



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΙΓΑΙΟΥ**

ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΑΧΙΝΙΟΥ**

Παναγιώτης Ν. Αχιλλαδέλης

ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Που υποβλήθηκε στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“Διατροφή Ευζωία και Δημόσια Υγεία”

του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής

ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση

Διπλώματος Ειδίκευσης

Μύρινα, Λήμος

Ιούνιος, 2022

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αξιολόγηση Διπλωματικής Διατριβής του: Παναγιώτη Αχιλλαδέλη

Θέμα: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΑΧΙΝΙΟΥ

Ημερομηνία παρουσίασης: 22/06/2022

Η παρούσα διπλωματική διατριβή αφού εξετάστηκε ως προς:

τη δομή/μορφή της εργασίας, τη σαφήνεια του ερευνητικού ερωτήματος, τη βιβλιογραφική έρευνα, τη θεωρητική τεκμηρίωση, τη μεθοδολογία, το εμπειρικό μέρος, την αυτονομία της έρευνας, την ποιότητα παρουσίασης καθώς και τελικά συμπεράσματα της έρευνας, από την τριμελή επιτροπή αξιολόγησης που αποτελείται από τους:

Χαράλαμπος Καραντώνης

Κωνσταντίνα Νασσοπούλου

Αντώνιος Κουτελιδάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής

Επίκουρη Καθηγήτρια

Επίκουρος Καθηγητής

Συνολικά αξιολογήθηκε με βαθμό _____

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ

Κωνσταντίνος Γιαγκίνης

Αναπληρωτής Καθηγητής

Είμαι συγγραφέας αυτής της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, έχω αναφέρει τις όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων ή ιδεών, είτε αυτές αναφέρονται ακριβώς είτε παραφρασμένες. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία προετοιμάστηκε από εμένα προσωπικά, ειδικά για τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία.

Λήμνος, Ιούνιος 2022

Αχιλλαδέλης Παναγιώτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον κύριο Καραντώνη Χαράλαμπο, Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου, για την καθοδήγηση και αμέριστη υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Το αμείωτο ενδιαφέρον και η συμβολή του τόσο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της μελέτης, συντέλεσαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας και στην αποδοτική συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΑΧΙΝΙΟΥ

Παναγιώτης Αχιλλαδέλης

Το σησάμι περιέχει μία πληθώρα φαινολικών συστατικών, που παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για το ταχίνι, το οποίο αποτελεί προϊόν κατεργασίας του σησαμιού. Μία εναλλακτική αξιοποίηση των υποπροϊόντων των τροφίμων είναι η ενσωμάτωσή τους σε άλλα τρόφιμα, καθιστώντας τα έτσι λειτουργικά συστατικά και πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Τα στέμφυλα από κόκκινα σταφύλια αποτελούν μια φθηνή πηγή πολύτιμων φαινολικών ενώσεων. Από την άλλη, το νερό βρασμού των ρεβιθιών ή το aquafaba που παράγεται σε οικιακό επίπεδο ή προέρχεται από κονσέρβες ρεβιθιών συνήθως απορρίπτεται. Ωστόσο, είναι πολύτιμο όχι μόνο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ενώσεις που προάγουν την υγεία, αλλά και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε σε *in vitro* επίπεδο η βιοδραστικότητα του ταχινιού πριν και μετά από εμπλουτισμό με 4% (w/w) συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό, το οποίο παραλήφθηκε μετά από συνδυασμό μικροκυμάτων και υπερήχων, και 6% (w/w) λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά. Οι μηχανισμοί οξειδωσης και θρόμβωσης εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων και η μελέτη ουσιών-τροφίμων με πιθανή αντιοξειδωτική, αντιαθηρογόνο και αντιθρομβωτική δράση αναδεικνύει την ευεργετική δράση αυτών σε προληπτικό επίπεδο έναντι τέτοιου είδους ασθενειών.

Τα υπό μελέτη δείγματα εκχυλίστηκαν κατά Bligh & Dyer και αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά και флаβονοειδή. Στο σύνολο των δειγμάτων έγινε *in vitro* εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω των δοκιμασιών ABTS, DPPH, CUPRAC και FRAP. Εκτιμήθηκε *in vitro* η αντιαθηρογόνος δράση μέσω μέτρησης της αναστολής της οξειδωσης πλάσματος από αίμα ανθρώπου προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , ενώ η αντιθρομβωτική δράση των εκχυλισμάτων μελετήθηκε μέσω μέτρησης της αναστολής του θρομβωτικού λιποειδικού παράγοντα γνωστού ως Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια.

Τόσο το εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό όσο και το aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά αύξησαν την βιοδραστικότητα του ταχινιού. Η ενίσχυση της

αντιοξειδωτικής και της αντιθρομβωτικής δράσης των τροφίμων με την δημιουργία εξαιρετικά δραστικών φυσικών πρόσθετων, ειδικά όταν αυτά προέρχονται από υποπροϊόντα τροφίμων, μπορεί να δράσει ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου, όταν τα τρόφιμα αυτά αποτελούν μέρος μίας ισορροπημένης διατροφής και να συμβάλει στην πρόληψη κατά της ανάπτυξης χρόνιων νοσημάτων, που έχουν ως κύριους αιτιολογικούς μηχανισμούς το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή, και τη θρόμβωση όπως συμβαίνει στα καρδιαγγειακά νοσήματα, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, την παχυσαρκία και διάφορους τύπους καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: Ταχίνι, κόκκινα στέμφυλα, aquafaba, βιοδραστικότητα, εμπλουτισμός τροφίμων, αντιοξειδωτική δράση

ABSTRACT

EFFECT OF FORTIFICATION OF TAHINI WITH NATURAL PLANT ORIGIN RAW MATERIALS ON ITS BIOACTIVITY

Panagiotis Achilladelis

Sesame seeds contain a variety of phenolic components which have beneficial effects on human health. However, there are limited data on tahini, which is a product of sesame processing. An alternative purpose of food by-products is their incorporation in different food matrices, thus becoming functional food ingredients and a source of bioactive compounds. Red grape pomace is a cheap source of valuable phenolic compounds. On the other hand, chickpea boiling water, or aquafaba, which is produced domestically or derived from canned chickpeas is usually discarded. However, it is valuable not only because of its high content of health-promoting compounds, but also because of its high protein content.

In this dissertation, tahini fortified with 4% (w/w) of a lyophilized microwave-ultrasound assisted red grape pomace extract of Limnio variety and 6% (w/w) lyophilized aquafaba from Lemnian chickpeas of Panagia variety was studied *in vitro* and their effect on its bioactivity was evaluated. The mechanisms of oxidation and thrombosis are directly involved in the development of chronic diseases and the study of substances-foods with possible antioxidant, antiatherogenic and antithrombotic activity highlights their beneficial effects to prevent such diseases.

Under study samples were extracted by the Bligh & Dyer method and analyzed for their polyphenolic content, as well as for their content in total flavonoids. Assessment of the antioxidant capacity of the extracts was determined *in vitro* by the ABTS, DPPH, CUPRAC and FRAP methods. Antiatherogenic activity was studied *in vitro* by measuring human blood plasma oxidation inhibition, caused by Cu^{2+} , while antithrombotic activity of the extracts was determined by the inhibition of the thrombotic lipid mediator known as Platelet Activating Factor, PAF, in human Platelet-Rich Plasma.

Both the extract of red grape pomace of Limnio variety and the aquafaba from Lemnian chickpeas of Panagia variety increased the bioactivity of tahini. Enhancing the antioxidant and antithrombotic activities of foods by creating highly active natural additives, especially when derived from food by-products, can be beneficial to human health, when these foods are part of a balanced diet, and help prevent the development of chronic diseases, which have as their main

causal mechanisms oxidative stress, inflammation and thrombosis as occurs in cardiovascular diseases, diabetes mellitus type II, obesity and cancer.

Key-words: Tahini, red grape pomace, aquafaba, bioactivity, food fortification, antioxidant activity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	IV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	V
ABSTRACT	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	IX
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ/ΕΙΚΟΝΩΝ	XII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	XIV
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΣΥΜΠΤΥΞΕΙΣ	XV
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Φαινολικά συστατικά.....	2
1.1.1 Φλαβονοειδή	4
1.1.2 Φαινολικά οξέα.....	4
1.1.3 Τανίνες.....	5
1.1.4 Λιγνάνες.....	5
1.2 Αντιοξειδωτικά.....	6
1.2.1 Αντιοξειδωτικά και οξειδωτικό στρες	6
1.2.2 Οι φαινολικές ενώσεις ως αποσβέστες ελεύθερων ριζών	6
2 ΤΑΧΙΝΙ (ΠΑΣΤΑ ΣΗΣΑΜΙΟΥ)	8
2.1 Σησάμι και αντιοξειδωτικά	9
3 ΣΤΕΜΦΥΛΛΑ	11
4 ΑQUAFABA	13
4.1 Λειτουργικές ιδιότητες aquafaba.....	13
5 ΣΚΟΠΟΣ	15
6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
6.1 Δείγματα και Υλικά.....	16
6.2 Παραγωγή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό και εμπλουτισμός με ταχίνι.....	16
6.2.1 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με υπερήχους.....	18
6.2.2 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με μικροκύματα	18
6.2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση από συνδυασμό μικροκυμάτων - υπερήχων.....	18
6.3 Συμπύκνωση - ξήρανση εκχυλισμάτων	18
6.3.1 Παρασκευή cake σησαμιού	19

6.4	Παρασκευή λυοφιλοποιημένου aquafaba	20
6.5	Εκχύλιση κατά Bligh & Dyer	20
6.6	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	21
6.6.1	Παρασκευή διαλυμάτων	22
6.6.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	22
6.7	Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών	23
6.7.1	Παρασκευή διαλυμάτων	24
6.7.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	24
6.8	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία του 2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid], ABTS).....	25
6.8.1	Παρασκευή διαλυμάτων	27
6.9	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)	28
6.9.1	Παρασκευή διαλυμάτων	29
6.9.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	30
6.10	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)	30
6.10.1	Παρασκευή διαλυμάτων	31
6.10.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	31
6.11	Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης εκχυλισμάτων με τη δοκιμασία FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	32
6.11.1	Παρασκευή διαλυμάτων	33
6.11.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	34
6.12	Εκτίμηση της αντιαθηρογόνου δράσης εκχυλισμάτων μέσω αναστολής της <i>in vitro</i> οξείδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα Cu^{2+}	35
6.12.1	Παρασκευή διαλυμάτων	37
6.12.2	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	37
6.13	Εκτίμηση της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια.....	38
6.13.1	Παρασκευή διαλυμάτων	42
6.14	Στατιστική ανάλυση.....	42
7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
7.1	Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε όλα τα δείγματα	43
7.2	Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών σε όλα τα δείγματα	45
7.3	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας ABTS.....	47

7.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας DPPH.....	50
7.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας CUPRAC.....	53
7.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας FRAP.....	55
7.7 Προσδιορισμός αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας αναστολής οξείδωσης του πλάσματος.....	57
7.8 Προσδιορισμός της αντιθρομβωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια	59
8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ/ΕΙΚΟΝΩΝ

ΣΧΗΜΑ/ΕΙΚΟΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Σχήμα 1.1. Βασική δομή φαινόλης.....	2
Σχήμα 1.2. Κύριες τάξεις και κατάταξη φαινολικών ενώσεων	3
Σχήμα 2.1. Δομές βασικών λιγνανών σησαμιού	9
Σχήμα 6.1. Δομή αντιδραστηρίου ABTS	25
Σχήμα 6.2. Σχηματισμός σταθερών ριζών ABTS από ABTS με υπερθειϊκό κάλιο ($K_2S_2O_8$).....	26
Σχήμα 6.3. Αντίδραση του DPPH• με αντιοξειδωτικό για την παραγωγή DPPH	28
Σχήμα 6.4. Δομή Trolox	29
Σχήμα 6.5. Αναγωγή του Fe^{3+} προς Fe^{2+}	32
Σχήμα 6.6. Δομή του TPTZ και του $[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$	33
Σχήμα 6.7. Δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων.....	40
Εικόνα 6.1. Αντιπροσωπευτική εικόνα από το δείγμα στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.....	17
Εικόνα 6.2. Αντιπροσωπευτική εικόνα από αποξηραμένο εκχύλισμα στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό με cake σησαμιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή	19
Εικόνα 6.3. Αντιπροσωπευτική εικόνα απολιπασμένου Cake σησαμιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.....	19
Εικόνα 6.4. Αντιπροσωπευτική εικόνα από λυοφιλοποιημένο aquafaba που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.....	20

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 6.1. Ποσότητες εμπλουτισμού ταχινιού	17
Πίνακας 7.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας Folin-Ciocalteu.....	43
Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ολικών φλαβονοειδών	46
Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS.....	48
Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS ^{**} (SA ₅₀).....	48
Πίνακας 7.5. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH	50
Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH, εκφρασμένα σε EC ₅₀ και μmol Trolox/g τελικού προϊόντος	51
Πίνακας 7.7. Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC.....	53
Πίνακας 7.8. Αποτελέσματα δοκιμασίας FRAP.....	55
Πίνακας 7.9. Αποτελέσματα δοκιμασίας οξειδωσης πλάσματος.....	57
Πίνακας 7.10. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP	59
Πίνακας 7.11. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή (IC ₅₀)	60
Πίνακας 10.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων στέμφυλων.....	68
Πίνακας 10.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS (SA ₅₀) εκχυλισμάτων στέμφυλων	69
Πίνακας 10.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων εμπλουτισμού	70
Πίνακας 10.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS (SA ₅₀) εκχυλισμάτων εμπλουτισμού.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Διάγραμμα 6.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας Folin-Ciocalteu.....	23
Διάγραμμα 6.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών.....	25
Διάγραμμα 6.3. Πρότυπη Καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας DPPH.....	30
Διάγραμμα 6.4. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας CUPRAC.....	32
Διάγραμμα 6.5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας FRAP.....	34
Διάγραμμα 6.6. Πρότυπη καμπύλη δείγματος αναφοράς οξείδωσης πλάσματος.....	36
Διάγραμμα 6.7. Πρότυπη καμπύλη Trolox οξείδωσης πλάσματος.....	38
Διάγραμμα 6.8. Πρότυπη καμπύλη ελάχιστης μη αντιστρεπτής συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε PRP προκαλούμενη από PAF συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-7}$ M.....	41
Διάγραμμα 7.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας Folin-Ciocalteu, εκφρασμένα σε mg GAE/g τελικού προϊόντος. (α) δείγματα ταχινιού, (β) πρώτες ύλες.....	44
Διάγραμμα 7.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ολικών φλαβονοειδών, εκφρασμένα σε mg RE/g τελικού προϊόντος.....	46
Διάγραμμα 7.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS ^{•+} (SA ₅₀).....	49
Διάγραμμα 7.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH, εκφρασμένα ως ισοδύναμα μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.....	52
Διάγραμμα 7.5. Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC, εκφρασμένα σε μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.....	54
Διάγραμμα 7.6. Αποτελέσματα δοκιμασίας FRAP, εκφρασμένα σε μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.....	56
Διάγραμμα 7.7. Αποτελέσματα δοκιμασίας οξείδωσης πλάσματος, εκφρασμένα σε μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.....	58
Διάγραμμα 7.8. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή (IC ₅₀).....	60
Διάγραμμα 10.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων στέμφυλων, εκφρασμένα ως mg στέμφυλων για 50% απόσβεση του ABTS ^{•+} (SA ₅₀).....	69
Διάγραμμα 10.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων εμπλουτισμού, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS ^{•+} (SA ₅₀).....	71

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΣΥΜΠΤΥΞΕΙΣ

ABTS: 2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid])

AC: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά

AF: λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά

C: μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού

Cake: cake σησαμιού

Control: δείγμα ταχίνι

CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

DPPH: 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

EC₅₀: συγκέντρωση για 50% απόσβεση (Effective Concentration 50%)

FC: Folin-Ciocalteu

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents)

IC₅₀: συγκέντρωση για 50% αναστολή (Inhibitory Concentration 50%)

LAC: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό και λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά

LC: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό

LMU: συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό

M.W.: Μοριακό Βάρος (Molecular Weight)

MAE: εκχύλιση μικροκυμάτων (microwave-assisted extraction)

MUAE: συνδυασμός εκχύλισης μικροκυμάτων - υπερήχων (microwave-ultrasound assisted extraction)

PAF: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor)

PPP: Πλάσμα Φτωχό σε Αιμοπετάλια (Platelet-Poor Plasma)

PRP: Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma)

RE: ισοδύναμα ρουτίνης (Rutin Equivalents)

SA₅₀: ποσότητα για 50% απόσβεση (Scavenging Amount 50%)

TPTZ: 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη

UAE: εκχύλιση υπερήχων (ultrasound-assisted extraction)

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο εμπλουτισμός των τροφίμων και η προσθήκη θρεπτικών συστατικών σε αυτά πραγματοποιούνται εδώ και αιώνες, συχνά πριν τεκμηριωθεί επιστημονικά το γιατί. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα εμπλουτισμού τροφίμων σε διάφορα μέρη του πλανήτη. Στην Κεντρική Ευρώπη κατά τον Μεσαίωνα, οι μητέρες ήταν γνωστό ότι έβαζαν στα μήλα σιδερένια καρφιά για λίγο και μετά τα ταΐζαν σε άτονες ή άρρωστες κόρες. Υπάρχουν αναφορές ήδη από το 1824 για τον αυτόχθονα ινδιάνικο πληθυσμό της Κολούμπιας, στη Νότια Αμερική, που αντιμετώπιζε τη βρογχοκήλη με μια συγκεκριμένη πηγή αλατιού, το οποίο αργότερα βρέθηκε ότι είχε υψηλή περιεκτικότητα σε ιώδιο. Κατά την παρασκευή παραδοσιακών τორτιγιών στο Μεξικό, το καλαμπόκι εμποτιζόταν πρώτα σε ασβεστόνερο, ενώ πρόσθεταν μία μικρή ποσότητα αλεσμένου ασβεστόλιθου στην ίδια την τორτίγια, κάτι που πλέον ξέρουμε ότι ήταν για την πρόσληψη ασβεστίου (Ottaway, 2008).

Μία από τις πρώτες καταγεγραμμένες προτάσεις για τον εμπλουτισμό των τροφίμων ήταν αυτή του Boussingault το 1831, ο οποίος υποστήριξε την ιωδίωση του αλατιού για τη μείωση της βρογχοκήλης. Η πρώτη επίσημη προσθήκη ιωδίου στο επιτραπέζιο αλάτι ξεκίνησε στην Ελβετία το 1900 και αυτή η πρακτική συνεχίστηκε σε πολλές χώρες μέχρι και σήμερα (Ottaway, 2008).

Ως εμπλουτισμός τροφίμων θεωρείται η διαδικασία κατά την οποία προστίθεται ένα ή περισσότερα απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά σε τρόφιμα, βελτιώνοντας έτσι την διατροφική τους ποιότητα (Ottaway, 2008).

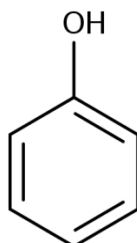
Τα τελευταία χρόνια έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τη δυνατότητα των υποπροϊόντων των τροφίμων να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα, ως πλούσια πηγή σε αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών, των καρτενοειδών, των σαπωνινών και των αλκαλοειδών (Monteiro et al., 2021, Morsy et al., 2022). Η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) εκτίμησε ότι, κάθε χρόνο, 1,3 δισεκατομμύρια τόνοι τροφίμων σπαταλούνται, οπότε και η Ατζέντα 2030 για τη Βιώσιμη Ανάπτυξη στόχευε να μειώσει την απώλεια τροφίμων προωθώντας έναν βιώσιμο τρόπο ζωής. Τα κράτη μέλη των Ηνωμένων Εθνών έχουν θέσει ως στόχο τη μείωση των αποβλήτων των τροφίμων υιοθετώντας συγκεκριμένα μέτρα για τη μείωση της απώλειας τροφίμων σε όλη την αλυσίδα παραγωγής. Μία εναλλακτική αξιοποίηση των υποπροϊόντων των τροφίμων είναι η ενσωμάτωσή τους σε άλλα τρόφιμα, καθιστώντας τα έτσι λειτουργικά συστατικά και πηγή βιοδραστικών ενώσεων (Rainero et al., 2022).

1.1 Φαινολικά συστατικά

Τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, οι ξηροί καρποί, οι σπόροι, το κακάο και τα ποτά όπως ο οίνος, ο καφές και το τσάι εκτός από ιχνοστοιχεία και βιταμίνες από πλευράς μικροθρεπτικών συστατικών, περιέχουν μία σειρά ενώσεων που ονομάζονται φυτοχημικά. Αν και τα φυτοχημικά μπορούν να οριστούν με μία αυστηρή έννοια ως χημικές ουσίες που παράγονται από τα φυτά, ο όρος φυτοχημικά, στην πραγματικότητα, χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει χημικές ουσίες φυτών που μπορεί να έχουν επίδραση στην υγεία, αλλά δεν είναι ωστόσο απαραίτητες. Σε αυτές τις φυτοχημικές ενώσεις ανήκουν οι ευρέως διαδεδομένοι οξειδοαναγωγικά ενεργοί δευτερογενείς μεταβολίτες, ευρέως γνωστοί με την ονομασία φαινολικές ενώσεις (Bueno et al., 2012).

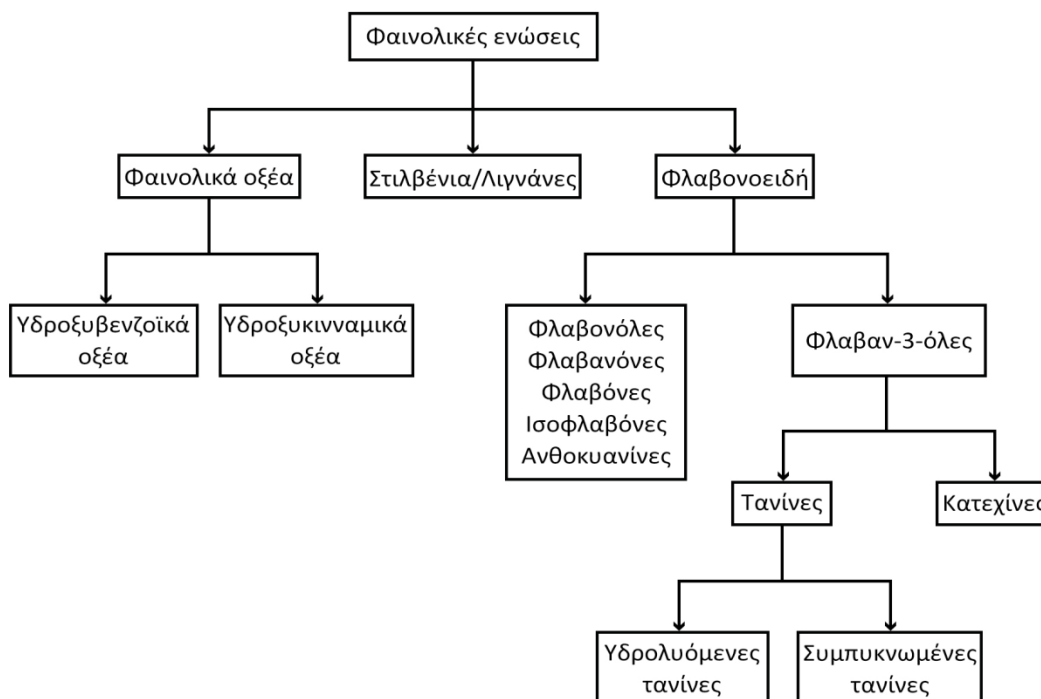
Οι φαινολικές ενώσεις είναι σχεδόν πανταχού παρών σε φυτικές τροφές και ποτά, ενώ τα επίπεδά τους ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό, ακόμη και μεταξύ των ποικιλιών του ίδιου είδους. Η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτικά τρόφιμα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τους γενετικούς παράγοντες και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επίσης, η περιεκτικότητα των φυτικών φαινολικών ενώσεων επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως η καλλιέργεια, ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Proestos & Komaitis, 2013).

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Ως μητρική ένωση των φαινολικών συστατικών θεωρείται η φαινόλη (Σχήμα 1.1.) (Routray & Orsat, 2013), ενώ η τάξη αυτή των ενώσεων περιλαμβάνει μόρια από απλά φαινολικά οξέα, έως περισσότερο σύνθετα όπως οι τανίνες. Οι φαινολικές ενώσεις των φυτών συμμετέχουν γενικά στην άμυνα τους έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, των παθογόνων βακτηριών, των παράσιτων και των αρπακτικών, ενώ συμβάλλουν και στα χρώματα των φυτών (Dai & Mumper, 2010).



Σχήμα 1.1. Βασική δομή φαινόλης.

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε τέσσερις κύριες τάξεις (Σχήμα 1.2.): τα φαινολικά οξέα (υδροξυπαράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος), τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τις λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα αντιπροσωπεύουν το 60% και το 30%, αντίστοιχα, των συνολικών διαιτητικών πολυφαινολών (Bueno et al., 2012).



Σχήμα 1.2. Κύριες τάξεις και κατάταξη φαινολικών ενώσεων.

Οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα ονομάζονται αγλυκόνες, ενώ αυτές που βρίσκονται σε συζευγμένη μορφή με ένα ή περισσότερα σάκχαρα λέγονται γλυκοζίτες. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στη φύση αποτελούνται από μονο- και πολύ-σακχαρίτες ή λειτουργικά παράγωγα όπως εστέρες και μεθυλεστέρες (Bueno et al., 2012, Proestos & Komaitis, 2013).

Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών με φυσικές εναλλακτικές λύσεις, λόγω ανησυχιών για την υγεία, ενώ, παράλληλα, πολλά φυτοχημικά έχουν αναγνωρισθεί ως ασφαλή αντιοξειδωτικά (Shahidi et al., 2006, Chang et al., 2002).

Πρόσφατα, οι φαινολικές ενώσεις έχουν θεωρηθεί ισχυρά αντιοξειδωτικά *in vitro* και έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά από τις βιταμίνες C και E αλλά και τα καροτενοειδή. Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών και του κινδύνου

εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος ή η οστεοπόρωση, έχει εν μέρει αποδοθεί στις φαινολικές ενώσεις (Dai & Mumper, 2010). Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες εξαρτάται από τη δομή τους, ιδίως από τα άτομα υδρογόνου του αρωματικού δακτυλίου, τα οποία μεταφέρονται στις ελεύθερες ρίζες και την ικανότητα των αρωματικών δακτυλίων να σταθεροποιούν το αποτέλεσμα αυτής της αποσύνδεσης των ηλεκτρονίων. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που συνδέουν τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών με τις επιπτώσεις στην υγεία εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο συζήτησης. Επίσης, η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στους ανθρώπους και στα πειραματόζωα παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη (Bueno et al., 2012).

1.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή συνιστούν το μεγαλύτερο ποσοστό πολυφαινολών στη διατροφή του ανθρώπου. Η βασική δομή των φλαβονοειδών είναι ο πυρήνας φλαβανίου (2-φαινυλ-βενζο-γ-πυράνιο, C6-C3-C6), ένα σύστημα που περιέχει 15 άτομα άνθρακα και εμπερικλείει δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β), οι οποίοι συνδέονται με ένα δακτύλιο πυρανίου που περιέχει οξυγόνο. Σύμφωνα με το βαθμό οξείδωσης του δακτυλίου C, το μοτίβο υδροξυλίωσης και τον υποκαταστάτη στη θέση 3, τα φλαβονοειδή υποδιαιρούνται σε έξι υποομάδες: φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες), ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες (Dai & Mumper, 2010). Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 9.000 δομές φλαβονοειδών, με τύπους, αναφορές, και βιολογικές πληροφορίες καθώς ο κατάλογος αυτός μεγαλώνει συνεχώς. Επίσης, από τα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν, περίπου τα 5.000 έχουν αντιοξειδωτική δράση (Bueno et al., 2012).

1.1.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: υδροξυπαράγωγα του βενζοϊκού οξέος, όπως το γαλλικό οξύ, και υδροξυπαράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως το πικουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ είναι το συνηθέστερο φαινολικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα και λαχανικά, τις περισσότερες φορές εστεροποιημένο με κινικό οξύ, όπως στο χλωρογενικό οξύ, το οποίο είναι η κύρια φαινολική ένωση του καφέ. Ένα άλλο κοινό φαινολικό οξύ είναι το φερουλικό οξύ, το οποίο είναι παρόν σε σιτηρά και εστεροποιείται με ημικυτταρίνες στο κυτταρικό τοίχωμα (Dai & Mumper, 2010).

1.1.3 Τανίνες

Οι τανίνες αποτελούν μία άλλη μεγάλη ομάδα πολυφαινολών στη διατροφή του ανθρώπου. Είναι πολυμερή των φλαβαν-3-ολών και συνήθως υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες τανίνες (Dai & Mumper, 2010).

1.1.4 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν μια δομή 2,3-διβενζυλβουτανίου που σχηματίζεται από τον διμερισμό δύο κινναμωμικών οξέων. Οι λιγνάνες είναι ευρέως καταναλωμένες μεταξύ πολλών ειδών του φυτικού βασιλείου. Τρόφιμα που είναι γνωστό ότι περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιγνανών είναι κυρίως προϊόντα ολικής αλέσεως, τα μούρα, το τσάι, τα λαχανικά του γένους *Brassica*, ο λιναρόσπορος και το σησάμι. Σε πολλές μελέτες, η πρόσληψη λιγνάνης έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο ορισμένων τύπων καρκίνου καθώς και με άλλες ευεργετικές επιδράσεις (Papadakis et al., 2008).

Ορισμένες λιγνάνες, που ονομάζονται συλλογικά λιγνάνες θηλαστικών ή εντερολιγνάνες, έχουν αναγνωριστεί ως φυσικά συστατικά των βιολογικών υγρών (αίμα, ούρα, σπέρμα, προστατικό υγρό) των θηλαστικών. Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιγνάνες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των εντερολιγνανών στο αίμα και τα ούρα των θηλαστικών. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro*, όταν οι λιγνάνες που βρίσκονται πιο συχνά στα τρόφιμα (σεκοΐσολαρικρεσινόλη, ματαιρεσινόλη, πινορεσινόλη, λαρικρεσινόλη, σησαμίνη) επωάζονται με μικροχλωρίδα ανθρώπινων κοπράνων, μετασχηματίζονται σε εντερολιγνάνες, εντεροδιόλη και/ή εντερολακτόνη. Επιδημιολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι η υψηλή συγκέντρωση της εντερολακτόνης στον ορό έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο ορμονοσχετιζόμενων ασθενειών όπως ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού (Papadakis et al., 2008).

1.2 Αντιοξειδωτικά

1.2.1 Αντιοξειδωτικά και οξειδωτικό στρες

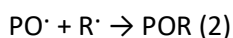
Τα αντιοξειδωτικά ορίζονται ως ενώσεις που μπορούν να καθυστερήσουν, αναστείλουν ή αποτρέψουν την οξείδωση ουσιών από ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία μη ισορροπημένη κατάσταση, κατά την οποία υπερβολικές ποσότητες δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ή/και δραστικών μορφών αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), για παράδειγμα, το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και ο περοξυνιτρίτης (ONOO^-), ξεπερνούν την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα, οδηγώντας σε οξείδωση μία ποικιλία βιομακρομορίων, όπως ένζυμα, πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια. Το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην ανάπτυξη χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου, του καρκίνου και της γήρανσης (Dai & Mumper, 2010).

1.2.2 Οι φαινολικές ενώσεις ως αποσβέστες ελεύθερων ριζών

Οι φαινολικές ενώσεις (POH) ενεργούν ως «αποσβέστες» (“scavengers”) των ελεύθερων ριζών, παρεμβαίνοντας στην οξείδωση των λιποειδικών και άλλων μορίων με προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου στις ρίζες (R),



Οι ενδιάμεσες ρίζες φαινοξυλίου (PO^\cdot) είναι σχετικά σταθερές, λόγω του φαινομένου του συντονισμού, και ενεργούν επίσης ως αποσβέστες, αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες,



Οι φαινολικές ενώσεις έχουν ιδανική δομή για την απόσβεση των ελεύθερων ριζών επειδή έχουν: (α) φαινολικές υδροξυλομάδες που είναι διαθέσιμες για προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου σε μία ελεύθερη ρίζα και (β) ένα συζευγμένο αρωματικό σύστημα, από το οποίο αποσπάται εύκολα ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Dai & Mumper, 2010).

Μερικές φαινολικές ενώσεις που περιέχουν διϋδροξυλομάδες έχουν μία εναλλακτική αντιοξειδωτική ιδιότητα. Μπορούν να συζευχθούν με μέταλλα μετάπτωσης, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό ελεύθερων ριζών που μπορούν να προκληθούν από τα μέταλλα αυτά. Τα ιόντα μετάλλων, όπως του χαλκού Cu^{2+} ή του σιδήρου Fe^{2+} , αλληλεπιδρούν με το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζοντας ρίζες υδροξυλίου, τις πιο αντιδραστικές ROS, οι οποίες

είναι σε θέση να αφαιρέσουν υδρογόνο σχεδόν από οποιοδήποτε μόριο. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό ριζών οξυγόνου που προκαλείται από μέταλλα μέσω συντονισμού με τα ιόντα ενισχύοντας την αυτοοξείδωση τους, ή σχηματίζοντας ανενεργά σύμπλοκα με σχετικά ασθενέστερη δράση (Dai & Mumper, 2010).

Θεωρητικά, αυτές οι δύο αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να προκαλέσουν μείωση των συγκεντρώσεων των ελεύθερων ριζών και των δραστικών οξειδωτικών μορφών και ως αποτέλεσμα να μειώσουν την επακόλουθη οξείδωση των βιομακρομορίων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικά αντιοξειδωτικά συμπεριφέρονται ως προοξειδωτικά υπό ορισμένες συνθήκες και μπορούν να ξεκινήσουν μία διαδικασία αυτοοξείδωσης. Αντί να αποσβέσουν μία άλλη ελεύθερη ρίζα όπως φαίνεται στην [Αντίδραση 2](#), οι ρίζες φαινοξυλίου μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με οξυγόνο παράγοντας κινόνες (P=O) και ανιόντα υπεροξειδίου (Dai & Mumper, 2010).

2 TAXINI (ΠΑΣΤΑ ΣΗΣΑΜΙΟΥ)

Το σησάμι, *Sesamum indicum* L., χρονολογείται ήδη από το 1600 π.Χ. ως το παλαιότερο καρύκευμα που είναι γνωστό στον άνθρωπο. Ανήκει στην οικογένεια *Pedaliaceae*, καλλιεργείται ευρέως στις τροπικές περιοχές της Αφρικής και της Ασίας και αναφέρεται ότι υπάρχουν περίπου 36 είδη. Τα άγρια είδη του βρίσκονται κυρίως στην Αφρική και λίγα στην Ινδία. Ως η πατρίδα αυτής της καλλιέργειας είναι γνωστή η Αιθιοπία, ενώ οι σημαντικότεροι παραγωγοί σησαμιού είναι η Ινδία, η Μιανμάρ, η Κίνα και το Σουδάν με το 68% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής (Nagendra Prasad et al., 2012, Sohoulì et al., 2022).

Το έλαιο που εξάγεται από το σησάμι εκτιμάται ως πολύτιμη τροφή λόγω της υψηλής θρεπτικής του ποιότητας και σταθερότητας. Έχει πολλές χρήσεις και διαφέρει σημαντικά από τα άλλα φυτικά έλαια λόγω των θρεπτικών συστατικών και των θεραπευτικών του δράσεων. Τα πιθανά οφέλη του σησαμιού για την υγεία περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές και ανοσορυθμιστικές δράσεις (Nagendra Prasad et al., 2012, Sohoulì et al., 2022).

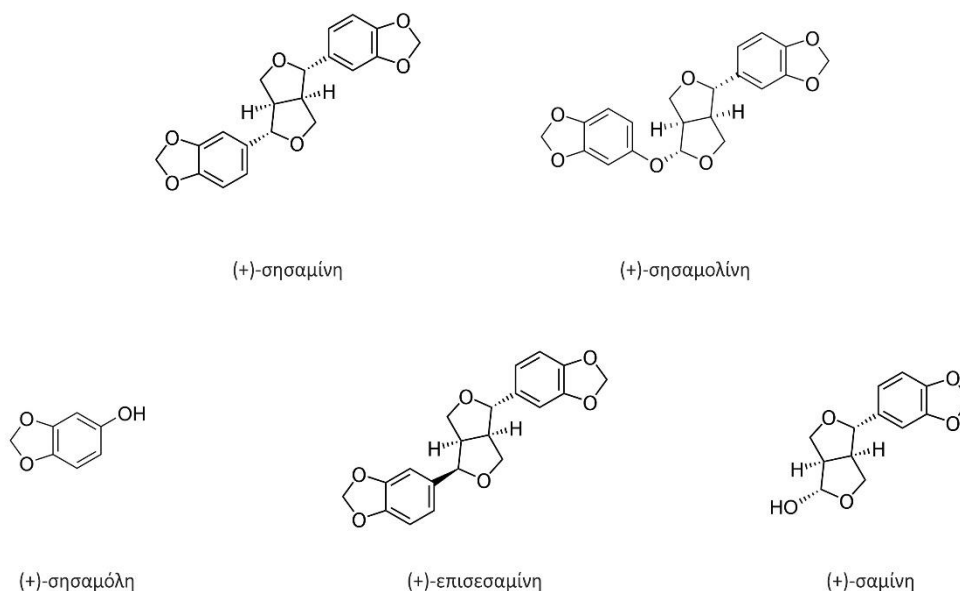
Οι σπόροι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ελαίου και ταχινιού, αλλά προστίθενται και ως έχουν σε διάφορα σκευάσματα τροφίμων. Η χημική σύσταση του σησαμιού αποτελείται από 50-60% έλαιο, 18-25% πρωτεΐνες, 13,5% υδατάνθρακες και 5% τέφρα. Η αξιοσημείωτη σταθερότητα στην οξείδωση μπορεί να αποδοθεί στις ενδογενείς αντιοξειδωτικές λιγνάνες του, μαζί με τις τοκοφερόλες. Η σησαμίνη (0,4-1,1%), η σησαμολίνη (0,3-0,6%) και τα ίχνη σησαμόλης συμβάλλουν στις μοναδικές ιδιότητες του σησαμέλαιου. Το σησάμι είναι μια πλούσια πηγή ασβεστίου (περίπου 1%) και φωσφόρου (περίπου 0,7%), ενώ περιέχει άφθονες ποσότητες ελαϊκού (43%), λινολεϊκού (35%), παλμιτικού (11%) και στεατικού οξέος (7%), τα οποία μαζί αποτελούν το 96% των συνολικών λιπαρών οξέων του (Nagendra Prasad et al., 2012, Sohoulì et al., 2022).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση των φυτικών φυσικών αντιοξειδωτικών και αποκτούν έδαφος ως διατροφοδραστικά συστατικά (nutraceuticals) καθώς έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην κατάσταση της ανθρώπινης υγείας και στην πρόληψη ασθενειών. Το σησάμι είναι ένα από αυτά τα φυτά με καρπούς που παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις για την υγεία. Το σησάμι, χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό, ιδιαίτερα στις ασιατικές χώρες, ως «λειτουργική» και παραδοσιακή τροφή, ενώ η καλλιέργειά του κατατάσσεται στην ένατη θέση μεταξύ των παγκόσμιων καλλιεργειών ελαιούχων σπόρων (Baxevanis et al., 2021).

2.1 Σησάμι και αντιοξειδωτικά

Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να διαχωρίσουν τις βιοδραστικές ενώσεις του σησαμιού με *in vitro* και *in vivo* μελέτες και έχουν αναφέρει την παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικών ενώσεων, όπως π-κουμαρικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ και ισοφερουλικό οξύ, όπως επίσης την παρουσία λιγνανών και τετρανορ-τριτερπενοειδών (Reshma et al., 2013).

Οι κύριες λιγνάνες του σησαμιού είναι η σησαμίνη και η σησαμόλη (Σχήμα 2.1) με την συνολική περιεκτικότητα σε αυτές τις δύο λιγνάνες να μπορεί να υπερβαίνει το 1,4%. Έχουν περιγραφεί πολυάριθμες δευτερεύουσες λιγνάνες που υπάρχουν στους σπόρους σε χαμηλές συγκεντρώσεις και/ή που δημιουργούνται από χημικούς μετασχηματισμούς κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των σπόρων και των ελαίων. Μεταξύ αυτών, η σησαμόλη, η επισεσαμίνη και η σαμίνη (Σχήμα 2.1.) έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η σησαμόλη είναι ένα προϊόν αποικοδόμησης που υπάρχει σε ίχνη σε μη καβουρδισμένους σπόρους, αλλά εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους καβουρδισμένους σπόρους και στο επεξεργασμένο σησαμέλαιο. Επίσης, η οικονομική αξία των λιγνανών αντικατοπτρίζεται από τα πολυάριθμα διπλώματα ευρεσιτεχνίας που καλύπτουν τον καθαρισμό, τους χημικούς μετασχηματισμούς και τη χρήση λιγνανών σε πρόσθετα τροφίμων που προάγουν την υγεία και σε συστατικά προϊόντων φροντίδας του δέρματος (Andargie et al., 2021).



Σχήμα 2.1. Δομές βασικών λιγνανών σησαμιού.

Η συγκέντρωση των λιγνανών στους σπόρους ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του σησαμιού. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνάνη είναι ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό και σημαντικός στόχος για την αναπαραγωγή σησαμιού, ενώ μόλις πρόσφατα διερευνήθηκε συστηματικά η κληρονομικότητα της περιεκτικότητας σε λιγνάνη (Andargie et al., 2021).

Οι λιγνάνες είναι μεταβολίτες που σχηματίζονται από δύο μόρια φαινυλοπροπανοειδών. Στο σησάμι, η σύνθεση λιγνανών περιλαμβάνει τη σύντηξη πλευρικών αλυσίδων οξοπροπανίου κινναμυλικής αλκοόλης σε έναν πυρήνα φουροφουράνης (3,7-διοξαδικυκλο[3.3.0.]οκτάνιο). Αυτοί οι μεταβολίτες ονομάζονται λιγνάνες φουροφουράνης (Andargie et al., 2021).

Οι λιγνάνες του σησαμιού προσέλκυσαν το ενδιαφέρον των διατροφολόγων και των επαγγελματιών υγείας λόγω των δράσεων τους που προάγουν την υγεία, όπως η μείωση των επιπέδων γλυκόζης και χοληστερόλης στο αίμα, η πρόληψη κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου και η ανακούφιση του μετεμμηνοπαυσιακού συνδρόμου. Η ικανότητα της σησαμίνης να καταστέλλει την ανάπτυξη όγκου υποδηλώνει ότι η σησαμίνη μπορεί ακόμη και να αναπτυχθεί ως θεραπευτικός παράγοντας (Andargie et al., 2021).

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των σπόρων σησαμιού ή του σησαμέλαιου και των συστατικών του σχετικά με την πιθανή δράση τους ενάντια στο οξειδωτικό στρες και τις επιπλοκές του έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων μελετών. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι μελέτες με σησαμέλαιο έχουν αναφέρει μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση των επιπέδων βιταμίνης E. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με την επίδραση της κατανάλωσης ταχινιού στην ανθρώπινη υγεία (Baxevanis et al., 2021).

3 ΣΤΕΜΦΥΛΑ

Τα σταφύλια είναι μια από τις πιο ευρέως διαδιδόμενες καλλιέργειες φρούτων σε όλο τον κόσμο και περίπου το 80% της παραγωγής χρησιμοποιείται από την βιομηχανία οινοποίησης. Τα στερεά απόβλητα που παράγονται μετά την οινοποίηση μπορεί να αντιπροσωπεύουν πάνω από το 30% (w/w) των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται, οδηγώντας σε θέμα για την διαχείριση των αποβλήτων, τόσο από οικολογική όσο και από οικονομική άποψη. Τα στέμφυλα είτε αποστέλλεται σε αποστακτήρια για λήψη αιθανόλης, είτε απορρίπτονται ως φυσικά απόβλητα, ακόμη χρησιμοποιούνται ως κομπόστ ή ζωοτροφή, αλλά η παραγωγική χρήση τέτοιων υποπροϊόντων θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικά οικονομικά οφέλη. Γίνεται αυξανόμενη προσπάθεια για την αξιοποίηση τέτοιων υπολειμμάτων με σκοπό την λήψη παραπροϊόντων υψηλής αξίας, όπως φυσικά φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής και νέα λειτουργικά συστατικά τροφίμων (Carullo et al., 2020, Drosou et al., 2015, Wang et al., 2017, Rainero et al., 2022).

Μελέτες των τελευταίων δύο δεκαετιών έχουν παράσχει αναμφισβήτητα στοιχεία σχετικά με το ρόλο των πολυφαινόλων του σταφυλιού στο να βοηθούν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων ασθενειών. Δεδομένης της πληθώρας των πιθανών οφελών για την υγεία που αποδίδονται στις φαινολικές ενώσεις του σταφυλιού, υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για λειτουργικά τρόφιμα εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες εκχυλισμάτων σταφυλιού (Sridhar & Charles, 2021).

Τα στέμφυλα από κόκκινα σταφύλια αποτελούν μια φθηνή πηγή πολύτιμων φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν κυρίως ανθοκυανίνες (π.χ. μαλβιδίνη και πεονιδίνη), флаβαν-3-όλες (π.χ. κατεχίνη και προανθοκυανιδίνες), флаβονόλες (π.χ. κερκετίνη, μυρικετίνη), στυλβένια και φαινολικά οξέα. Συγκεκριμένα, η φλούδα του σταφυλιού είναι πηγή ανθοκυανινών, φυσικών χρωστικών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που δρουν μέσω της αναστολής της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και οι οποίες έχουν επίσης αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Οι σπόροι του σταφυλιού είναι γνωστό ότι είναι πλούσιοι σε προκυανιδίνες, οι οποίες έχουν αναφερθεί για καρδιοπροστατευτικές δράσεις, πρόληψη καταρράκτη, αντιυπεργλυκαιμικές, αντιφλεγμονώδεις, καθώς και αντικαρκινικές δράσεις (Drosou et al., 2015).

Η ανάκτηση αυτών των βιοδραστικών ενώσεων πραγματοποιείται συνήθως μέσω μιας μεθόδου εκχύλισης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες διαδικασίες εκχύλισης είναι η μηχανική ανάδευση και η εκχύλιση κατά Soxhlet. Αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως η απώλεια ενώσεων λόγω υδρόλυσης, οξειδωσής και μεγάλου χρόνου εκχύλισης, και η πιθανή περιβαλλοντική ρύπανση λόγω των μεγάλων όγκων οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται. Ως εκ τούτου, τείνουν να αντικατασταθούν από διάφορες νέες τεχνικές

εκχύλισης, όπως η υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (ultrasound-assisted extraction, UAE) και η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (microwave-assisted extraction, MAE), οι οποίες επικεντρώνονται στη μείωση ή ακόμη και στην αποτροπή της χρήσης οργανικών διαλυτών για τη λήψη προϊόντων με υψηλότερη προστιθέμενη αξία (Drosou et al., 2015).

4 AQUAFABA

Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει δημοφιλές ένα προϊόν διατροφής που ονομάζεται «Aqua faba», το οποίο είναι θρεπτικό και κατάλληλο για vegan διατροφή. Το aquafaba είναι ένας συνδυασμός δύο λατινικών λέξεων, «aqua» για το νερό και «faba» για την οικογένεια *Fabaceae* (οσπριοειδή). Το aquafaba είναι το παχύρρευστο υγρό που προκύπτει από το μαγείρεμα σπόρων ρεβιθιού ή άλλων οσπρίων σε νερό. Το aquafaba κερδίζει δημοτικότητα από το 2014, όταν ένας νέος blogger συνταγών χρησιμοποίησε το υγρό που περίσσεψε από μία κονσέρβα ρεβιθιών ως υποκατάστατο αυγού σε χορτοφαγική μαρέγκα. Λόγω των επιθυμητών ιδιοτήτων αφρισμού και γαλακτωματοποίησης, το aquafaba χρησιμοποιείται πλέον ευρέως από την κοινότητα των vegan ως υποκατάστατο αυγών σε πολλά προϊόντα διατροφής, όπως μαγιονέζα, μαρέγκες και αρτοσκευάσματα (He et al., 2019). Όταν συγκρίθηκαν οι θρεπτικές αξίες των ωμών και των μαγειρεμένων οσπρίων, παρατηρήθηκε μείωση στην ποσότητα των πολύτιμων θρεπτικών ενώσεων στα μαγειρεμένα όσπρια. Αυτό συμβαίνει επειδή τα όσπρια περιέχουν πολλά υδατοδιαλυτά συστατικά όπως πρωτεΐνες (λευκωματίνες κ.λπ.), υδατάνθρακες (ζάχαρη, φυτικές ίνες), φαινολικά οξέα και σαπωνίνες, τα οποία περνούν στο νερό που απορρίπτεται (Eren et al., 2021).

4.1 Λειτουργικές ιδιότητες aquafaba

Το aquafaba έχει την ικανότητα συγκράτησης νερού και ελαίου (water holding capacity, oil holding capacity), σταθεροποίησης γαλακτώματος, αφρισμού, ζελατινοποίησης και πήξης. Τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του aquafaba στην επεξεργασία τροφίμων σχετίζονται με την ικανότητά του να συγκρατεί έλαιο και νερό. Έχει προσδιοριστεί ότι η ικανότητά του για συγκράτηση του ελαίου είναι υψηλότερη από αυτή για το νερό. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του aquafaba, με μερικούς από αυτούς να είναι η ποικιλία και οι συνθήκες παραγωγής, το μούλιασμα, οι τεχνικές επεξεργασίας, οι βοηθητικές ουσίες όπως ένζυμα, οξέα, βάσεις και άλατα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Eren et al., 2021).

Οι διαφορετικοί γονότυποι των ποικιλιών ρεβιθιού έχουν αποκαλύψει σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Είναι λογικό ότι η σύνθεση και η συμπεριφορά των ρεβιθιών επηρεάζονται κατά την αποθήκευση και τη βιομηχανική επεξεργασία, δηλαδή από περιβαλλοντικές συνθήκες. Συμπερασματικά, έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός μετάβασης των μορίων από τους σπόρους στο aquafaba μπορεί να επηρεαστεί από διαφορές στον γονότυπο και το περιβάλλον (Eren et al., 2021).

Τα προϊόντα με βάση τα όσπρια αξιοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς τα όσπρια θεωρούνται θρεπτικές καλλιέργειες για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και άμυλο σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος παραγωγής τους (Alsalman et al., 2020).

Οι πιο κοινές φυτικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικά επίπεδα περιλαμβάνουν εκείνες που προέρχονται από όσπρια όπως η σόγια, τα ρεβίθια και τα μπιζέλια. Τα ρεβίθια (*Cicer arietinum* L.) είναι μονοετή όσπρια, εγγενή στην περιοχή της Μεσογείου και το κύριο συστατικό πολλών μεσογειακών, ινδικών και Μέσης Ανατολής πιάτων, όπως το χούμους ή το φαλάφελ. Τα ρεβίθια μουλιάζονται γενικά όλη τη νύχτα και βράζουν για να αποκτήσουν, αφενός μια υφή αποδεκτή από τους καταναλωτές και αφετέρου να βελτιωθεί η διατροφική τους ποιότητα. Το νερό βρασμού των ρεβιθιών ή το aquafaba που παράγεται σε οικιακό επίπεδο ή προέρχεται από κονσέρβες ρεβιθιών συνήθως απορρίπτεται. Ωστόσο, αυτός ο πόρος είναι πολύτιμος όχι μόνο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ενώσεις που προάγουν την υγεία, όπως οι πολυφαινόλες, αλλά και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες (Lafarga et al., 2019).

5 ΣΚΟΠΟΣ

Το σησάμι περιέχει μία πληθώρα φαινολικών συστατικών, που παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Τα φαινολικά συστατικά, γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση, και συγκεκριμένα οι λιγνάνες του σησαμιού, έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως προς τη διατροφική τους αξία για τον άνθρωπο, με θετικά μέχρι στιγμής αποτελέσματα. Όλες οι μελέτες με σησαμέλαιο έχουν αναφέρει μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης E. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για το ταχίνι, το οποίο αποτελεί προϊόν κατεργασίας του σησαμιού.

Μία εναλλακτική αξιοποίηση των υποπροϊόντων των τροφίμων είναι η ενσωμάτωσή τους σε άλλα τρόφιμα, καθιστώντας τα έτσι λειτουργικά συστατικά και πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Τα στέμφυλα από κόκκινα σταφύλια αποτελούν μια φθηνή πηγή πολύτιμων φαινολικών ενώσεων. Από την άλλη, το νερό βρασμού των ρεβιθιών ή το aquafaba που παράγεται σε οικιακό επίπεδο ή προέρχεται από κονσέρβες ρεβιθιών συνήθως απορρίπτεται. Ωστόσο, είναι πολύτιμο όχι μόνο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ενώσεις που προάγουν την υγεία, όπως οι πολυφαινόλες, αλλά και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες.

Λόγω των παραπάνω ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η *in vitro* μελέτη εμπλουτισμένου ταχινιού με εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό και aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά και η επίδρασή τους στην βιοδραστικότητά του. Οι μηχανισμοί οξείδωσης και θρόμβωσης εμπλέκονται άμεσα με την ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων και η μελέτη ουσιών-τροφίμων με πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση μπορεί να αναδείξει βιοδραστικότητες που υποδεικνύουν μία προληπτική επίδραση ενάντια στην ανάπτυξη χρόνιων παθήσεων με κύριους αιτιολογικούς μηχανισμούς σε μοριακό επίπεδο την οξείδωση, τη θρόμβωση και την φλεγμονή.

6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Δείγματα και Υλικά

Για την παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν ταχίνι και σπόροι σησαμιού που καλλιεργήθηκαν στη νήσο Λήμνο, τα οποία παραχωρήθηκαν από τοπική βιομηχανία. Στέμφυλα κόκκινων σταφυλιών της ποικιλίας Λημνιό από το Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου (Μύρινα Λήμνου, Ελλάδα). Ξηρά ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά, τα οποία αγοράστηκαν από τοπικό σουπερμάρκετ (Μύρινα Λήμνου, Ελλάδα).

6.2 Παραγωγή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό και εμπλουτισμός με ταχίνι

Ο στόχος ήταν η παραγωγή εκχυλίσματος στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό (Εικόνα 6.1.) με τις καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ο εμπλουτισμός του ταχινιού σε μικρή ποσότητα με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Αρχικά αξιολογήθηκαν τρία εκχυλίσματα στέμφυλων, ένα με εκχύλιση υπερήχων (ultrasound-assisted extraction, UAE), ένα με εκχύλιση μικροκυμάτων (microwave-assisted extraction, MAE) και ένα με τον συνδυασμό μικροκυμάτων - υπερήχων (microwave-ultrasound assisted extraction, MUAE), και επιλέχθηκε ο συνδυασμός με βάση την αντιοξειδωτική του δράση στην δοκιμασία ABTS (Παράρτημα Α). Τέλος, το ταχίνι εμπλουτίστηκε σε πέντε διαφορετικές αναλογίες με το εκχύλισμα των στέμφυλων και επιλέχθηκε το 4% ως την βέλτιστη αναλογία (Παράρτημα Β).

Για την καλύτερη μελέτη των αποτελεσμάτων παρασκευάστηκαν μείγματα ταχινιού με κάθε πρώτη ύλη χωριστά. Έτσι είχαμε τα παρακάτω μείγματα με τις αναλογίες που φαίνονται στον Πίνακα 6.1.:

- ✓ **Control:** ταχίνι,
- ✓ **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού Λήμνου,
- ✓ **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό,
- ✓ **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά,
- ✓ **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό και λυοφιλοποιημένο aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά.

Επίσης, ως αναφορά, μελετήθηκαν και οι πρώτες ύλες αυτούσιες:

- ✓ **Cake:** cake σησαμιού Λήμνου,
- ✓ **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημνιό, και
- ✓ **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba, από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά.

Πίνακας 6.1. Ποσότητες εμπλουτισμού ταχινιού.

Δείγματα	Ταχίνι	Cake σησαμιού	Εκχύλισμα στέμφυλων	Aquafaba
Control	100%			
C	95%	5%		
LC	91%	5%	4%	
AC	89%	5%		6%
LAC	85%	5%	4%	6%

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba.



Εικόνα 6.1. Αντιπροσωπευτική εικόνα από το δείγμα στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

6.2.1 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με υπερήχους

Η παρασκευή του εκχυλίσματος με υποβοήθηση από υπερήχους από στέμφυλα σταφυλιών ποικιλίας Λημιό έγινε με εκχύλιση 25 g στέμφυλων σε 250 mL νερό (10% w/v) σε λουτρό υπερήχων (Elma Schmidbauer GmbH, Elmasonic P, Γερμανία) στα 37 KHz, 100% Power, στους 70 °C για 30 min. Το εκχύλισμα διηθήθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

6.2.2 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με μικροκύματα

Η παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με μικροκύματα έγινε με εκχύλιση 350 g στέμφυλων σε εκχυλιστήρα μικροκυμάτων για φυσικά προϊόντα (Milestone Srl, ETHOS X, Ιταλία) στα 350 Watt για 33 min. Το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

6.2.3 Παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση από συνδυασμό μικροκυμάτων - υπερήχων

Η παρασκευή εκχυλίσματος κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό με υποβοήθηση με συνδυασμό μικροκυμάτων - υπερήχων έγινε με εκχύλιση 25 g στέμφυλων τα οποία εκχυλίστηκαν διαδοχικά με μικροκύματα (Υποκεφάλαιο 6.2.2) και στη συνέχεια με υπερήχους σε 250 mL νερό (10% w/v) σε λουτρό υπερήχων (Elma Schmidbauer GmbH, Elmasonic P, Γερμανία) στα 37 KHz, 100% Power, στους 70 °C για 30 min. Το εκχύλισμα διηθήθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

6.3 Συμπύκνωση - ξήρανση εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (Genevac LTD, miVac DUC-23050-b00, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε dH₂O, και προστέθηκε cake σησαμιού σε ποσότητα τέτοια ώστε η αναλογία να είναι (50:50). Μετά την συμπύκνωση, κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο (IKA, A 10 Basic, Γερμανία) (Εικόνα 6.2.), ενώ υπολογίστηκε το βάρος του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος, και η τελική αναλογία (εκχύλισμα:cake σησαμιού) ήταν (45,35:54,65). Η καθαρή αναλογία του cake σησαμιού που χρησιμοποιήθηκε στον εμπλουτισμό όλων των δειγμάτων ήταν 5%.



Εικόνα 6.2. Αντιπροσωπευτική εικόνα από αποξηραμένο εκχύλισμα στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό με cake σησαμιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

6.3.1 Παρασκευή cake σησαμιού

Η παρασκευή του cake σησαμιού (Εικόνα 6.3.) έγινε με απομάκρυνση του ελαίου με εξάνιο. Αφού ελέγχθηκαν για εμφανή ελαττώματα ή υπολείμματα, κονιορτοποιήθηκαν 100 g σησάμι Λήμνου για 10 s σε οικιακό μύλο άλεσης του καφέ, και στην συνέχεια προστέθηκαν 300 mL εξάνιο ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$). Ακολούθησε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα (Steroglass s.r.l., Steromag, Ιταλία) για 30 min, απόχυση του διαλύτη και ξήρανση σε φούρνο (Binder GmbH, ED 115, Γερμανία) στους 70 °C για 72 h. Τέλος, το αλεσμένο απολιπασμένο σησάμι κοσκινίστηκε σε οικιακό κόσκινο και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να χρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 6.3. Αντιπροσωπευτική εικόνα απολιπασμένου Cake σησαμιού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

6.4 Παρασκευή λυοφιλοποιημένου aquafaba

Η παρασκευή του aquafaba έγινε σύμφωνα με τους He et al. (2021) με κάποιες διαφορές. Ξηρά ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά εμποτίστηκαν σε αναλογία 1:4 με πόσιμο μαλακό νερό για 16 h στους 7 °C. Το νερό του εμποτισμού στην συνέχεια απορρίφθηκε. Σε οικιακή χύτρα ταχύτητας (Fissler, 8L, Γερμανία) προστέθηκαν 2 Kg εμποτισμένα σε νερό ρεβίθια και 3 L απεσταγμένο νερό, αναλογία (2:3), και έβρασαν για 30 min. Το aquafaba διαχωρίστηκε από τα μαγειρεμένα ρεβίθια χρησιμοποιώντας ανοξείδωτο φίλτρο με οπές 1mm και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

Στην συνέχεια το aquafaba από τους -80 °C υπέστη λυοφιλοποίηση (Biobase Biodustry (Shandong) Co. Ltd, BK-FD10PT, Κίνα) και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την χρήση. Η αναλογία του λυοφιλοποιημένου aquafaba (Εικόνα 6.4.) που χρησιμοποιήθηκε στον εμπλουτισμό ήταν 6%.



Εικόνα 6.4. Αντιπροσωπευτική εικόνα από λυοφιλοποιημένο aquafaba που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

6.5 Εκχύλιση κατά Bligh & Dyer

Ο σκοπός της εκχύλισης κατά Bligh & Dyer είναι η παραλαβή των πολικών υδατοδιαλυτών μορίων και βασίζεται στη ταυτόχρονη εκχύλιση και κατανομή αυτών στη υδατομεθανολική φάση διφασικού συστήματος διαλυτών διαχωριζόμενα από άλλα μη λιποδιαλυτά συστατικά που κατανέμονται στην χλωροφορμική φάση του διφασικού συστήματος (Bligh & Dyer, 1959).

Πειραματική διαδικασία

Σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης με βιδωτό καπάκι των 50 mL τοποθετείται ποσότητα από τα υπό μελέτη δείγματα (2,0 g). Προστίθενται 4,0 mL μεθανόλη (CH₃OH), και αναδεύονται σε κυκλοαναδευτήρα (Labbox Labware S.L., LBX instruments V05 series, Ισπανία) για 1,0 min. Ακολουθεί ανάδευση σε επιτραπέζιο περιστροφικό αναδευτήρα (Gesellschaft für Labortechnik mbH, GFL 3017, Γερμανία) στα 250 rpm για 10 min. Στην συνέχεια προστίθενται 1,6 mL dH₂O και 2,0 mL χλωροφόρμιο (CHCl₃), οπότε επέρχεται αναλογία (χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό) (1:2:0,8 v/v/v), και αναδεύονται στον επιτραπέζιο περιστροφικό αναδευτήρα στα 250 rpm για άλλα 5 λεπτά. Τα διαλύματα φυγοκεντρούνται (Orto Alresa - Alvarez Redondo SA, Digicen 21R, Ισπανία και HERMLE Labortechnik GmbH, Z383, Γερμανία) στα 1500×g για 10 min και το υπερκείμενο αποχύνεται σε βιδωτούς σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15 mL. Προστίθενται 2,0 mL CHCl₃ και 2,0 mL dH₂O ώστε να έχουμε τελική αναλογία (χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό) (1:1:0,9 v/v/v), προς δημιουργία διφασικού διαλύματος. Γίνεται διαχωρισμός των φάσεων με φυγοκέντρηση στα 1500×g για 5 min (HERMLE Labortechnik GmbH, Z383, Γερμανία), απόρριψη της κάτω φάσης (χλωροφορμική) και αποθήκευση της πάνω (υδατομεθανολική) στους -40 °C για 24 h. Μεταφορά εκχυλισμάτων ανά 1,0 mL σε μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου τύπου Eppendorf με πώμα των 1,5 mL και φυγοκέντρηση (Hermle Labortechnik GmbH, Z216 MK, Γερμανία) στα 20,000×g για 5 min. Μεταφορά χωρίς ίζημα 0,800 mL σε νέα μικροφιαλίδια πολυπροπυλενίου τύπου Eppendorf και αποθήκευση στους -40 °C έως περαιτέρω ανάλυσης.

6.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) είναι μία διαδικασία φασματοφωτομετρική που βασίζεται σε μία χημική αναγωγή του ομόλογου αντιδραστηρίου (αντιδραστήριο FC) που αποτελεί ένα μείγμα οξειδίων βολφραμίου και μολυβδαινίου. Τα προϊόντα της αναγωγής των οξειδίων των μετάλλων έχουν μπλε χρώμα, το οποίο παρουσιάζει μία απορρόφηση φωτός σε ευρεία περιοχή του ορατού με μέγιστο στα 765 nm. Η ένταση της απορρόφησης του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Η ανάπτυξη του χρώματος είναι αργή αλλά μπορεί να επιταχυνθεί με τη θέρμανση του δείγματος. Με την υπερβολική θέρμανση, ωστόσο, ακολουθεί γρήγορη απώλεια του χρώματος και καθιστά πολύ δύσκολη την μέτρηση αναπαραγωγικών αποτελεσμάτων. Το αντιδραστήριο FC είναι εμπορικά διαθέσιμο, αλλά μπορεί να παρασκευαστεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο παρασκευής του (Singleton and Rossi, 1965).

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες των εκχυλισμάτων, προς προσδιορισμό φαινολικών. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη dH₂O ως τελικού όγκου 1.800 μL. Ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 100 μL αντιδραστηρίου FC και καλή ανάδευση με τον κυκλοαναδευτήρα. Στην συνέχεια, επωάζονται για 2 λεπτά σε σκοτεινό μέρος (η επώαση δεν θα πρέπει να ξεπεράσει τα 8 λεπτά) και γίνεται προσθήκη 300 μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃) και ξανά καλή ανάδευση με τον κυκλοαναδευτήρα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 40 °C για επώαση 30 λεπτών και ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα) στα 765 nm με καταγραφή των τιμών απορρόφησης. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

6.6.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Γαλλικό Οξύ (Gallic acid, GA)

Ποσότητα 0,01 g γαλλικού οξέος (M.W: 170.12 g/mol) διαλύεται σε 200 μL αιθανόλης και το όλο αραιώνεται ως τελικού όγκου 2,0 mL με dH₂O δίνοντας συγκέντρωση 5.000 mg/L. 200 μL του διαλύματος αραιώνονται ξανά σε 1,8 mL dH₂O δίνοντας τελική συγκέντρωση 500 mg/L.

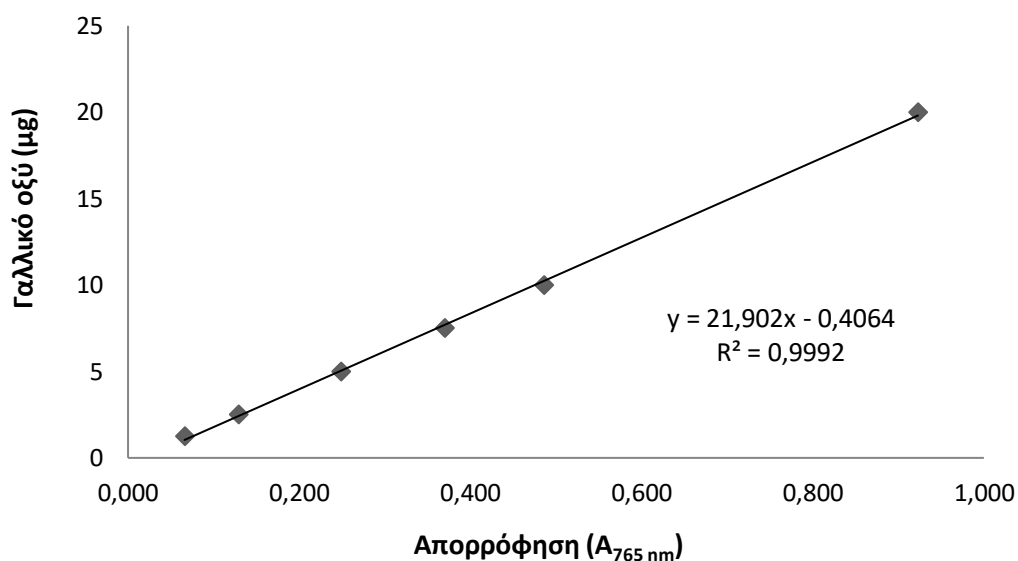
Διάλυμα Ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃)

Ποσότητα 200 g άνυδρου Na₂CO₃ (M.W: 105.99 g/mol) διαλύονται σε 800 mL dH₂O και το όλο φέρεται σε βρασμό. Αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται λίγοι κρύσταλλοι Na₂CO₃ και αφήνεται για 24h. Ακολουθεί διήθηση σε ογκομετρική φιάλη του 1 L όπου και συμπληρώνεται ως τη χαραγή με dH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

6.6.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος προσθέτουμε ποσότητες 2,5, 5, 10, 15, 20 και 40 μL από το διάλυμα φύλαξης γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 500 mg/L (3 mM) (Διάγραμμα 6.1.). Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα με 1.800 μL dH₂O, 100 μL αντιδραστηρίου FC και 300 μL διαλύματος κορεσμένου Na₂CO₃.

Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu



Διάγραμμα 6.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας Folin-Ciocalteu.

6.7 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται στα υπό μελέτη δείγματα γίνεται με μία φασματοφωτομετρική μέθοδο, όπου η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών ενώσεων που περιέχονται στο διάλυμα. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 510 nm.

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται κατάλληλοι όγκοι εκχυλισμάτων, συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O έως τα 0,740 mL, προστίθενται 0,03 mL 5% NaNO₂ και αναδεύονται σε κυκλοαναδευτήρα. Μετά από 5 λεπτά ακολουθεί προσθήκη 0,03 mL 10% AlCl₃ και ξανά καλή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα. Μετά από 6 λεπτά προστίθενται 0,2 mL NaOH 1M και ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα) στα 510 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλύματος φύλαξης του προτύπου ρουτίνης συγκέντρωσης 1,505 mM καθώς και ένα κενό τυφλό διάλυμα για το τυφλό προσδιορισμό και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μg ρουτίνης.

6.7.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Ρουτίνη (Rutin, R)

Ποσότητα 8,3 mg ρουτίνης (M.W.: 664,58 g/mol) διαλύεται σε 8,3 mL μεθανόλης δίνοντας τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 1,505 mM.

Νιτρώδες Νάτριο 5% (NaNO₂)

Ποσότητα 5,0 g NaNO₂ προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

Τριχλωριούχο Αργίλιο 10% (AlCl₃)

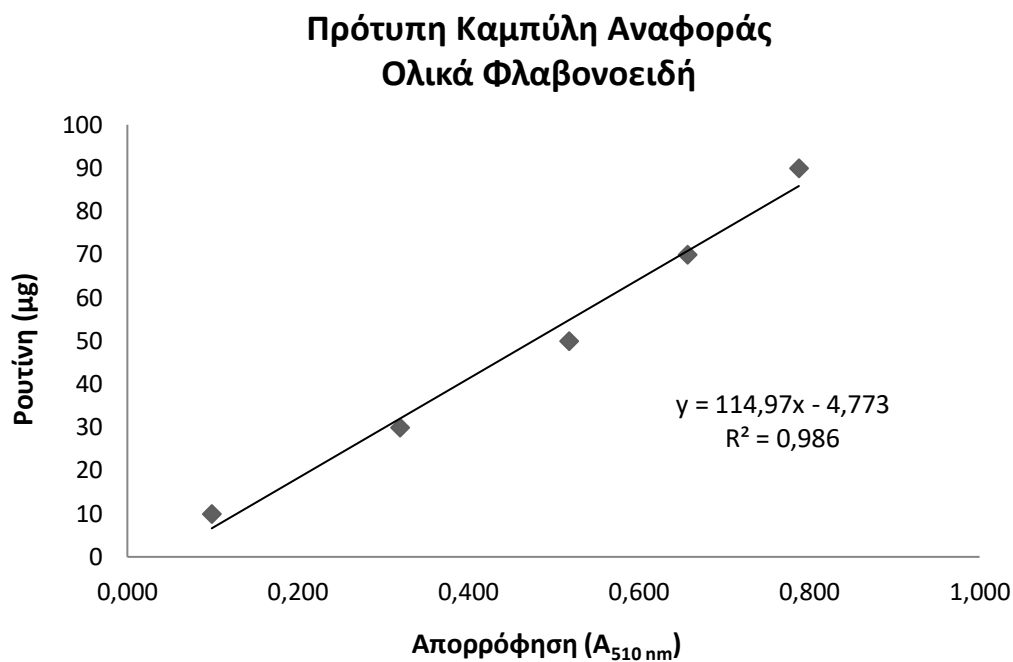
Ποσότητα 10,0 g AlCl₃ προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 1M

Ποσότητα 4,0 g NaOH (M.W.: 40,0 g/mol) προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

6.7.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

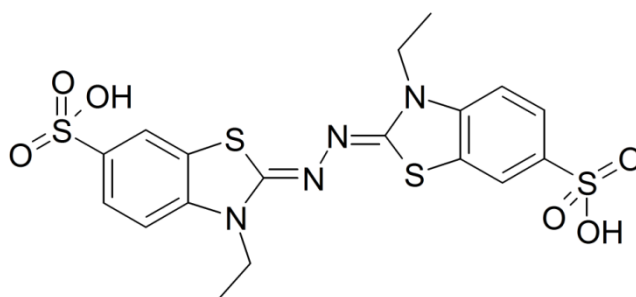
Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς ρουτίνης παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης ρουτίνης συγκέντρωσης 1,505 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις ποσότητες 10, 30, 50, 70 και 90 μg ρουτίνης (Διάγραμμα 6.2.).



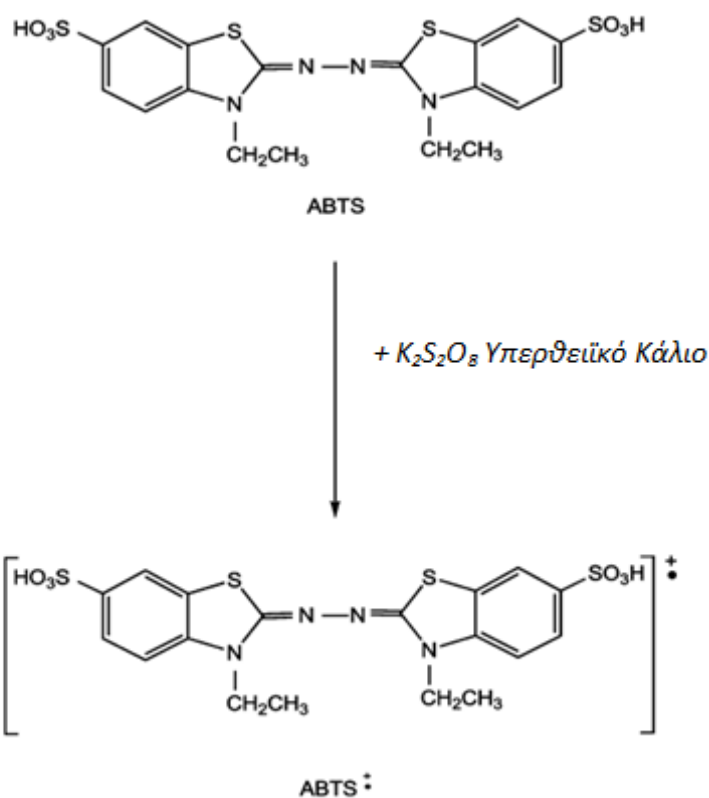
Διάγραμμα 6.2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών.

6.8 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία του 2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid], ABTS)

Η αρχή της μεθόδου του ABTS (2,2'-αζινο-δισ-[3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος]) (Σχήμα 6.1.) βασίζεται στην οξείδωσή του προς ριζικό κατιόν με υπερθεϊκά ιόντα με βαθύ κυανοπράσινο χρώμα που απορροφά ισχυρά στα 734 nm, και στον ακόλουθο αποχρωματισμό αυτού υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών.



Σχήμα 6.1. Δομή αντιδραστηρίου ABTS.



Σχήμα 6.2. Σχηματισμός σταθερών ριζών ABTS από ABTS με υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$).

Το ABTS^{•+} μπορεί να παραχθεί είτε από χημική αντίδραση [π.χ. με διοξείδιο μαγγανίου (MnO_2) ή υπερθειικό κάλιο ($K_2S_2O_8$)] (Σχήμα 6.2.) ή από ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. μεθμυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη).

Γενικά, η χημική αντίδραση απαιτεί πολύ χρόνο (μέχρι και 16 ώρες για την παραγωγή υπερθειικού καλίου) ή υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι ταχύτερες και οι συνθήκες αντίδρασης ηπιότερες.

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

Οι πιο πρόσφατες αναθεωρημένες μέθοδοι μετρούν την μείωση της απορροφητικότητας του ABTS^{•+} παρουσία του προς εξέταση δείγματος σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα 4-6 min.

Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος ABTS^{•+} που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται σε mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του

ABTS^{•+} (Scavenging Amount 50%, SA₅₀) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Moore & Yu, 2007).

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλισμάτων. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ανά 30 s, 1.000 μL διαλύματος εργασίας του ριζικού κατιόντος του ABTS (ABTS^{•+}) και ακολουθεί ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται σε σκοτεινό μέρος για 15 min ακριβώς. Μετά τα 15 min της επώασης ακολουθεί καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734 nm (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα). Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

6.8.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος ABTS

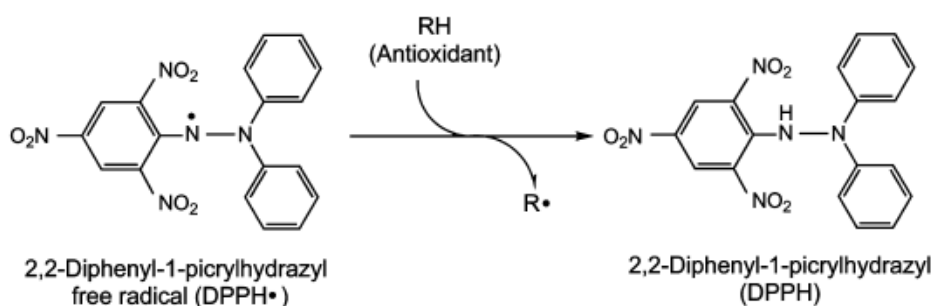
Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL τοποθετούνται 20 mL dH₂O και προστίθενται 0,1801 g ABTS (M.W: 514,62 g/mol) και 0,0331 g K₂S₂O₈ (M.W: 270,322 g/mol). Ακολουθεί ανάδευση έως διαλυτοποίησης και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 50,0 mL για να δώσει συγκέντρωση 7 mM σε ABTS και 2,45 mM σε K₂S₂O₈. Το μείγμα που δημιουργείται διατηρείται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 16 h, ώστε να προκύψει βαθύ κυανό διάλυμα. Στη συνέχεια αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40 °C.

Παρασκευή διαλύματος εργασίας ριζικού κατιόντος ABTS

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL τοποθετούμε 49,5mL υπερκάθαρο νερό και 0,5 mL διαλύματος φύλαξης ριζικού κατιόντος του ABTS. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 734 nm η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε τιμή κοντά στο 0,700.

6.9 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)

Η αρχή της μεθόδου του DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλουδραζύλιο) βασίζεται στην εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματός του στα 515 nm κατά τη δέσμευσή του από τα αντιοξειδωτικά (Σχήμα 6.3.) (Moore & Yu, 2007).



Σχήμα 6.3. Αντίδραση του DPPH• με αντιοξειδωτικό για την παραγωγή DPPH.

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται κατάλληλοι όγκοι εκχυλισμάτων. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ανά 30 s, 1.000 μL διαλύματος εργασίας του ριζικού κατιόντος του DPPH και ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15min. Μετά την επώαση γίνεται φωτομέτρηση (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα) στα 515nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με Trolox (Σχήμα 6.4.) (ανάλογο της Βιταμίνης E με ικανότητα απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox/g τελικού προϊόντος. Χρησιμοποιείται ένας επιπλέον δοκιμαστικός σωλήνας για να παρασκευαστεί το διάλυμα για τον τυφλό προσδιορισμό.

6.9.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα φύλαξης DPPH συγκέντρωσης 600 μM

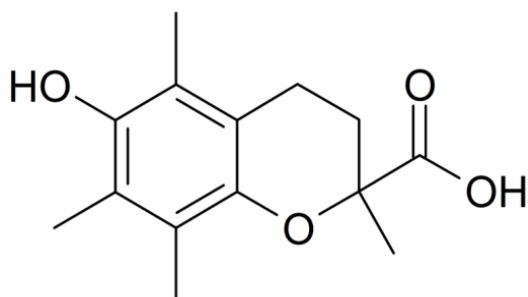
Ζυγίζονται 0,0118 g DPPH (m.w: 394,32 g/mol) και αναδιαλύονται σε 25 mL CH_3OH . Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με CH_3OH έως τα 50,0 mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C .

Παρασκευή διαλύματος εργασίας DPPH

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50 mL τοποθετούμε 45 mL μεθανόλης και 5 mL διαλύματος φύλαξης DPPH. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 515 nm η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε τιμή κοντά στο 0,600.

Διάλυμα φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM

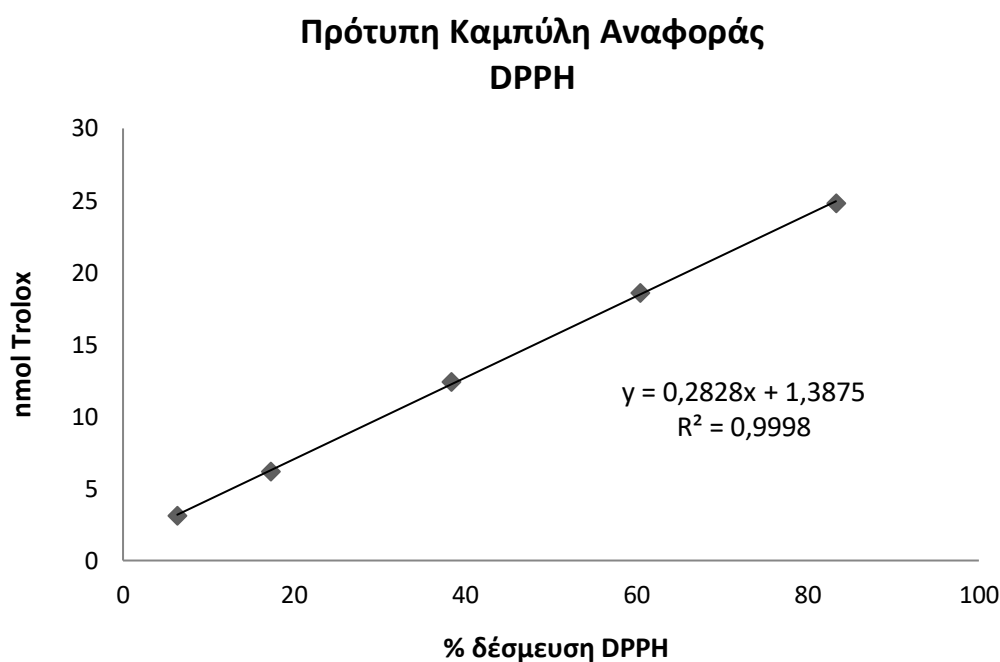
Ζυγίζονται 0,0160g Trolox 97% (M.W.: 250,29 g/mol) και αναδιαλύονται σε 5,0 mL CH_3OH . Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 10,0 mL με CH_3OH δίνοντας συγκέντρωση 6,2 mM. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C .



Σχήμα 6.4. Δομή Trolox.

6.9.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3,1, 6,2, 12,4, 18,6 και 24,8 nmol Trolox. Υπολογίζεται η % απόσβεση του DPPH για κάθε ποσότητα Trolox και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 6.3.).



Διάγραμμα 6.3. Πρότυπη Καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας DPPH.

6.10 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμασία CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)

Η δοκιμασία CUPRAC αποτελεί δοκιμασία μεταφοράς ηλεκτρονίου και βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των ελευθέρων ριζών και τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αναγωγής των ιόντων του χαλκού από τα αντιοξειδωτικά με παρακολούθηση της απορρόφησης στα 450 nm.

Πειραματική διαδικασία

Τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατάλληλες ποσότητες δειγμάτων και προστίθενται 300 μ L διαλύματος $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, 300 μ L διαλύματος νεοκουρποΐνης 7,5 mM, 300 μ L ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M pH=7,0 και συμπληρώνεται ο όγκος με dH_2O έως τελικού όγκου 1200 μ L. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα, επώαση για 30 min

στους 25 °C και καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 450 nm (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα). Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

Παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλύματος φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM, καθώς και διάλυμα για τον τυφλό προσδιορισμό ώστε τα αποτελέσματα να εκφραστούν ως ισοδύναμα Trolox.

6.10.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα διϋδρικού χλωριούχου χαλκού ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM

Ποσότητα ίση με 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M.W.: 170.48 g/mol) διαλύεται σε 100 mL dH_2O και στη συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με dH_2O έως τα 250 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1 M, pH=7,0

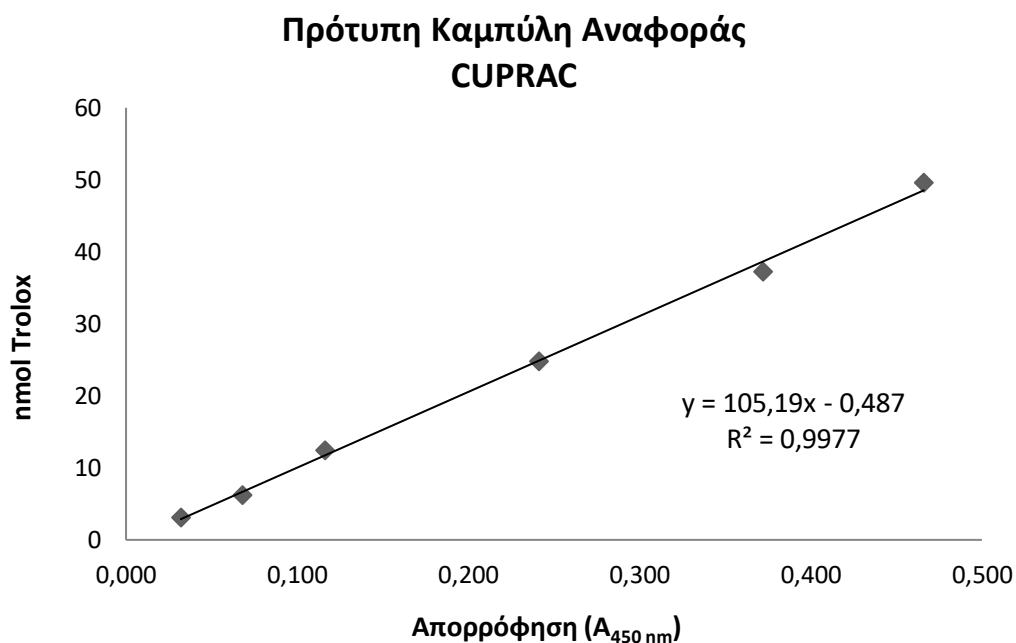
Ποσότητα $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ίση με 19,27 g (M.W.: 77,08 g/mol) διαλύεται σε 200 mL dH_2O , ρυθμίζεται το pH στο 7,0 και στη συνέχεια μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με dH_2O έως τα 250,0 mL.

Διάλυμα νεοκουπροΐνης (Neocuproine, Nc) 7,5 mM

Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα χρήσης του. Ποσότητα νεοκουπροΐνης ίση με 0,0163 g (M.W.: 217,27 g/mol) μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και διαλύεται έως τελικού όγκου 10 mL με αιθανόλη 96%.

6.10.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

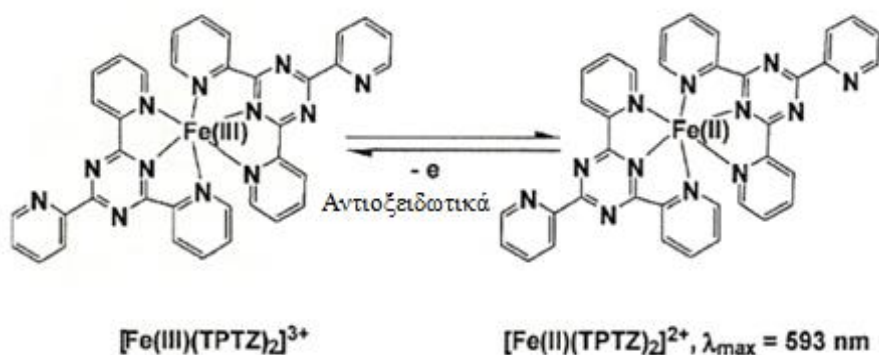
Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3,1, 6,2, 12,4, 24,8, 37,2 και 49,6 nmol Trolox (Διάγραμμα 6.4.).



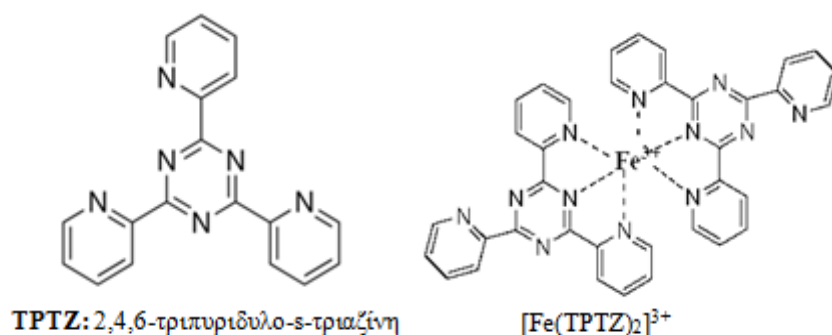
Διάγραμμα 6.4. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας CUPRAC.

6.11 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης εκχυλισμάτων με τη δοκιμασία FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Η δοκιμασία FRAP βασίζεται στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) προς δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών (Σχήμα 6.5.) και στον εν συνεχεία σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου του Fe^{2+} με την 2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη [$\text{Fe}(\text{TPTZ})_2$] $^{2+}$ σε όξινο περιβάλλον (Σχήμα 6.6.) που απορροφά ισχυρά στα 593 nm (Benzie & Strain, 1996).



Σχήμα 6.5. Αναγωγή του Fe^{3+} προς Fe^{2+} .



Σχήμα 6.6. Δομή του TPTZ και του [Fe(TPTZ)₂]³⁺.

Πειραματική διαδικασία

Σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται με χρήση αυτόματης πιπέτας κατάλληλες ποσότητες εκχυλισμάτων. Στην συνέχεια προστίθεται dH₂O σε κάθε δείγμα έως τελικού όγκου 900 μL. Στη συνέχεια προστίθενται ανά 30 sec 300 μL διαλύματος εργασίας FRAP σε όλα τα δείγματα και γίνεται καλή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Ακολούθως τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 10 min. Μετά την επώαση γίνεται καταγραφή της απορρόφησης στα 593 nm (Rayleigh, VIS-7220G, Κίνα). Τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

Παράλληλα ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλύματος φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM καθώς και διάλυμα εργασίας FRAP ως διάλυμα για τον τυφλό προσδιορισμό και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox.

6.11.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 3mM, pH=3.6 (ΔΙΑΛΥΜΑ Α)

Ζυγίζονται 3,1 g τριυδρικού οξικού νατρίου (CH₃COONa·3H₂O) (M.W: 136,08 g/mol), προστίθενται 16 mL κρυσταλλικού οξικού οξέος (CH₃COOH) και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό έως τα 100mL.

Παρασκευή διαλύματος HCl 40 mM

Προστίθενται 1,670 mL πυκνού HCl 37% (M.W: 36,46 g/mol) και συμπληρώνεται ο όγκος με απεσταγμένο νερό έως τα 500 mL (40 mM HCl).

Παρασκευή TPTZ (2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνης) (M.W: 312,33 g/mol) (ΔΙΑΛΥΜΑ Β)

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL προστίθενται 0,0312 g TPTZ και διαλύονται με 10 mL διαλύματος HCl 40mM.

Παρασκευή Τριχλωριούχου Σιδήρου $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M.W: 270,29 g/mol) (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ)

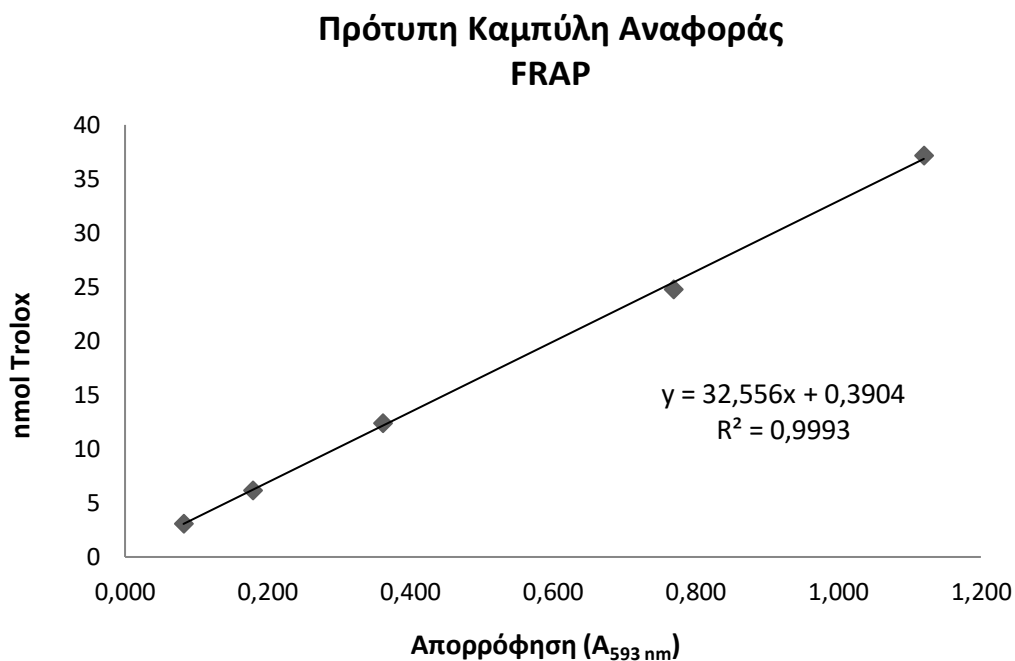
Σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL προστίθενται 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 10 mL απεσταγμένου νερού.

Παρασκευή αντιδραστηρίου FRAP

Αναμειγνύονται ποσότητες από τα διαλύματα Α, Β και Γ σε αναλογία 1:1:1 (v/v/v).

6.11.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3,1, 6,2, 12,4, 24,8, και 37,2 nmol Trolox (Διάγραμμα 6.5.).



Διάγραμμα 6.5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας FRAP.

6.12 Εκτίμηση της αντιαθηρογόνου δράσης εκχυλισμάτων μέσω αναστολής της *in vitro* οξειδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα Cu^{2+}

Η μέτρηση της *in vitro* οξειδωσης του πλάσματος από αίμα ανθρώπου προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245 nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξυδίων, που παράγονται κατά την οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu^{2+} .

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245 nm παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης της κινητικής της οξειδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα του αίματος. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξειδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245 αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξειδωση. Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245 nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μία σιγμοειδή καμπύλη με κύριο χαρακτηριστικό το χρόνο της λανθάνουσας φάσης (lag time).

Άλλα χαρακτηριστικά των καμπυλών οξειδωσης του πλάσματος είναι τα εξής:

- Μέγιστη ταχύτητα (V_{\max}) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245 nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min χρόνος (t_{\max}) κατά τον οποίο παρατηρείται η V_{\max} .
- Μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης (Schnitzer et al., 1998).

Πειραματική διαδικασία

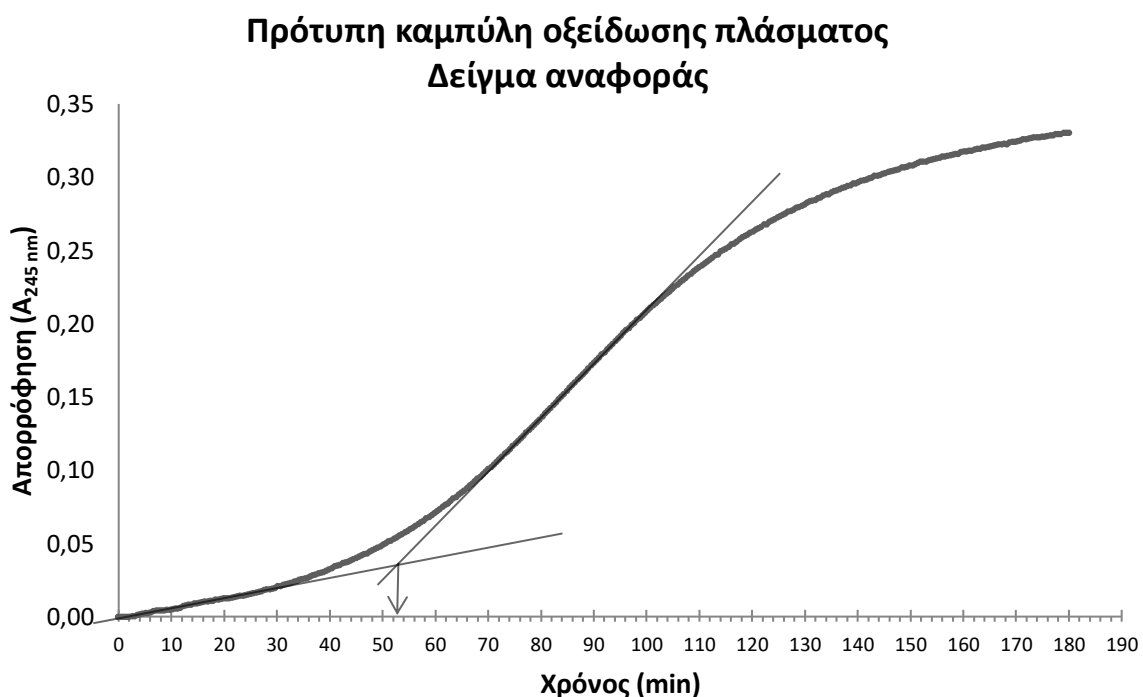
Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας κατάλληλες ποσότητες εκχυλισμάτων. Τα δείγματα εξατμίζονται σε ρεύμα αέριου αζώτου (N_2). Στην συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH=7,4 και 146 mM σε NaCl έως τελικού όγκου 880 μL , και ακολουθεί καλή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Παράλληλα ετοιμάζεται δείγμα αναφοράς που δεν περιέχει εκχύλισμα. Έπειτα γίνεται προσθήκη 20 μL πλάσματος σε όλα τα δείγματα και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Τέλος προστίθενται 100 μL υδατικού

διαλύματος $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mM, γίνεται ήπια ανάδευση και μεταφορά σε κυψελίδες. Τοποθετούνται στο φωτόμετρο (PerkinElmer Inc, Lambda 25, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής) για καταγραφή της απορρόφησης στα 245 nm για χρονικό διάστημα 3 ωρών.

Παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλύματος φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM, καθώς και διάλυμα για τον τυφλό προσδιορισμό ώστε τα αποτελέσματα να εκφραστούν ως ισοδύναμα Trolox.

Σημείωση

- Τα δείγματα με τα εκχυλίσματα συγκρίνονται ως προς το δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει PBS pH = 7,4, πλάσμα αίματος και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM προς προσδιορισμό της αντιθηρογόνου δράσης τους.
- Παρασκευάζεται ένα δείγμα αναφοράς για όλα τα υπό μελέτη δείγματα και υπολογίζεται ο χρόνος λανθάνουσας φάσης. Για τον υπολογισμό, φέρονται οι δύο εφαπτόμενες των ευθύγραμμων τμημάτων του χρόνου λανθάνουσας φάσης και της εκθετικής φάσης. Η τομή των δύο εφαπτόμενων δίνει το χρόνο λανθάνουσας φάσης, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 6.6.), η οποία μπορεί να βρεθεί, επίσης, από τη λύση του συστήματος των δύο εξισώσεων των εφαπτόμενων.



Διάγραμμα 6.6. Πρότυπη καμπύλη δείγματος αναφοράς οξείδωσης πλάσματος.

6.12.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH=7,4, 146 mM σε NaCl

Σε 240 mL dH₂O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται προς διαλυτοποίηση 0,2269 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,0602 g NaH₂PO₄·2H₂O και 2,1332 g NaCl. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και προστίθεται dH₂O έως τελικό όγκο 250 mL.

Υδατικό διάλυμα CuSO₄·5H₂O συγκέντρωσης 1 mM

Σε 200 mL dH₂O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται προς διαλυτοποίηση 49,939 mg CuSO₄·5H₂O.

Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC)

Σε 100 mL dH₂O διαλύονται 1,365 g ένυδρου κιτρικού οξέος (H₃C₆H₅O₇·H₂O) και 2,5 g διυδρικού κιτρικού νατρίου (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O).

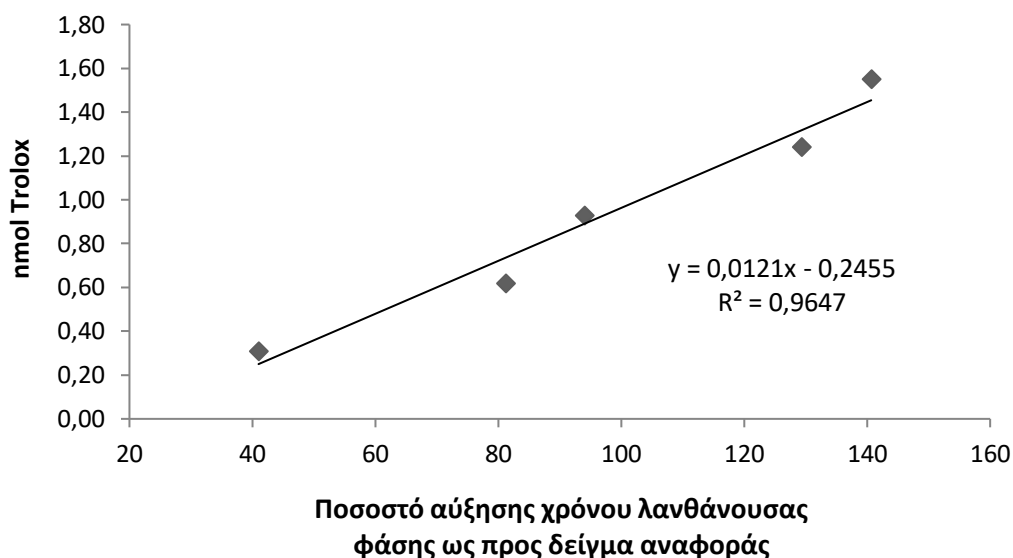
Πλάσμα από αίμα ανθρώπου

Με αποστειρωμένη σύριγγα λαμβάνονται 20 mL αίματος και τοποθετούνται σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL με βιδωτό καπάκι που περιέχει 2 mL αντιπηκτικού διαλύματος κιτρικών. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για 1 min και φυγοκέντρηση στα 1.500g για 20 min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποτελεί το πλάσμα του αίματος και αποθηκεύεται ανά 500 μL σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου τύπου Eppendorf με πώμα του 1,5 mL στους -40 °C.

6.12.2 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 0,31, 0,62, 0,93, 1,24, και 1,55 nmol Trolox (Διάγραμμα 6.7.).

Πρότυπη καμπύλη οξείδωσης πλάσματος Trolox



Διάγραμμα 6.7. Πρότυπη καμπύλη Trolox οξείδωσης πλάσματος.

6.13 Εκτίμηση της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια

Η *in vitro* μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αποτελεί μία προσπάθεια προκειμένου να χαρακτηριστεί η *in vivo* ικανότητα των αιμοπεταλίων να σχηματίζουν πρωτογενές αιμοστατικό θρόμβο.

Αιμοπετάλια σε εναιώρημα πλάσματος απομονώνονται από δείγμα αίματος σε αντιπηκτικό μέσω φυγοκέντρησης σε χαμηλή ταχύτητα παραλαμβάνοντας παρασκεύασμα γνωστό ως Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma, PRP). Πλάσμα Φτωχό σε Αιμοπετάλια (Platelet-Poor Plasma, PPP) παρασκευάζεται με φυγοκέντρηση του κατακείμενου της πρώτης φυγοκέντρησης του αίματος σε υψηλότερη ταχύτητα.

Το συσσωρευματομέτρο τύπου Born γνωστό και ως οπτικό συσσωρευματομέτρο είναι ένα τροποποιημένο φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με θάλαμο θέρμανσης των δειγμάτων στους 37 °C. Κατά τη μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων απαιτείται ανάδευση των δειγμάτων καθώς η επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων είναι αναγκαία προκειμένου να επέλθει η συσσώρευσή τους σε *in vitro* συνθήκες.

Μία δέσμη υπέρυθρου φωτός διέρχεται από τα δείγματα που βρίσκονται στις κυψελίδες μέσα στους θαλάμους υποδοχείς. Η μία κυψελίδα περιέχει PRP και αποτελεί το υπό εξέταση δείγμα και η δεύτερη περιέχει PPP και αποτελεί το δείγμα αναφοράς. Δίοδοι φωτός σιλικόνης ανιχνεύουν το φως που είναι σε θέση να διαπερνάει τα δείγματα: το PRP θεωρείται αυθαίρετα ότι αποδίδει 0% μετάδοση φωτός που αντιστοιχεί σε 0% συσσώρευση ενώ το PPP θεωρείται ότι αποδίδει 100% μετάδοση φωτός που αντιστοιχεί σε 100% συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η διαφορά των αποτελεσμάτων μετάδοσης φωτός μεταφέρεται από τις διόδους φωτός σε συσκευές καταγραφής.

Όταν γίνεται προσθήκη ενός θρομβωτικού παράγοντα στην κυψελίδα που περιέχει PRP, τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στη δράση αυτού του παράγοντα, και οι μεταβολές που προκαλούνται στη διάδοση του φωτός καταγράφονται με την πάροδο του χρόνου από τη συσκευή καταγραφής.

Όταν τα αιμοπετάλια υπόκεινται σε αλλαγή σχήματος σε απόκριση ενός θρομβωτικού παράγοντα, αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος που επιτρέπει λιγότερο φως να περάσει μέσα από το PRP: αυτό καταγράφεται ως λιγότερη μετάδοση φωτός διαμέσου του δείγματος σε σχέση με το PPP. Αν η δόση του παράγοντα θρόμβωσης είναι αρκετά ισχυρή ώστε να προκαλέσει προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους προς συσσώρευση και σχηματισμό συσσωματώματος, περισσότερο φως είναι ικανό να περάσει διαμέσου του δείγματος PRP. Η αλλαγή της μετάδοσης του φωτός καταγράφεται, με την πάροδο του χρόνου, και δείχνει μία τάση προς το Πλάσμα το Φτωχό σε Αιμοπετάλια που αντιστοιχεί σε 100% μετάδοση φωτός ή 100% συσσώρευση.

Η καταγραφή της *in vitro* συσσώρευσης χαρακτηρίζεται από:

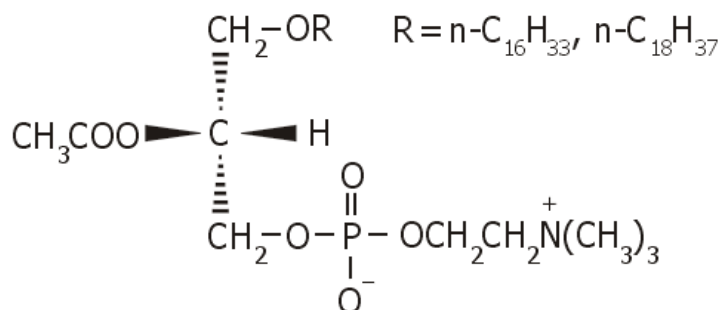
1. Αλλαγή σχήματος.
2. Ένα πρώτο κύμα συσσώρευσης (αρχική συσσώρευση) που μπορεί να είναι αντιστρεπτό και να επιστρέψει προς την αρχική τιμή του PRP.
3. Ένα μη αντιστρεπτό δεύτερο κύμα συσσώρευσης που εμφανίζεται όταν τα εκκρινόμενα περιεχόμενα των κοκκίων των αιμοπεταλίων συνιστούν ερέθισμα που προκαλεί επιπλέον συσσώρευση.

Οι καμπύλες συσσώρευσης χαρακτηρίζονται επίσης από:

1. Το μέγιστο ποσοστό μεταβολής της μετάδοσης του φωτός προκαλούμενο από τον θρομβωτικό παράγοντα (επί τοις εκατό συσσώρευση).
2. Από την καμπύλη συσσώρευσης που προκαλείται από ορισμένη συγκέντρωση συσσωρευτικού παράγοντα.
3. Την κλίση ή το ποσοστό της συσσώρευσης, ως % μεταβολή της συσσώρευσης ανά λεπτό.

Από την γραμμική περιοχή που αντιστοιχεί στο 20 έως 80% της μέγιστης συσσώρευσης παρουσία ή όχι συστατικών από τρόφιμα υπολογίζεται η % αναστολή της θρόμβωσης η οποία ορισμένες φορές εκφράζεται και ως IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%) που αφορά την συγκέντρωση μίας ουσίας τροφίμων που απαιτείται για να προκαλέσει 50% αναστολή της μέγιστης θρόμβωσης.

Για τον χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων ως % συσσώρευση μέσω των καμπυλών συσσώρευσης αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε το μέγιστο ποσοστό μεταβολής της μετάδοσης του φωτός προκαλούμενο από τον θρομβωτικό λιποειδικό παράγοντα “Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων” (Platelet Activating Factor, PAF) (1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) (Σχήμα 6.7.).



Σχήμα 6.7. Δομή του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων.

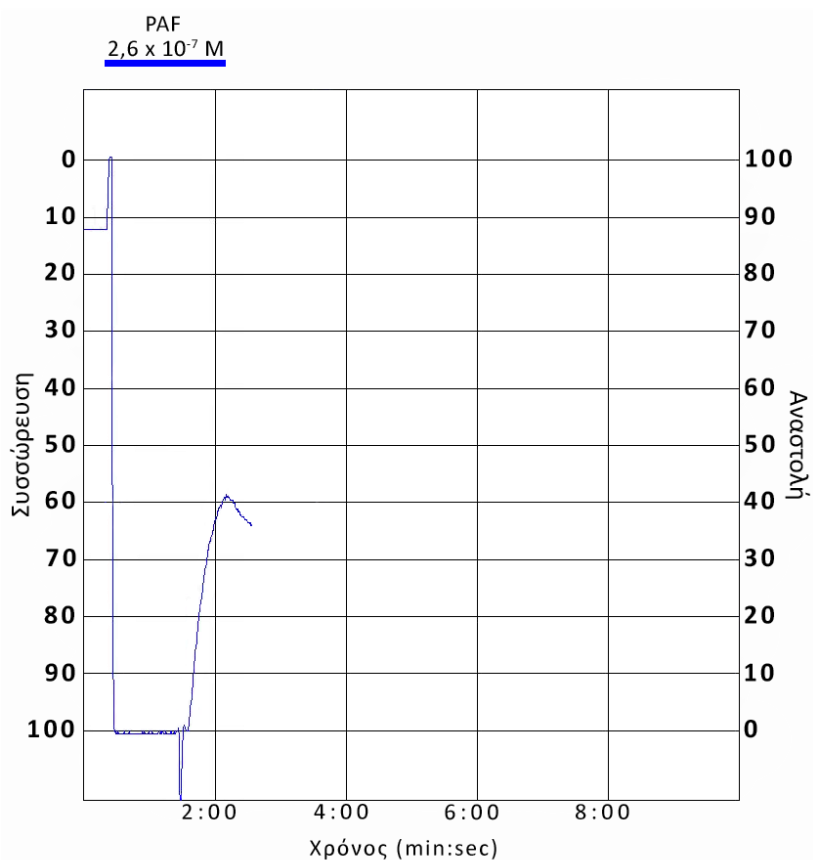
Πειραματική διαδικασία

Σε σωλήνες πολυπροπυλενίου των 50 mL προστίθενται 4 mL αντιπηκτικού διαλύματος κιτρικών (AC). Στην συνέχεια συλλέγεται αίμα ανθρώπου από την μέση βασιλική ή λοξή φλέβα του βραχίονα έως τελικού όγκου 36 mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 220 g (HERMLE Labortechnik GmbH, Z383, Γερμανία). Τα 2/3 του υπερκείμενου που αποτελούν το Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια αναρροφώνται με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 10 mL. Το κατακείμενο φυγοκεντρείται για 20 min στα 1500g (HERMLE Labortechnik GmbH, Z383, Γερμανία). Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρησης αποτελεί το Πλάσμα Φτωχό σε Αιμοπετάλια. Ετοιμάζεται Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια που περιέχει 5,0 x 10⁶ κύτταρα/mL, αραιώνοντας με PPP.

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 200 μL κάθε εκχυλισμάτος. Τα δείγματα εξατμίζονται σε ρεύμα αέριου αζώτου (N₂) και επαναδιαλύονται σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA .

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου (Chrono-log Corporation, 500CA, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής) των 0,5 mL προστίθενται 250 μ L από το PRP και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου, προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Εντοπίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση και η ελάχιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Προστίθενται ποσότητες εκχυλισμάτων τέτοιες ώστε να πετυχαίνεται συσσώρευση μεταξύ 50 και 80% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης αλλά και μεταξύ 20 και 50% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης. Στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προκαλείται συσσώρευση από 20 έως 80% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης υπάρχει γραμμική απόκριση, οπότε υπολογίζεται το IC_{50} με το οποίο εκφράζονται τα αποτελέσματα.

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-7}$ M σε Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια, το διάγραμμα της οποίας παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 6.8.).



Διάγραμμα 6.8. Πρότυπη καμπύλη ελάχιστης μη αντιστρεπτής συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε PRP προκαλούμενη από PAF συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-7}$ M.

6.13.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Διάλυμα φύλαξης βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL

Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1 mL φυσιολογικού ορού (NaCl 0,1%) ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα εργασίας βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL

Από 10 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL διαλύματος φύλαξης BSA.

Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $2,6 \times 10^{-4}$ M, $2,6 \times 10^{-5}$ M, $2,6 \times 10^{-6}$ M και $2,6 \times 10^{-7}$ M σε διάλυμα εργασίας BSA.

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 1 mL από διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M, σε διαλύτη $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$ 1/1 (v/v), τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 384 μL διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min από το διάλυμα αυτό συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-4}$ M, ετοιμάζονται σε πλαστικούς σωλήνες και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις με διάλυμα εργασίας BSA.

6.14 Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των μέσων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διασποράς one-way ANOVA με post-hoc Tukey test ($p < 0,05$). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics for Windows (IBM, version 28.0, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής).

7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε όλα τα δείγματα

Οχτώ διαφορετικά δείγματα, ένα ταχινιού, 4 εμπλουτισμένου ταχινιού, και 3 με τις πρώτες ύλες του εμπλουτισμού αυτούσιες, μελετήθηκαν ως προς το συνολικό φαινολικό τους περιεχόμενο. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

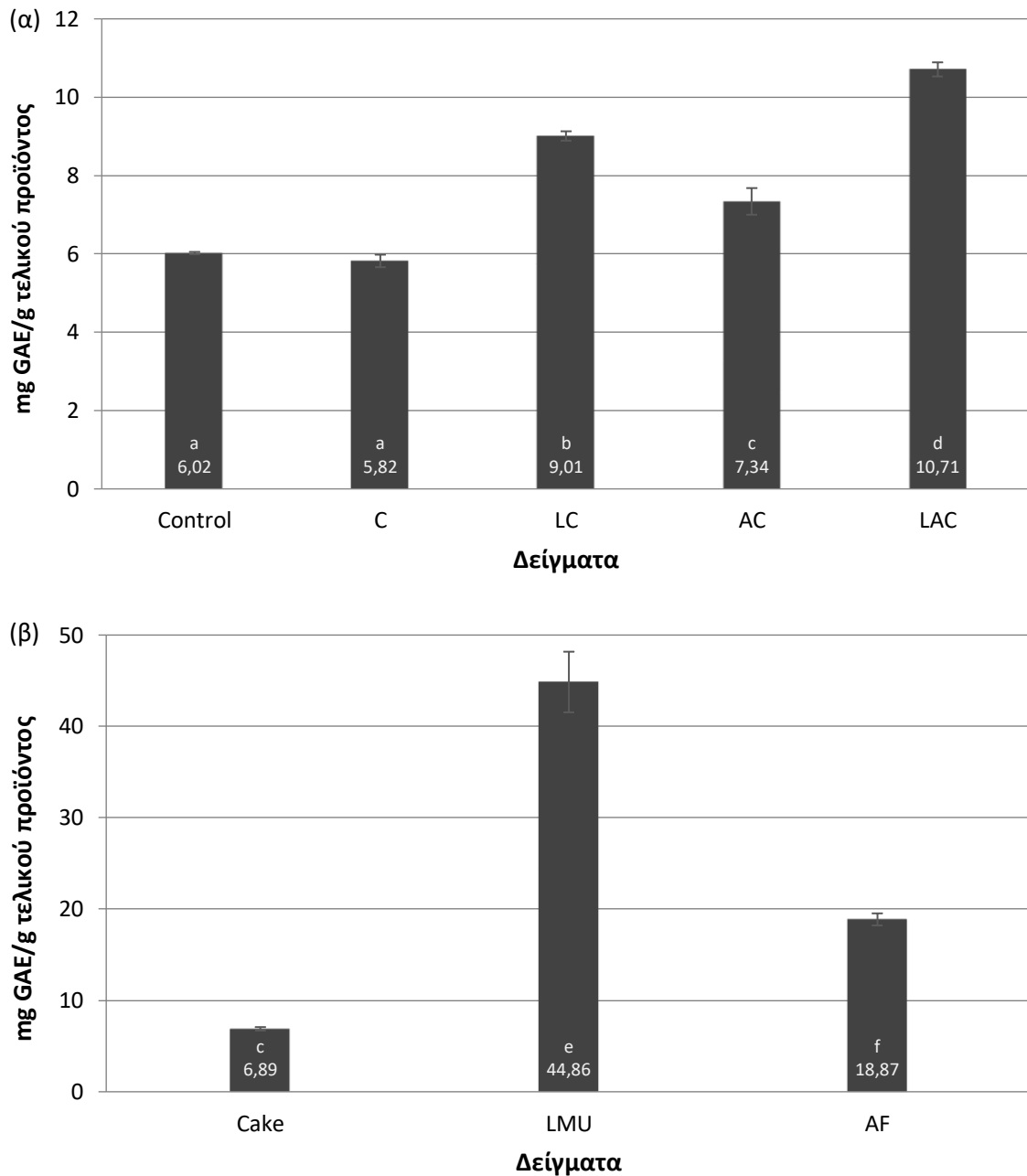
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.1.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές, τα mg γαλλικού οξέος που αντιστοιχούν από τη πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 6.1.) και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE)/g τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.1.).

Πίνακας 7.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας Folin-Ciocalteu.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	Μέση τιμή mg γαλλικού οξέος	mg GAE/g τελικού προϊόντος
Control	30	0,924	5,56	6,02 ± 0,03 ^a
C	30	0,924	5,38	5,82 ± 0,16 ^a
LC	30	0,924	8,32	9,01 ± 0,12 ^b
AC	30	0,924	6,78	7,34 ± 0,34 ^c
LAC	30	0,924	9,89	10,71 ± 0,18 ^d
Cake	30	0,924	6,37	6,89 ± 0,19 ^c
LMU	30	0,151	6,78	44,86 ± 3,32 ^e
AF	30	0,924	17,43	18,87 ± 0,66 ^f

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba, **GAE:** ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^{a, b, c, d}) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα δοκιμασίας Folin-Ciocalteu



Διάγραμμα 7.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας Folin-Ciocalteu, εκφρασμένα σε mg GAE/g τελικού προϊόντος. (α) δείγματα ταχινιού, (β) πρώτες ύλες. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba, **GAE:** ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-f) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (10,71 mg GAE/g τελικού προϊόντος), ακολουθούμενο από το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) (9,01 mg GAE/g τελικού προϊόντος), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) (7,34 mg GAE/g τελικού προϊόντος), το σκέτο ταχίνι (Control) (6,02 mg GAE/g τελικού προϊόντος) και τέλος το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) (5,82 mg GAE/g τελικού προϊόντος) (Πίνακας 7.1.).

Τόσο το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU), όσο και το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών από το δείγμα του ταχινιού, οπότε η σειρά των δειγμάτων εμπλουτισμού του στην περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών ήταν η αναμενόμενη· LAC > LC > AC > C ≈ Control, εφόσον και LMU > AF > Cake ≈ Control. Ανάμεσα στα δείγματα εμπλουτισμού, και τα 3 (LC, AC, LAC) είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με το σκέτο ταχίνι (Control) ($p < 0,001$, $p = 0,002$, $p < 0,001$, αντίστοιχα).

7.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών σε όλα τα δείγματα

Οχτώ διαφορετικά δείγματα, ένα ταχινιού, 4 εμπλουτισμένου ταχινιού, και 3 με τις πρώτες ύλες του εμπλουτισμού αυτούσιες, μελετήθηκαν ως προς το συνολικό τους περιεχόμενο σε φλαβονοειδή. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

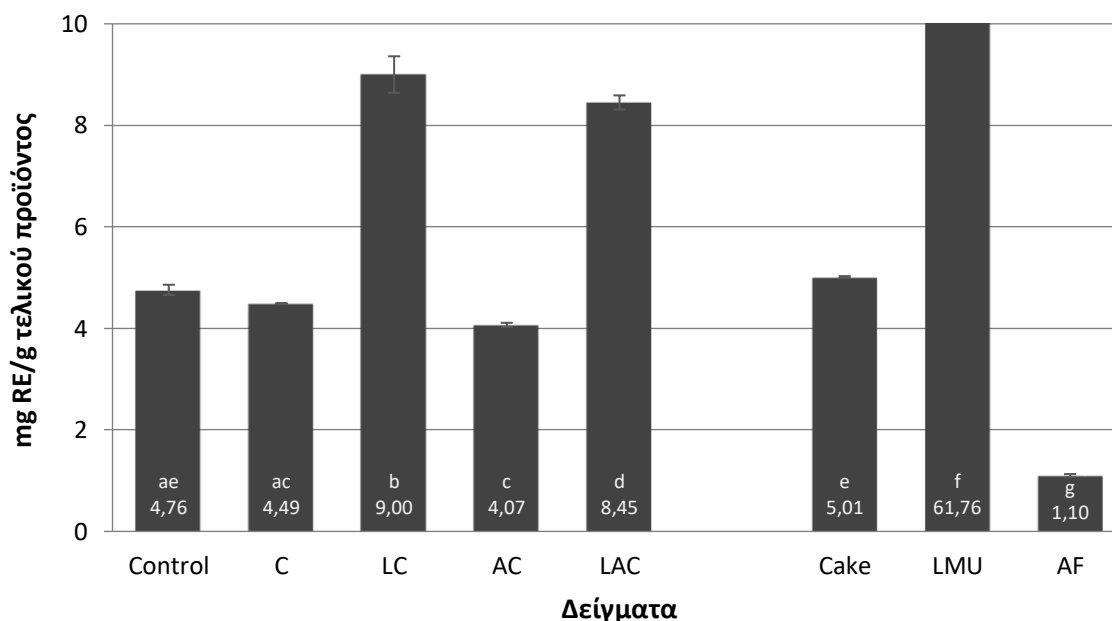
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.2.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές, τα mg ρουτίνης που αντιστοιχούν από τη πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 6.2.) και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως mg ισοδύναμα ρουτίνης (Rutin Equivalents, RE)/g τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.2.).

Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ολικών φλαβονοειδών.

Δείγματα	μl εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	Μέση τιμή μg ρουτίνης	mg RE/g τελικού προϊόντος
Control	250	7,698	36,65	4,76 ± 0,10 ^{ae}
C	250	7,698	34,55	4,49 ± 0,01 ^{ac}
LC	125	3,849	34,62	9,00 ± 0,36 ^b
AC	250	7,698	31,37	4,07 ± 0,04 ^c
LAC	125	3,849	32,52	8,45 ± 0,14 ^d
Cake	250	7,698	38,53	5,01 ± 0,02 ^e
LMU	125	0,629	38,88	61,76 ± 3,74 ^f
AF	250	7,698	8,49	1,10 ± 0,03 ^g

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba, **RE:** ισοδύναμα ρουτίνης. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^{a, b, c, d}) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα δοκιμασίας Ολικά Φλαβονοειδή



Διάγραμμα 7.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ολικών φλαβονοειδών, εκφρασμένα σε mg RE/g τελικού προϊόντος. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba, **RE:** ισοδύναμα ρουτίνης. Το LMU είναι εκτός διαγράμματος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-g) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) μαζί με το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) παρουσίασαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών (9,00 mg RE/g τελικού προϊόντος και 8,45 mg RE/g τελικού προϊόντος, αντίστοιχα), ακολουθούμενα από το σκέτο ταχίνι (Control) (4,76 mg RE/g τελικού προϊόντος), το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) (4,49 mg RE/g τελικού προϊόντος) και τέλος το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) (4,07 mg RE/g τελικού προϊόντος) (Πίνακας 7.2.).

Το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχε την μικρότερη περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή από τις πρώτες ύλες εμπλουτισμού, αλλά και σε σχέση με το δείγμα του ταχινιού (Control), με μόλις 1,10 mg RE/g τελικού προϊόντος, οπότε και η μείωση των ολικών φλαβονοειδών του AC σε σχέση με το Control ($p = 0,001$) και η ίση περίπου συγκέντρωση των δειγμάτων LC και LAC ήταν αναμενόμενα. Ωστόσο δημιουργείται στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αυτά τα δείγματα ($p = 0,009$). Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU) είχε περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή 61,76 mg RE/g τελικού προϊόντος, με αποτέλεσμα σχεδόν να διπλασιάσει αυτές των δειγμάτων εμπλουτισμού LC και LAC σε σχέση με του δείγματος του ταχινιού (Control) ($p < 0,001$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα).

7.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας ABTS

Η ποσότητα του ριζικού κατιόντος ABTS^{•+} που καταναλώνεται λόγω της αντίδρασης με τις φαινολικές ουσίες του δείγματος, εκφράζεται σε mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS^{•+} (Scavenging Amount 50%, SA₅₀) και εκφράζει την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Ο υπολογισμός έγινε με δοκιμή δύο διαφορετικών ποσοτήτων προκαλώντας απόσβεση του ABTS^{•+} υψηλότερη και χαμηλότερη από αυτή που αντιστοιχεί στο 50%. Η λύση της ευθείας των δυο αυτών σημείων για 50% δίνει το SA₅₀.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.3.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που όταν εκχυλιστούν αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως % απόσβεση του ABTS^{•+} που επιτυγχάνει το κάθε δείγμα. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS.

Δείγματα	μL εκχύλισματος	mg τελικού προϊόντος	% απόσβεση του ABTS**
Control	15,0	0,462	45,77 ± 1,37
	20,0	0,616	57,95 ± 1,36
C	15,0	0,462	43,62 ± 2,31
	20,0	0,616	56,70 ± 0,33
LC	7,5	0,231	44,68 ± 1,63
	15,0	0,462	68,20 ± 1,93
AC	10,0	0,308	38,83 ± 0,66
	15,0	0,462	53,18 ± 1,30
LAC	7,5	0,231	47,16 ± 0,50
	15,0	0,462	73,08 ± 2,44
Cake	15,0	0,462	51,46 ± 2,18
	20,0	0,616	61,21 ± 1,63
LMU	2	0,010	16,86 ± 0,86
	5	0,025	32,95 ± 0,43
AF	7,5	0,231	38,96 ± 2,15
	15	0,462	60,74 ± 3,16

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3).

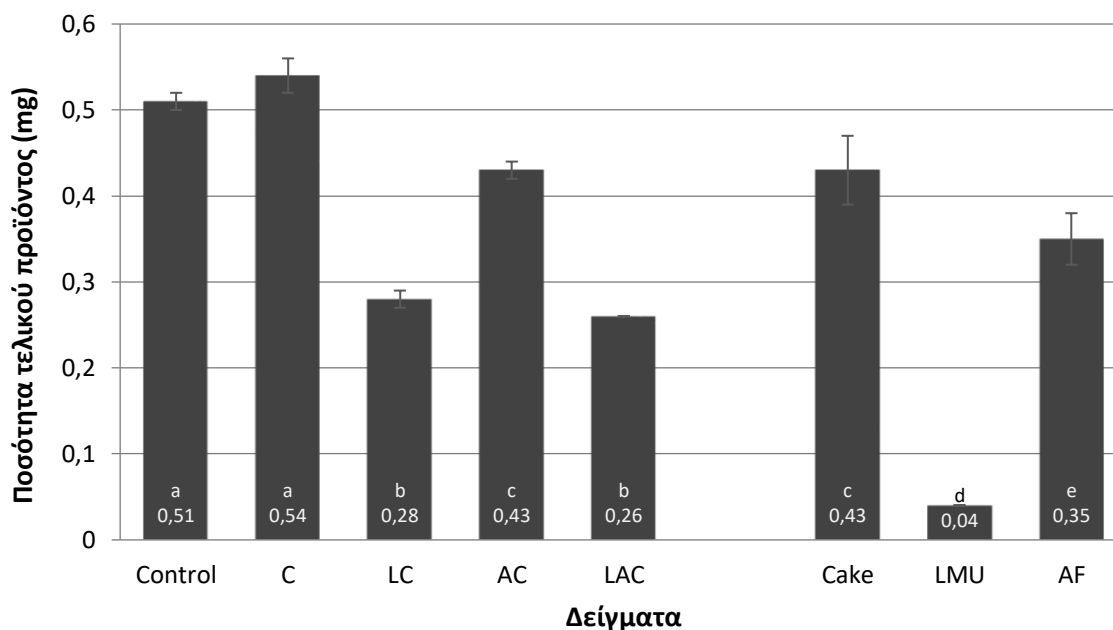
Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7.3. υπολογίστηκαν τα mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS** (SA_{50}) για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.4.) και παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις (Διάγραμμα 7.3.).

Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS** (SA_{50}).

Δείγματα	mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS** (SA_{50})
Control	0,51 ± 0,01 ^a
C	0,54 ± 0,02 ^a
LC	0,28 ± 0,01 ^b
AC	0,43 ± 0,01 ^c
LAC	0,26 ± 0,00 ^b
Cake	0,43 ± 0,04 ^c
LMU	0,04 ± 0,00 ^d
AF	0,35 ± 0,03 ^e

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^a, ^b, ^c, ^d) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης Μέθοδος ABTS



Διάγραμμα 7.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS^{•+} (SA₅₀). **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-e) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Όλα τα δείγματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση μέσω της δοκιμασίας απόσβεσης του ριζικού κατιόντος του ABTS^{•+}.

Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) απαιτώντας μόλις 0,26 mg για να επιτευχθεί απόσβεση κατά 50% της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}. Το LAC ακολούθησαν το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) με 0,28 mg, το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) με 0,43 mg, και τέλος το σκέτο ταχίνι (Control) και το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) με 0,51 mg και 0,54 mg, αντίστοιχα (Πίνακας 7.4.).

Τα δείγματα LAC και LC είχαν ίδιου μεγέθους αποτελέσματα ($p > 0,05$) παρότι το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχε μικρότερη απαίτηση για απόσβεση 50% της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} από το δείγμα του ταχινιού (Control) ($p < 0,001$), πιθανώς λόγω του πολύ ισχυρού συμπυκνωμένου εκχυλίσματος στέμφυλων (LMU) με απαίτηση μόλις 0,04 mg για απόσβεση 50%

της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}. Ωστόσο, ανάμεσα στα δείγματα εμπλουτισμού, και τα 3 (LC, AC, LAC) είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το σκέτο ταχίνι (Control) ($p < 0,001$, $p = 0,002$, $p < 0,001$, αντίστοιχα).

7.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας DPPH

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων της ικανότητας απόσβεσης της ρίζας του DPPH από τα εκχυλίσματα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox για τη δοκιμασία DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσότητες mg τελικού προϊόντος που απαιτούνται για 50% απόσβεση της ρίζας του DPPH (Effective Concentration 50%, EC₅₀) και ως ισοδύναμα μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.5.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που όταν εκχυλιστούν αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως % απόσβεση DPPH που επιτυγχάνει το κάθε δείγμα. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7.5. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	% απόσβεση DPPH
Control	30	0,924	34,66 ± 1,12
	40	1,232	48,32 ± 0,64
C	30	0,924	33,79 ± 0,10
	40	1,232	46,00 ± 0,59
LC	15	0,462	31,43 ± 0,77
	30	0,924	62,00 ± 2,09
AC	20	0,616	21,68 ± 0,50
	30	0,924	34,60 ± 0,53
LAC	15	0,462	30,20 ± 2,44
	30	0,924	60,45 ± 5,68
Cake	30	0,924	38,46 ± 0,87
	40	1,232	48,50 ± 1,08
LMU	6	0,030	18,83 ± 1,50
	12	0,060	35,92 ± 2,11
AF	30	0,924	35,18 ± 1,57
	40	1,232	43,84 ± 2,75

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3).

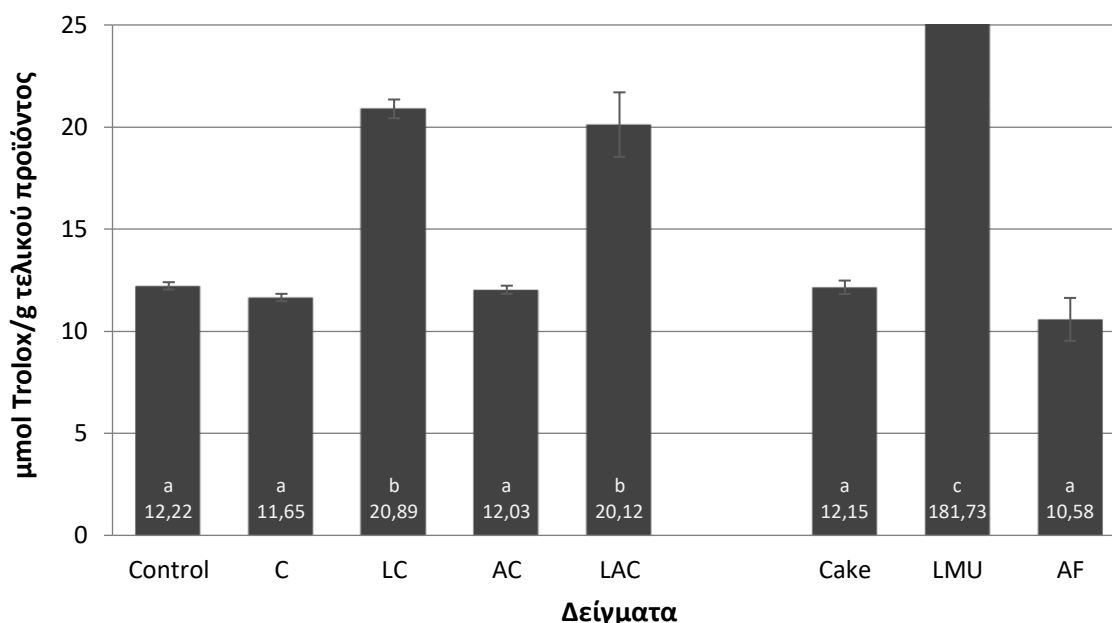
Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7.5. και της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox για τη δοκιμασία DPPH (Διάγραμμα 6.3.) υπολογίστηκε η ποσότητα nmol Trolox που απαιτείται για 50% απόσβεση της ρίζας του DPPH (EC₅₀), τα mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση της ρίζας του DPPH (EC₅₀) για κάθε δείγμα, άρα και τα ισοδύναμα μmol Trolox/g τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.6.) και παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις (Διάγραμμα 7.4.).

Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH, εκφρασμένα σε EC₅₀ και μmol Trolox/g τελικού προϊόντος.

Δείγματα	nmol Trolox για 50% απόσβεση του DPPH	mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του DPPH (EC ₅₀)	μmol Trolox/g τελικού προϊόντος
Control	15,53	1,27 ± 0,02	12,22 ± 0,18 ^a
C	15,53	1,33 ± 0,02	11,65 ± 0,18 ^a
LC	15,53	0,74 ± 0,02	20,89 ± 0,46 ^b
AC	15,53	1,29 ± 0,02	12,03 ± 0,20 ^a
LAC	15,53	0,77 ± 0,06	20,12 ± 1,58 ^b
Cake	15,53	1,28 ± 0,03	12,15 ± 0,33 ^a
LMU	15,53	0,09 ± 0,01	181,73 ± 10,08 ^c
AF	15,53	1,47 ± 0,15	10,58 ± 1,05 ^a

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^a, ^b, ^c, ^d) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH



Διάγραμμα 7.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH, εκφρασμένα ως ισοδύναμα μmol Trolox/g τελικού προϊόντος. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Το LMU είναι εκτός διαγράμματος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-c) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Όλα τα δείγματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση μέσω της δοκιμασίας απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH.

Συγκεκριμένα και εδώ όπως στην δοκιμασία ABTS (Υποκεφάλαιο 7.3.) τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) και το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) απαιτώντας μόλις 0,77 mg και 0,74 mg, αντίστοιχα, για την επίτευξη 50% απόσβεσης της ρίζας του DPPH. Ακολούθησαν το σκέτο ταχίνι (Control) (1,27 mg), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) (1,29 mg) και το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) (1,33 mg) (Πίνακας 7.6.).

Σύμφωνα με την δοκιμασία DPPH, το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) απαιτούσε μεγαλύτερη ποσότητα την επίτευξη του EC_{50} (1,47 mg) σε σχέση με το δείγμα του ταχινιού (Control), όχι όμως στατιστικώς σημαντική ($p > 0,05$), ενώ και το cake σησαμιού (Cake) ήταν στα

ίδια επίπεδα με 1,28 mg ($p > 0,05$), όποτε και τα παρόμοια αποτελέσματα των δειγμάτων Control, AC και C ήταν αναμενόμενα. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU) έδειξε και εδώ πολύ μεγάλη δραστικότητα με απαίτηση μόλις 0,09 mg για την επίτευξη 50% απόσβεσης της ρίζας του DPPH, δημιουργώντας στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα LC και LAC με το σκέτο ταχίνι (Control) ($p < 0,001$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα), ενώ δεν είχαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

7.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας CUPRAC

Η εκτίμηση της αναγωγικής δύναμης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Trolox/g τελικού προϊόντος. Ο υπολογισμός έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη Trolox για τη δοκιμασία CUPRAC (Διάγραμμα 6.4.), στην οποία συσχετίστηκε η μετρούμενη απορρόφηση με τη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος Trolox.

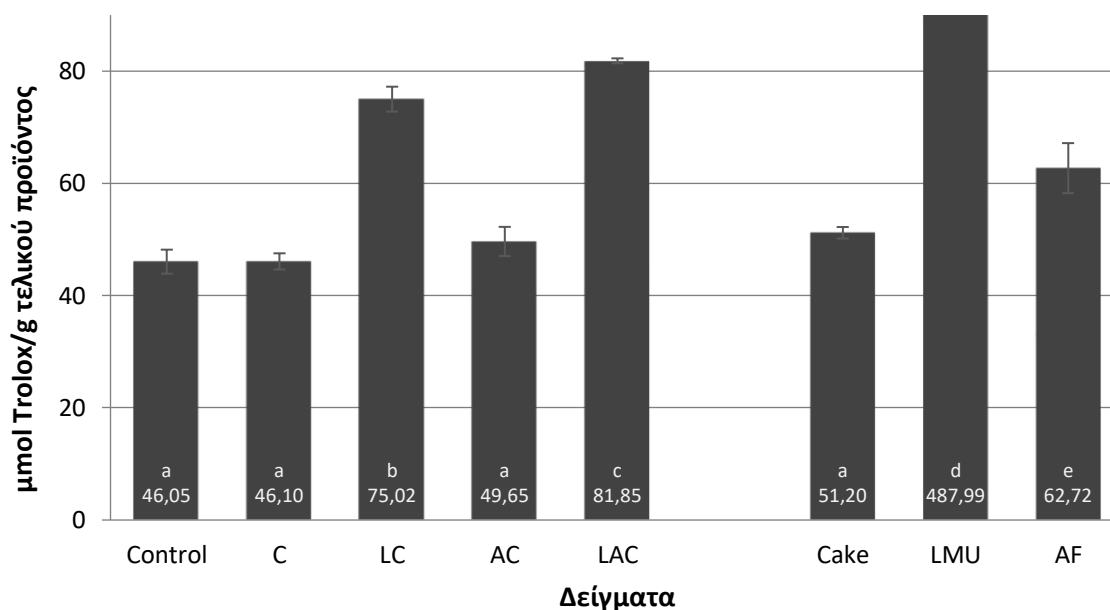
Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.7.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές, τα nmol Trolox που αντιστοιχούν από τη πρότυπη καμπύλη και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως μmol Trolox/g τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.5.).

Πίνακας 7.7. Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	Μέση τιμή nmol Trolox	μmol Trolox/g τελικού προϊόντος
Control	25	0,770	35,45	46,05 ± 2,14 ^a
C	25	0,770	35,49	46,10 ± 1,44 ^a
LC	25	0,770	57,75	75,02 ± 2,22 ^b
AC	25	0,770	38,22	49,65 ± 2,60 ^a
LAC	25	0,770	63,01	81,85 ± 0,44 ^c
Cake	25	0,770	39,42	51,20 ± 1,03 ^a
LMU	25	0,126	61,43	487,99 ± 5,04 ^d
AF	25	0,770	48,29	62,72 ± 4,46 ^e

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^{a, b, c, d}) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC



Διάγραμμα 7.5. Αποτελέσματα δοκιμασίας CUPRAC, εκφρασμένα σε $\mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Το LMU είναι εκτός διαγράμματος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-e) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Βάσει των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι το ταχίνι και οι πρώτες ύλες του εμπλουτισμού του παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση μέσω αναγωγής των ιόντων του χαλκού από αντιοξειδωτικά, με το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ($81,85 \mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος).

Η σειρά των δειγμάτων με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα μετά το LAC είναι: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) ($75,02 \mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος) > μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) ($49,65 \mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος) > μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) ($46,10 \mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος) > σκέτο ταχίνι (Control) ($46,05 \mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος) (Πίνακας 7.7.).

Τόσο το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU), όσο και το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το δείγμα του ταχινιού, οπότε η

σειρά των δειγμάτων εμπλουτισμού του στην αντιοξειδωτική δράση μέσω αναγωγής των ιόντων του χαλκού από αντιοξειδωτικά ήταν η αναμενόμενη· LAC > LC > AC ≈ C ≈ Control, εφόσον και LMU > AF > Cake ≈ Control. Ανάμεσα στα δείγματα εμπλουτισμού, μόνο τα LC και LAC είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το σκέτο ταχίνι (Control) ($p < 0,001$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα), ενώ παράλληλα είχαν και μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,041$).

7.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας FRAP

Η εκτίμηση της αναγωγικής δύναμης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Trolox/g τελικού προϊόντος. Ο υπολογισμός έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη Trolox για τη δοκιμασία FRAP (Διάγραμμα 6.5.), στην οποία συσχετίστηκε η μετρούμενη απορρόφηση με τη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος Trolox.

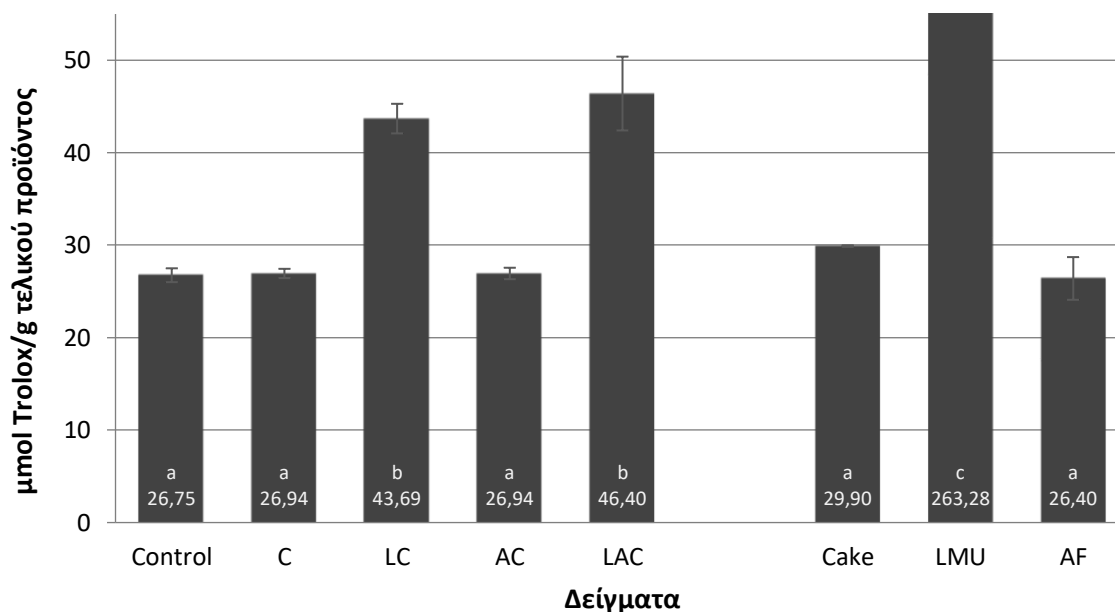
Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.8.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές, τα nmol Trolox που αντιστοιχούν από τη πρότυπη καμπύλη και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως μmol Trolox/g τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.6.).

Πίνακας 7.8. Αποτελέσματα δοκιμασίας FRAP.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	Μέση τιμή nmol Trolox	μmol Trolox/g τελικού προϊόντος
Control	15	0,462	12,36	26,75 ± 0,75 ^a
C	15	0,462	12,44	26,94 ± 0,50 ^a
LC	10	0,308	13,45	43,69 ± 1,60 ^b
AC	15	0,462	12,44	26,94 ± 0,62 ^a
LAC	10	0,308	14,29	46,40 ± 3,99 ^b
Cake	15	0,462	13,81	29,90 ± 0,08 ^a
LMU	10	0,050	13,26	263,28 ± 7,98 ^c
AF	15	0,462	12,19	26,40 ± 2,34 ^a

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^{a, b, c, d}) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα δοκιμασίας FRAP



Διάγραμμα 7.6. Αποτελέσματα δοκιμασίας FRAP, εκφρασμένα σε μmol Trolox/g τελικού προϊόντος. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Το LMU είναι εκτός διαγράμματος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-c) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Βάσει των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι το ταχίνι και οι πρώτες ύλες του εμπλουτισμού του παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση μέσω αναγωγής των ιόντων του σιδήρου από τρισθενή σε δισθενή, με το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (46,40 μmol Trolox/g τελικού προϊόντος).

Η σειρά των δειγμάτων με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα μετά το LAC είναι: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) (43,69 μmol Trolox/g τελικού προϊόντος) > μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) (26,94 μmol Trolox/g τελικού προϊόντος) = μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) (26,94 μmol Trolox/g τελικού προϊόντος) > σκέτο ταχίνι (Control) (26,75 μmol Trolox/g τελικού προϊόντος) (Πίνακας 7.8.).

Σύμφωνα με την δοκιμασία FRAP, το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) και το cake σησαμιού (Cake) είχαν περίπου ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα (26,40 και 29,90 μmol Trolox/g

τελικού προϊόντος, αντίστοιχα) σε σχέση με το δείγμα του ταχινιού (Control) ($p > 0,05$), όποτε και τα παρόμοια αποτελέσματα των δειγμάτων Control, AC και C ήταν αναμενόμενα ($p > 0,05$). Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU) έδειξε και εδώ πολύ μεγάλη δραστικότητα με 263,28 $\mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος, οπότε και τα δείγματα LC και LAC δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p > 0,05$), ενώ είχαν σε σχέση με το ταχίνι (Control) ($p < 0,001$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα).

7.7 Προσδιορισμός αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας αναστολής οξειδωσης του πλάσματος

Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την αντιαθηρογόνο δράση των εκχυλισμάτων σε *in vitro* επίπεδο και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Trolox/g τελικού προϊόντος. Ο υπολογισμός έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη Trolox για τη οξείδωση του πλάσματος (Διάγραμμα 6.7.), στην οποία συσχετίστηκε η % αύξηση ως προς τον χρόνο της λανθάνουσας φάσης του δείγματος αναφοράς με τη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος Trolox.

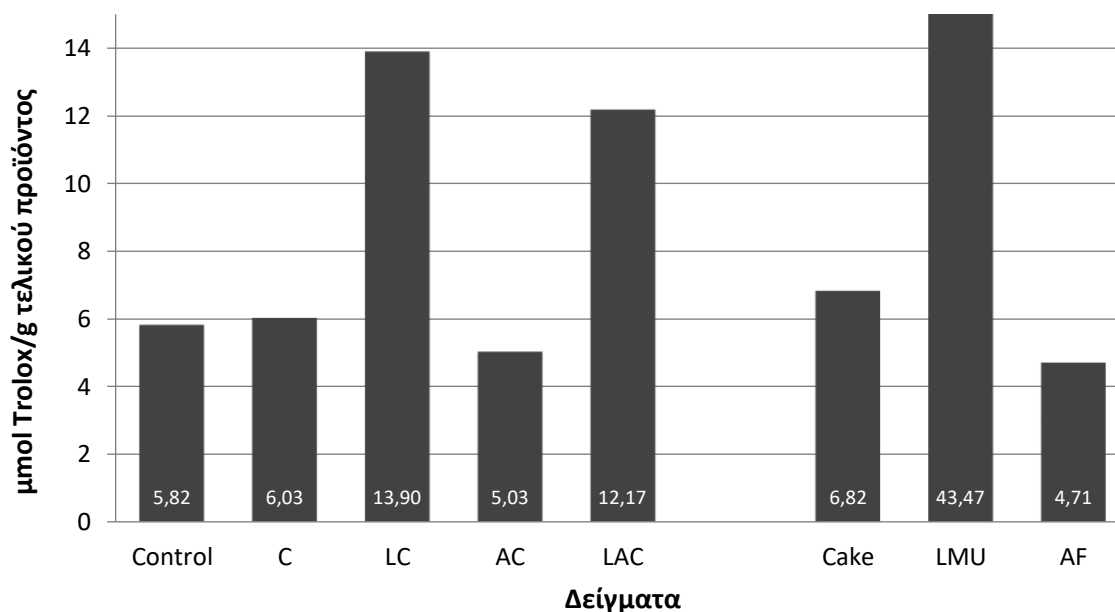
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.9.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές, ο χρόνος λανθάνουσας φάσης (min) κάθε δείγματος, η % αύξηση ως προς τον χρόνο της λανθάνουσας φάσης του δείγματος αναφοράς, τα nmol Trolox που αντιστοιχούν από τη πρότυπη καμπύλη και τα αποτελέσματα εκφρασμένα ως $\mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.7.).

Πίνακας 7.9. Αποτελέσματα δοκιμασίας οξειδωσης πλάσματος.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	Χρόνος λαν. φάσης (min)	Ποσοστό αύξησης χρόνου λαν. φάσης (%)	nmol Trolox	μmol Trolox/g τελικού προϊόντος
Control	4	0,123	94,7	79,5	0,717	5,82
C	4	0,123	95,9	81,7	0,743	6,03
LC	2	0,062	100,8	91,1	0,856	13,90
AC	4	0,123	90,5	71,5	0,620	5,03
LAC	2	0,062	96,2	82,2	0,750	12,17
Cake	4	0,123	100,1	89,7	0,840	6,82
LMU	4	0,020	101,4	92,1	0,869	43,47
AF	6	0,185	101,4	92,2	0,871	4,71

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba.

Αποτελέσματα δοκιμασίας οξείδωσης πλάσματος



Διάγραμμα 7.7. Αποτελέσματα δοκιμασίας οξείδωσης πλάσματος, εκφρασμένα σε μολ Trolox/g τελικού προϊόντος. **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba. Το LMU είναι εκτός διαγράμματος.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος αποτελεί ένα από τα βασικά στάδια της έναρξης της αθηροσκλήρωσης (Demopoulos et al., 2003). Όσο περισσότερα ισοδύναμα Trolox/g τελικού προϊόντος αντιστοιχούν σε ένα δείγμα τόσο πιο αυξημένη προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος (αντιαθηρογόνο δράση) παρουσιάζει.

Το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) είχε τα καλύτερα αποτελέσματα με 13,90 μολ Trolox/g τελικού προϊόντος. Ακολούθησαν το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) με 12,17 μολ Trolox/g τελικού προϊόντος, και με μεγάλη διαφορά το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) με 6,03 μολ Trolox/g τελικού προϊόντος, το σκέτο ταχίνι (Control) με 5,82 μολ Trolox/g τελικού προϊόντος και τέλος το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) με 5,03 μολ Trolox/g τελικού προϊόντος (Πίνακας 7.9.).

Το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχε την μικρότερη δραστηριότητα από τις πρώτες ύλες εμπλουτισμού, αλλά και σε σχέση με το δείγμα του ταχινιού (Control), με 4,71 μολ Trolox/g

τελικού προϊόντος, οπότε και οι διαφορές των δειγμάτων AC < Control και LAC < LC ήταν αναμενόμενες. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LMU) είχε την μεγαλύτερη δραστικότητα (43,47 $\mu\text{mol Trolox/g}$ τελικού προϊόντος), με αποτέλεσμα να υπερδιπλασιάσει αυτές των δειγμάτων εμπλουτισμού LC και LAC σε σχέση με του δείγματος του ταχινιού (Control).

7.8 Προσδιορισμός της αντιθρομβωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια

Τα δείγματα εξετάστηκαν για την αναστολή του PAF έναντι Πλάσματος Πλούσιου σε Αιμοπετάλια (PRP). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.10.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές και η % αναστολή του PAF την οποία προκάλεσαν σε PRP. Ο υπολογισμός έγινε με δοκιμή δύο διαφορετικών ποσοτήτων προκαλώντας αναστολή του PAF σε επίπεδα υψηλότερα και χαμηλότερα του 50%.

Πίνακας 7.10. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	% αναστολή του PAF
Control	5,0	0,154	36,6
	10,0	0,308	48,8
C	10,0	0,308	43,9
	15,0	0,462	51,2
LC	15,0	0,462	51,2
	20,0	0,616	63,4
AC	5,0	0,154	41,5
	15,0	0,462	53,7
LAC	5,0	0,154	47,2
	7,5	0,231	53,7
Cake	5,0	0,154	41,5
	15,0	0,462	53,7
LMU		-	
AF	0,2	0,006	29,3
	0,5	0,015	51,2

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba.

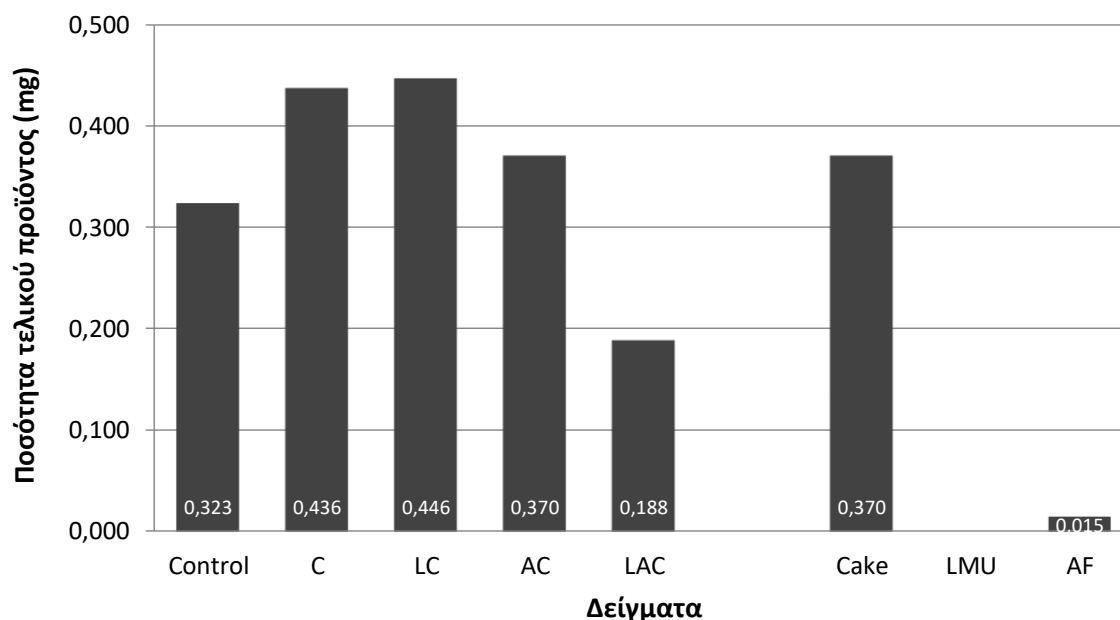
Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 7.10., η λύση της ευθείας των δυο ποσοτήτων κάθε δείγματος για 50% δίνει τα mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή του PAF σε PRP (IC₅₀). Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.11.), και παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος (Διάγραμμα 7.8.).

Πίνακας 7.11. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή (IC₅₀).

Δείγματα	mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή του PAF σε PRP (IC ₅₀)
Control	0,323
C	0,436
LC	0,446
AC	0,370
LAC	0,188
Cake	0,370
LMU	-
AF	0,015

Control: ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba.

Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής PAF σε PRP



Διάγραμμα 7.8. Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής του PAF σε PRP, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή (IC₅₀). **Control:** ταχίνι, **C:** μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού, **LC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **LAC:** μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba, **Cake:** cake σησαμιού, **LMU:** συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων, **AF:** λυοφιλοποιημένο aquafaba.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων λόγω των βιοχημικών του δράσεων έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας ως ένα μόριο που εμπλέκεται σε όλες τις θεμελιώδεις καταστάσεις της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης, η αναστολή του οποίου θα μπορούσε να είναι ένας τρόπος αντιμετώπισης της ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης και κατ' επέκταση πρόληψης των καρδιοαγγειακών παθήσεων (Demopoulos et al., 2003).

Τα αποτελέσματα της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια ήταν θετικά από όλα τα δείγματα εκτός του συμπυκνωμένου εκχύλισματος στέμφυλων (LMU).

Μικρότερη απαιτούμενη ποσότητα mg τελικού προϊόντος για επίτευξη του IC_{50} , άρα και μεγαλύτερη πιθανή αντιθρομβωτική ικανότητα παρουσιάζει το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) με απαίτηση μόλις 0,188 mg τελικού προϊόντος. Ακολουθείται από το σκέτο ταχίνι (Control) με απαίτηση 0,323 mg τελικού προϊόντος, το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) με 0,370 mg τελικού προϊόντος, το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) με 0,436 mg τελικού προϊόντος και τέλος το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) με απαίτηση 0,446 mg τελικού προϊόντος (Πίνακας 7.11.).

Το λυοφιλοποιημένο aquafaba (AF) είχε την μεγαλύτερη δραστικότητα από τις πρώτες ύλες εμπλουτισμού, αλλά και σε σχέση με το δείγμα του ταχινιού (Control), με μόλις 0,015 mg τελικού προϊόντος για 50% αναστολή του PAF σε PRP, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την εικόνα που παρουσιάζει το AC, το οποίο είναι λιγότερο δραστικό από το Control. Το LC συμφωνεί με την μη εμφάνιση αποτελεσμάτων του LMU, ενώ το LAC φαίνεται να συμβαδίζει με τα αποτελέσματα του AF, σε αντίθεση με το AC.

8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το σησάμι περιέχει μία πληθώρα φαινολικών συστατικών, που παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Όλες οι μελέτες με σησαμέλαιο έχουν αναφέρει μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση των επιπέδων της βιταμίνης E. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για το ταχίни, το οποίο αποτελεί προϊόν κατεργασίας του σησαμιού.

Μία εναλλακτική αξιοποίηση των υποπροϊόντων των τροφίμων είναι η ενσωμάτωσή τους σε άλλα τρόφιμα, καθιστώντας τα έτσι λειτουργικά συστατικά και πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Τα στέμφυλα από κόκκινα σταφύλια αποτελούν μια φθηνή πηγή πολύτιμων φαινολικών ενώσεων. Από την άλλη, το νερό βρασμού των ρεβιθιών ή το aquafaba που παράγεται σε οικιακό επίπεδο ή προέρχεται από κονσέρβες ρεβιθιών συνήθως απορρίπτεται. Ωστόσο, είναι πολύτιμο όχι μόνο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ενώσεις που προάγουν την υγεία, όπως οι πολυφαινόλες, αλλά και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες.

Λόγω των παραπάνω μελετήθηκε *in vitro* εμπλουτισμένο ταχίни με εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό και aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά και η εκτιμήθηκε επίδρασή τους στην βιοδραστικότητα του. Οι μηχανισμοί οξείδωσης και θρόμβωσης εμπλέκονται άμεσα με την ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων και η μελέτη ουσιών-τροφίμων με πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση είναι σε θέση να αναδείξει την ικανότητα τροφίμων να προλαμβάνουν χρόνια νοσήματα τα οποία έχουν ως κύριους αιτιολογικούς μηχανισμούς την οξείδωση, τη φλεγμονή και τη θρόμβωση αλλά και να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων τροφίμων ή στην εξέλιξη παραδοσιακών τροφίμων με προληπτική δράση έναντι στην ανάπτυξη τέτοιων χρόνιων ασθενειών.

Από την δοκιμασία για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών των δειγμάτων μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Αμέσως μετά ακολουθεί το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC), έπειτα το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC), στην συνέχεια το σκέτο ταχίни (Control) και τέλος το μείγμα ταχίни και cake σησαμιού (C). Ενώ από τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών των δειγμάτων, το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) μαζί με το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) παρουσίασαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ακολουθούμενα από το σκέτο ταχίни (Control), το μείγμα ταχίни και cake σησαμιού (C) και τέλος το μείγμα ταχίни, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC). Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι, αν και η ποσότητα των

φαινολικών συστατικών φαίνεται να έχει σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητά του δείγματος, ο συσχετισμός δεν είναι απόλυτος. Δηλαδή, ένα δείγμα μεγάλης περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά δεν είναι απαραίτητο να παρουσιάζει και αντιστοίχως μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς οι μηχανισμοί είναι πολύπλοκοι, αποτελεί όμως μία ένδειξη πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης.

Όσον αφορά τις δοκιμασίες μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω απόσβεσης του ριζικού κατιόντος του ABTS^{•+}, έχοντας υπόψη την αντίστροφη σχέση των μεγεθών του SA₅₀, και της δραστηριότητας, την υψηλότερη δραστηριότητα παρουσιάζει το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC), όπως ήταν αναμενόμενο καθώς έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τόσο σε ολικά φαινολικά, όσο σε ολικά φλαβονοειδή. Το LAC ακολουθείται από το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC), και τέλος το σκέτο ταχίνι (Control) και το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C).

Ομοίως, και στις δοκιμασίες μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράση μέσω της δοκιμασίας απόσβεσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH, τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC) και το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC), με το σκέτο ταχίνι (Control), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) και το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) να ακολουθούν.

Στην δοκιμασία μέτρησης της αναγωγικής δύναμης των εκχυλισμάτων μέσω αναγωγής των ιόντων του χαλκού από αντιοξειδωτικά (δοκιμασία CUPRAC) καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC), παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η σειρά των δειγμάτων με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα βάσει CUPRAC μετά το LAC είναι: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) > μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) > μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) > σκέτο ταχίνι (Control).

Ομοίως, και στην δοκιμασία μέτρησης της αναγωγικής δύναμης των εκχυλισμάτων μέσω αναγωγής των ιόντων του σιδήρου από τριθενή σε διθενή (δοκιμασία FRAP) καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC), παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η σειρά των δειγμάτων με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα βάσει FRAP μετά το LAC είναι: μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC) > μείγμα ταχίνι,

cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC) = μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) > σκέτο ταχίνι (Control).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την *in vitro* δοκιμασία για την οξειδωση του πλάσματος με ιόντα Cu^{2+} παρουσιάζουν με μεγαλύτερη ανασταλτική δράση και κατ' επέκταση και μεγαλύτερη προστατευτική δράση έναντι της οξειδωσης (αντιαθρογόνας δράση), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC). Ακολούθησαν το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC), και με μεγάλη διαφορά το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C), το σκέτο ταχίνι (Control) και τέλος το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC).

Τέλος, όσον αφορά την αξιολόγηση της αντιθρομβωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια, όλα τα δείγματα παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα εκτός του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος στέμφυλων (LMU). Μικρότερη απαιτούμενη ποσότητα mg τελικού προϊόντος για επίτευξη του IC_{50} , άρα και μεγαλύτερη πιθανή αντιθρομβωτική ικανότητα παρουσιάζει το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού, συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων και λυοφιλοποιημένο aquafaba (LAC). Ακολουθείται από το σκέτο ταχίνι (Control), το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και λυοφιλοποιημένο aquafaba (AC), το μείγμα ταχίνι και cake σησαμιού (C) και τέλος το μείγμα ταχίνι, cake σησαμιού και συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων (LC).

Βάσει των παραπάνω δεδομένων συμπεραίνεται ότι τόσο το εκχύλισμα κόκκινων στέμφυλων ποικιλίας Λημιό και όσο και το aquafaba από ρεβίθια Λήμνου ποικιλίας Παναγιά αύξησαν την βιοδραστικότητα του ταχινιού. Κρίνεται, ωστόσο, απαραίτητη η περεταίρω διερεύνηση των ποσοστών εμπλουτισμού, και η παράλληλη μελέτη των μη πολικών μορίων, καθώς αυτά μπορεί να δρουν συνεργιστικά, παρουσιάζοντας μία εντελώς διαφορετική εικόνα αποτελεσμάτων. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι, παρουσιάζεται διαφορά στη κατάταξη των πρώτων υλών του εμπλουτισμού μεταξύ των δοκιμασιών μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της δοκιμασίας προσδιορισμού της αντιθρομβωτικής ικανότητας. Η αντιθρομβωτική δράση είναι ανεξάρτητη από την αντιοξειδωτική, καθώς κάθε μία έχει διαφορετικό μηχανισμό και υποδοχείς δράσης (Freedman & Keaney Jr., 2001).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει άμεσα τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά με την πρόληψη διάφορων χρόνιων ασθενειών. Η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αποσβένουν τις ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό και επομένως να μειώνουν με αυτόν τον τρόπο την καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και μορίων όπως λιποειδών και DNA, φαίνεται ότι αποτελεί έναν από τους βασικότερους προστατευτικούς μηχανισμούς. Η ενίσχυση της

αντιοξειδωτικής και της αντιθρομβωτικής δράσης των τροφίμων με την δημιουργία εξαιρετικά δραστικών φυσικών πρόσθετων, ειδικά όταν αυτά προέρχονται από υποπροϊόντα τροφίμων, μπορεί να δράσει ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου, όταν τα τρόφιμα αυτά αποτελούν μέρος μίας ισορροπημένης διατροφής και να συμβάλει στην πρόληψη κατά της ανάπτυξης χρόνιων νοσημάτων, που έχουν ως κύριους αιτιολογικούς μηχανισμούς το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή, και τη θρόμβωση όπως συμβαίνει στα καρδιαγγειακά νοσήματα, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, την παχυσαρκία και διάφορους τύπους καρκίνου.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alsaman, F. B., Tulbek, M., Nickerson, M., & Ramaswamy, H. S. (2020). Evaluation of factors affecting aquafaba rheological and thermal properties. *LWT*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109831>
- Andargie, M., Vinas, M., Rathgeb, A., Möller, E., & Karlovsky, P. (2021). Lignans of sesame (*Sesamum indicum* L.): A comprehensive review. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040883>
- Baxevanis, G. K., Sakketou, E. K. I., Tentolouris, N. K., Karathanos, V. T., Fragkiadakis, G. A., & Kanellos, P. T. (2021). Tahini consumption improves metabolic and antioxidant status biomarkers in the postprandial state in healthy males. *European Food Research and Technology*, 247(11), 2721-2728. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03828-5>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Muñoz, A. M., Navas, M. J., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 102-125. <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632312>
- Carullo, G., Spizzirri, U. G., Loizzo, M. R., Leporini, M., Sicari, V., Aiello, F., & Restuccia, D. (2020). Valorization of red grape (*Vitis vinifera* cv. sangiovese) pomace as functional food ingredient. *Italian Journal of Food Science*, 32(2), 367-385. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1758>
- Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., & Duh, P. D. (2002). Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, 78(3), 347-354. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00119-X)
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Demopoulos, C. A., Karantonis, H. C., & Antonopoulou, S. (2003). Platelet activating factor - A molecular link between atherosclerosis theories. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 705-716. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300845>
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- Eren, E., Icyer, N. C., Tatlisu, N. B., Kilidli, M., Kaderoglu, G. H., & Toker, Ö. S. (2021). A new trend among plant-based food ingredients in food processing technology: Aquafaba. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2002259>
- Freedman, J. E., & Keane Jr., J. F. (2001). Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *Journal of Nutrition*, 131(2), 374S-377S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.374S>
- He, Y., Purdy, S. K., Tse, T. J., Tar'an, B., Meda, V., Reaney, M. J. T., & Mustafa, R. (2021). Standardization of Aquafaba Production and Application in Vegan Mayonnaise Analogs. *Foods*, 10(9), 1978. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10091978>

- He, Y., Shim, Y. Y., Mustafa, R., Meda, V., & Reaney, M. J. T. (2019). Chickpea cultivar selection to produce aquafaba with superior emulsion properties. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120685>
- Lafarga, T., Villaró, S., Bobo, G., & Aguiló-Aguayo, I. (2019). Optimisation of the pH and boiling conditions needed to obtain improved foaming and emulsifying properties of chickpea aquafaba using a response surface methodology. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2019.100177>
- Monteiro, G. C., Minatel, I. O., Junior, A. P., Gomez-Gomez, H. A., de Camargo, J. P. C., Diamante, M. S., Pereira Basílio, L. S., Tecchio, M. A., & Pereira Lima, G. P. (2021). Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. *LWT*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110053>
- Moore, J., & Yu, L. L. (2007). Methods for Antioxidant Capacity Estimation of Wheat and Wheat-Based Food Products. In Yu, L. L. (Ed), *Wheat Antioxidants* (pp. 118-166). John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, USA. <https://www.wiley.com/en-us/Wheat+Antioxidants-p-9780470042595>
- Morsy, M. K., Sami, R., Algarni, E., Al-Mushhin, A. A. M., Benajiba, N., Almasoudi, A., Almasoudi, A. G., & Mekawi, E. (2022). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Sesame Seed (*Sesamum indicum*) By-Products for Stability and Shelf Life Improvement of Refined Olive Oil. *Antioxidants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020338>
- Nagendra Prasad, M. N., Sanjay, K. R., Prasad, D. S., Vijay, N., Kothari, R., & Nanjunda Swamy, S. (2012). A Review on Nutritional and Nutraceutical Properties of Sesame. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000127>
- Ottaway, B. P. (2008). Principles of food fortification and supplementation. In Ottaway, B. P. (Ed.), *Food fortification and supplementation: Technological, safety and regulatory aspects* (1st ed., pp. 1-10). Woodhead Publishing, Cambridge, UK. <http://doi.org/10.1533/9781845694265.1>
- Papadakis, E. N., Lazarou, D., Grougnet, R., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Papadopoulou-Mourkidou, E., & Papadopoulos, A. I. (2008). Effect of the form of the sesame-based diet on the absorption of lignans. *British Journal of Nutrition*, 100(6), 1213–1219. <https://doi.org/10.1017/S0007114508978272>
- Proestos, C., & Komaitis, M. (2013). Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods*, 2, 90-99. <https://doi.org/10.3390/foods2010090>
- Rainero, G., Bianchi, F., Rizzi, C., Cervini, M., Giuberti, G., & Simonato, B. (2022). Breadstick fortification with red grape pomace: effect on nutritional, technological and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(6), 2545–2552. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11596>
- Reshma, M. V., Namitha, L. K., Sundaresan, A., & Ravi Kiran, C. (2013). Total phenol content, antioxidant activities and α -Glucosidase inhibition of sesame cake extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6), 723-731. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00671.x>
- Routray, W., & Orsat, V. (2013). Preparative extraction and separation of phenolic compounds. In Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (Eds.), *Natural Products* (pp. 2013-2045). Springer, Heidelberg, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_55
- Schnitzer, E., Pinchuk, I., Bor, A., Fainaru, M., Samuni, A. M., & Lichtenberg, D. (1998). Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma. *Chemistry and Physics of Lipids*, 92(2), 151-170. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00021-8)

- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M., & Wall, D. S. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99(3), 478-483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.009>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Sohouli, M. H., Haghshenas, N., Hernández-Ruiz, Á., & Shidfar, F. (2022). Consumption of sesame seeds and sesame products has favorable effects on blood glucose levels but not on insulin resistance: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Phytotherapy Research*, 36(3), 1126-1134. <https://doi.org/10.1002/ptr.7379>
- Sridhar, K., & Charles, A. L. (2021). Fortification using grape extract polyphenols – a review on functional food regulations. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(8), 3742-3751. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15001>
- Wang, S., Amigo-Benavent, M., Mateos, R., Bravo, L., & Sarriá, B. (2017). Effects of *in vitro* digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(2), 188-200. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1228099>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS

Η επιλογή του εκχυλίσματος στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό ανάμεσα στο υπερήχων, στο μικροκυμάτων και στον συνδυασμό μικροκυμάτων – υπερήχων έγινε με την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης στην δοκιμασία ABTS.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.1.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων των στέμφυλων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg στέμφυλων που όταν εκχυλιστούν αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως % απόσβεση του ABTS^{•+} που επιτυγχάνει το κάθε δείγμα. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 10.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων στέμφυλων.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg στέμφυλων	% απόσβεση του ABTS ^{•+}
LM	4	14,27	37,22 ± 2,75
	5	17,84	46,66 ± 3,27
	6	21,41	53,82 ± 2,89
LU	4	0,40	40,04 ± 2,71
	5	0,50	45,10 ± 3,79
	6	0,60	52,01 ± 2,65
LMU'	2	0,20	50,00 ± 2,99
	3	0,30	67,92 ± 10,12
	4	0,40	75,17 ± 1,18

LM: εκχύλισμα στέμφυλων με μικροκύματα, **LU:** εκχύλισμα στέμφυλων με υπερήχους, **LMU':** εκχύλισμα στέμφυλων με συνδυασμό μικροκύματα - υπέρηχοι. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=3).

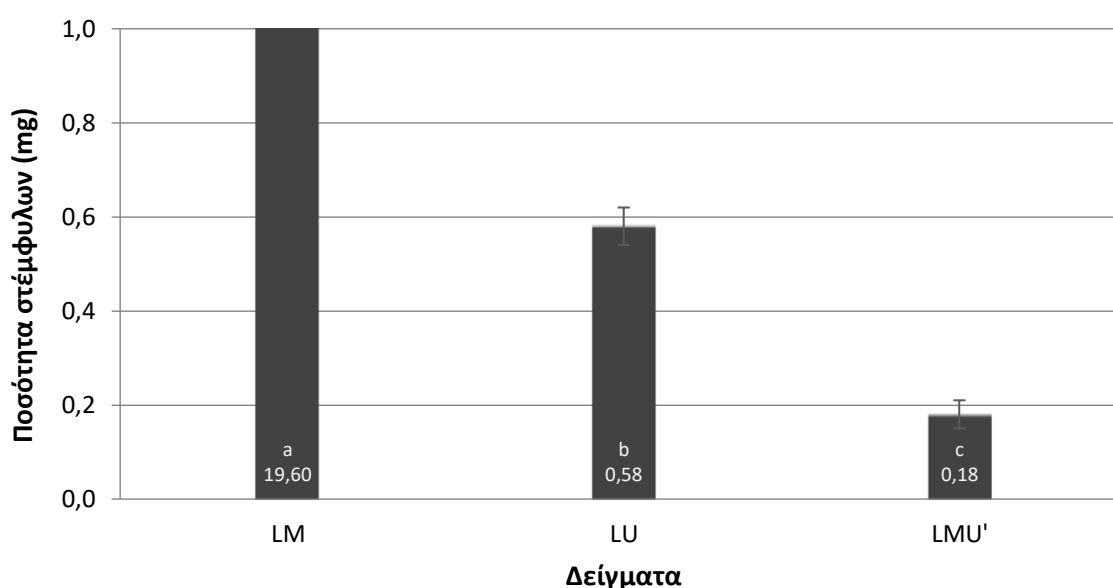
Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 10.1. υπολογίστηκαν τα mg στέμφυλων για 50% απόσβεση του ABTS^{•+} (SA₅₀) για κάθε εκχύλιση. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.2.) και παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις (Διάγραμμα 10.1.).

Πίνακας 10.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS (SA_{50}) εκχυλισμάτων στέμφυλων.

Δείγματα	mg στέμφυλων για 50% απόσβεση του ABTS*+ (SA_{50})
LM	$19,60 \pm 1,23^a$
LU	$0,58 \pm 0,04^b$
LMU'	$0,18 \pm 0,03^c$

LM: εκχύλισμα στέμφυλων με μικροκύματα, **LU:** εκχύλισμα στέμφυλων με υπερήχους, **LMU':** εκχύλισμα στέμφυλων με συνδυασμό μικροκύματα - υπέρηχοι. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^a, ^b, ^c) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.

Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης Εκχυλισμάτων στέμφυλων



Διάγραμμα 10.1. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων στέμφυλων, εκφρασμένα ως mg στέμφυλων για 50% απόσβεση του ABTS*+ (SA_{50}). **LM:** εκχύλισμα στέμφυλων με μικροκύματα, **LU:** εκχύλισμα στέμφυλων με υπερήχους, **LMU':** εκχύλισμα στέμφυλων με συνδυασμό μικροκύματα - υπέρηχοι. Το LM είναι εκτός διαγράμματος. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση ($n=3$). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-c) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε το εκχύλισμα στέμφυλων με συνδυασμό μικροκύματα - υπέρηχοι (LMU') απαιτώντας μόλις 0,18 mg για να επιτευχθεί απόσβεση κατά 50% της ελεύθερης ρίζας ABTS*+, οπότε και ήταν αυτό που επιλέχθηκε. Το LMU' ακολούθησαν το εκχύλισμα στέμφυλων με υπερήχους (LU) με 0,58 mg ($p < 0,001$), και με μεγάλη διαφορά το εκχύλισμα στέμφυλων με μικροκύματα (LM) με 19,60 mg (Πίνακας 10.2.).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ABTS

Εμπλουτίστηκε ταχίни με πέντε διαφορετικές αναλογίες, 0,91, 1,81, 2,72, 3,63 και 4,54%, από το συμπυκνωμένο εκχύλισμα στέμφυλων κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Λημνιό του συνδυασμού μικροκυμάτων – υπερήχων, LMU, και 5% cake σησαμιού σε τρεις επαναλήψεις για κάθε αναλογία και τα δείγματα εκχυλίστηκαν κατά Bligh & Dyer. Η επιλογή του ποσοστού του τελικού εμπλουτισμού έγινε με την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων τους στην δοκιμασία ABTS.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.3.) παρουσιάζονται οι ποσότητες των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μL εκχυλίσματος), τα mg τελικού προϊόντος που όταν εκχυλιστούν αντιστοιχούν στις ποσότητες αυτές και οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων τους μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις εκφρασμένες ως % απόσβεση του ABTS^{•+} που επιτυγχάνει το κάθε δείγμα. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν για εξασφάλιση επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 10.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων εμπλουτισμού.

Δείγματα	μL εκχυλίσματος	mg τελικού προϊόντος	% απόσβεση του ABTS ^{•+}
0,91%	15,0	0,462	49,75 ± 2,51
	30,0	0,924	73,33 ± 7,70
1,81%	15,0	0,462	51,82 ± 3,53
	20,0	0,616	66,87 ± 2,51
2,72%	10,0	0,308	42,84 ± 6,37
	20,0	0,616	72,93 ± 3,46
3,63%	7,5	0,231	38,64 ± 6,41
	15,0	0,462	66,43 ± 5,55
4,54%	6,0	0,185	34,40 ± 4,98
	15,0	0,462	72,16 ± 4,72

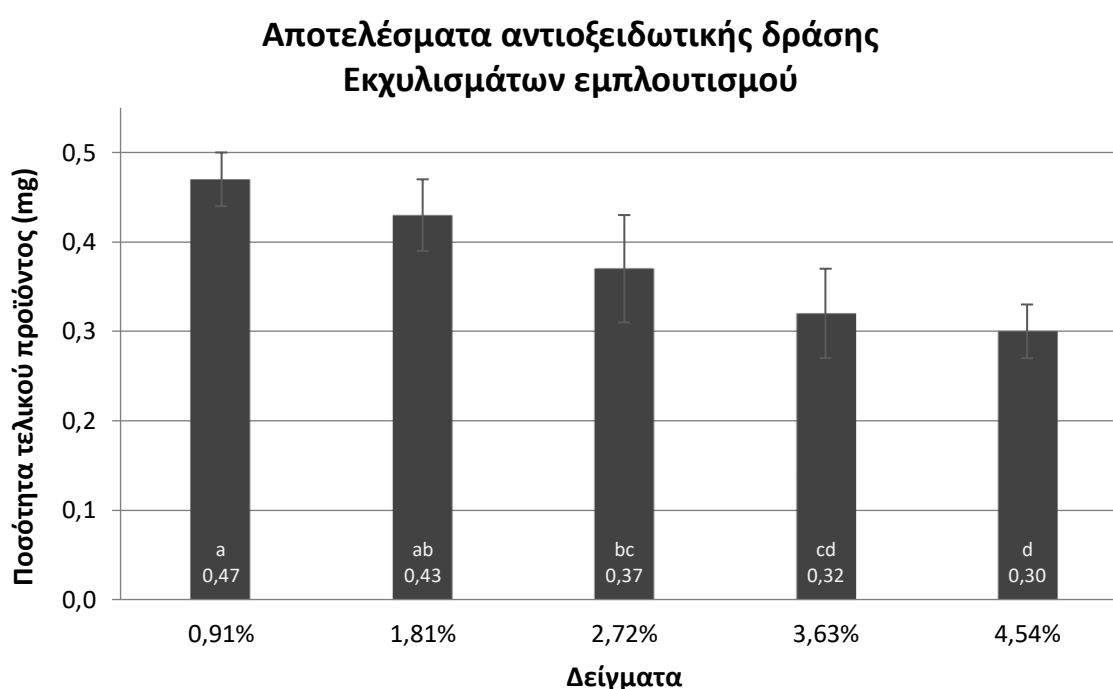
Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=9).

Βάσει των αποτελεσμάτων του Πίνακα 10.3. υπολογίστηκαν τα mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS^{•+} (SA₅₀) για κάθε εμπλουτισμό. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.4.) και παρουσιάζονται και με τη μορφή γραφήματος μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις (Διάγραμμα 10.2.).

Πίνακας 10.4. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS (SA_{50}) εκχυλισμάτων εμπλουτισμού.

Δείγματα	mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS* ⁺ (SA_{50})
0,91%	0,47 ± 0,03 ^a
1,81%	0,43 ± 0,04 ^{ab}
2,72%	0,37 ± 0,06 ^{bc}
3,63%	0,32 ± 0,05 ^{cd}
4,54%	0,30 ± 0,03 ^d

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=9). Οι τιμές κατά στήλη με το ίδιο γράμμα (π.χ. ^{a, b, c}) δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p > 0,05$) σύμφωνα με το Tukey test.



Διάγραμμα 10.2. Αποτελέσματα δοκιμασίας ABTS εκχυλισμάτων εμπλουτισμού, εκφρασμένα ως mg τελικού προϊόντος για 50% απόσβεση του ABTS*⁺ (SA_{50}). Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (n=9). Τα δείγματα χωρίς κοινό γράμμα (a-d) έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σύμφωνα με το Tukey test.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Από το [Διάγραμμα 10.2](#), φαίνεται ότι κοντά στο ποσοστό εμπλουτισμού 4% εξομαλύνεται η γραμμικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης σύμφωνα με την μέθοδο ABTS, οπότε ήταν και αυτό που επιλέχθηκε.