van Boekel, M. A. J. S. (2014). (carboxymethyl)lysine: A Review on Analytical Methods, Formation, and Occurrence in Processed Food, and Health Impact. *Food Reviews International*, 30(1), 36–52.
- Nooshkam, Majid; Varidi, Mehdi; Bashash, Moein (2018). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.083
- Nowotny, Kerstin; Schröter, David; Schreiner, Monika; Grune, Tilman (2018). Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health. *Ageing Research Reviews*, 47, 55–66. doi:10.1016/j.arr.2018.06.005
- Nursten, H. E. (2005). *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications*. Royal Society of Chemistry.

- Oliveira, Fabíola Cristina de; Coimbra, Jane Sélia dos Reis; de Oliveira, Eduardo Basílio; Zuñiga, Abraham Damian Giraldo; Rojas, Edwin E. Garcia (2014). Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, doi:10.1080/10408398.2012.755669
- Pellegrini, Nicoletta; Fogliano, Vincenzo (2017). Cooking, industrial processing and caloric density of foods. *Current Opinion in Food Science*, 14, 98–102. doi:10.1016/j.cofs.2017.02.006
- Perrone, Anna; Giovino, Antonio; Benny, Jubina; Martinelli, Federico (2020). Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–18.
- Phenomenex, Application Note: Amino Acid Analysis using OPA on Kinetex 5u EVO C18 150x4.6mm
- Rizzi, George P. (2008). The Strecker Degradation of Amino Acids: Newer Avenues for Flavor Formation. , 24(4), 416–435. doi:10.1080/87559120802306058
- Romero, C., Brenes, M., 2012. Analysis of Total Contents of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Olive Oils 9017–9022.
- Rosario Zamora; Francisco J. Hidalgo (2011). The Maillard reaction and lipid oxidation. , 23(3), 59–62. doi:10.1002/lite.201100094
- Rufián-Henares, J.A. (2016). Encyclopedia of Food and Health || Maillard Reaction. , 593–600. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00435-9
- Ryszard Amarowicz (2009). Squalene: A natural antioxidant?. , 111(5), 411–412. doi:10.1002/ejlt.200900102
- Secmeler, O. & Galanakis, C. M., 2019. Olive Fruit and Olive Oil. In: C. M. Galanakis , ed. *Innovations in Traditional Foods*. Woodhead Publishing, pp. 193-220.
- Simpson, Benjamin K. (2012). Food Biochemistry and Food Processing (Simpson/Food Biochemistry and Food Processing) || Browning Reactions. , 56–83. doi:10.1002/9781118308035.ch4
- Suzanne R Thorpe; John W Baynes (2002). CML: a brief history. , 1245(none), 0–99. doi:10.1016/s0531-5131(02)00881-6
- Tsimidou, M. Z., 2010. Squalene and Tocopherols in Olive Oil. In: V. Preedy& R. Watson, eds. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. s.l.:Academic Press, pp. 561-567
- Tsimidou, M., Blekas, G. & Boskou, D., 2003. Olive Oil. In: B. Caballero, ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 4252-4260.
- Uribarri, J.; del Castillo, M. D.; de la Maza, M. P.; Filip, R.; Gugliucci, A.; Luevano-Contreras, C.; Macias-Cervantes, M. H.; Markowicz Bastos, D. H.; Medrano, A.; Menini, T.; Portero-Otin, M.; Rojas, A.; Sampaio, G. R.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Garay-Sevilla, M. E. (2015). Dietary Advanced Glycation End Products and Their

Role in Health and Disease. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 6(4), 461–473.

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(S1), 3–27.

Vlassopoulos, A.; Lean, M. E. J.; Combet, E. (2014). Protein–phenolic interactions and inhibition of glycation – combining a systematic review and experimental models for enhanced physiological relevance. *Food Funct.*, 5(10), 2646–2655. doi:10.1039/C4FO00568F

Vlassopoulos, A.; Mikrou, T.; Papantoni, A.; Papadopoulos, G.; Kapsokefalou, M.; Mallouchos, A.; Gardeli, C. The Effect of Terpenoid Compounds on the Formation of Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Model Systems. *Appl. Sci.* 2022, 12, 908. <https://doi.org/10.3390/app12020908>

Wei, Qingyi; Liu, Ting; Sun, Da-Wen (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 32–45.

Wijewickreme, A. N., & Kitts, D. D. (1998). Oxidative Reactions of Model Maillard Reaction Products and α -Tocopherol in a Flour-Lipid Mixture. *Journal of Food Science*, 63(3), 466–471. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb

Zhang, M., Zhang, Y., Ren, S., Zhang, Z., Wang, Y., Song, R., 2018. Optimization of a Precolumn OPA Derivatization HPLC Assay for Monitoring of l-Asparagine Depletion in Serum during l-Asparaginase Therapy. *Journal of Chromatographic Science* 56, 794–801. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy053>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Η ακτινοβολία του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης

	a	b	c	Control
0,5 h	6046,500	5711,000	5215	7512,5
1 h	7397,0±1040,01	7403,33±1151,07	7116,83±779,75	9256,5
2h	13040,67±5910,24	16918,7±503,82	11873,83±5032,26	16719
3h	25030,16±506,11	26233,0±2246,21	25095,50±1921,08	27788,25
4h	30965,50±2216,57	31247,3±665,74	29598,33±1539,01	38653,5

Πίνακας 2. Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0	0	0,09	0,0474
1 h	0,01±0,01	0,05±0,08	0,07±0,06	0,087
2h	0,36±0,26	0,35±0,18	0,62±0,06	0,309
3h	0,96±0,16	0,91±0,19	1,14±0,08	1,084
4h	0,96±0,02	1,33±0,23	1,53±0,12	1,723

Πίνακας 3. Η απορρόφηση (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,12	0,12	0,14	0,13
1 h	0,14±0,02	0,14±0,01	0,15±0,01	0,13
2h	0,20±0,01	0,21±0,02	0,20±0,02	0,20
3h	0,28±0,03	0,27±0,01	0,31±0,01	0,26
4h	0,32±0,03	0,33±0,02	0,32±0,01	0,33

Πίνακας 4. Η απορρόφηση (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,06	0,05	0,07	0,06
1 h	0,06±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01	0,05
2h	0,07±0,01	0,08±0,02	0,07±0	0,08
3h	0,09±0,01	0,09±0	0,10±0,01	0,08
4h	0,10±0,01	0,10±0	0,10±0	0,10

Πίνακας 5. Η ακτινοβολία του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης(0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου

	a	b	c	Control
0,5 h	6988,00±756,65	5732,00±665,87	5190,17±539,37	6943,67
1 h	8696,17±74,58	8690,67±608,04	7582,83±146,97	10036,00
2h	18262,17±1209,36	19668,50±843,63	18240,17±1873,20	20651,00
3h	28727,67±1179,60	33696,83±583,24	30259,83±886,62	32915,17
4h	34320,83±809,45	39329,50±18,75	35427,83±1161,38	38385,33

Πίνακας 6. Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,00	0,24±0,04	0,23±0,15	0,03
1 h	0,00	0,50±0,17	0,52±0,05	0,09
2h	0,13±0,13	0,43±0,20	0,43±0,14	0,26
3h	0,73±0,23	1,07±0,12	1,03±0,25	0,93
4h	1,08±0,06	1,67±0,02	2,07±0,92	1,10

Πίνακας 7. Η απορρόφηση (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,12±0,02	0,33±0,11	0,24±0,05	0,17
1 h	0,13±0,02	0,28±0,02	0,29±0,06	0,22
2h	0,20±0,01	0,26±0,02	0,31±0,06	0,26
3h	0,28±0,03	0,36±0,04	0,39±0,06	0,33
4h	0,33±0,01	0,41±0,03	0,45±0,05	0,34

Πίνακας 8. Η απορρόφηση (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σκουαλενίου.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,05±0	0,15±0	0,16±0,04	0,09
1 h	0,06±0,01	0,16±0,02	0,17±0,05	0,12
2h	0,08±0,01	0,11±0,01	0,14±0,06	0,13
3h	0,09±0,01	0,12±0,01	0,15±0,04	0,15
4h	0,11±0	0,13±0,01	0,17±0,05	0,15

Πίνακας 9. Η ακτινοβολία του φθορισμού (AU) κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης

	a	b	c	Control
0,5 h	6896,67±197,61	7014,33±393,46	7151,67±263,28	6324,83
1 h	9677,67±631,19	9765,33±685,04	10501,17±414,43	9765,67
2h	18317,67±872,23	17055,67±675,93	17236,67±580,29	16664,33
3h	24757,67±975,89	22436,00±804,32	20372,67±1047,85	25799,67
4h	29524,83±1595,04	25621,00±1339,13	25156,33±812,86	29439,17

Πίνακας 10. Η απορρόφηση (AU) στα 280nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,15±0,02	0,44±0,03	0,86±0,01	0,00
1 h	0,39±0,02	0,77±0,10	1,27±0,27	0,10
2h	0,90±0,14	1,30±0,06	1,60±0,02	0,48
3h	1,60±0,03	1,75±0,07	1,96±0,08	1,07
4h	1,86±0,03	1,92±0,03	2,18±0,04	1,35

Πίνακας 11. Η απορρόφηση (AU) στα 360nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,13±0	0,13±0,02	0,16±0,01	0,11
1 h	0,14±0,01	0,17±0,01	0,21±0,01	0,13
2h	0,20±0,02	0,22±0,03	0,26±0,04	0,16
3h	0,24±0,04	0,26±0,02	0,29±0,04	0,19
4h	0,27±0,03	0,28±0,04	0,32±0,07	0,23

Πίνακας 12. Η απορρόφηση (AU) στα 420nm κατά τη θέρμανση στους 80°C για 4h, συστήματος γλυκόζης: λυσίνης (0,1 M) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υδροξυτυροσόλης.

	a	b	c	Control
0,5 h	0,05±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01	0,05
1 h	0,05±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01	0,05
2h	0,07±0,01	0,08±0,01	0,09±0,02	0,05
3h	0,07±0,01	0,09±0	0,10±0,02	0,06
4h	0,08±0,01	0,10±0,02	0,11±0,03	0,07