



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: *Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών*
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της αντίδρασης Maillard Ασπαραγίνης – Σακχάρων
σε υψηλές θερμοκρασίες και της προκατεργασίας
με ασπαραγινάση ως μεθόδου ελέγχου του σχηματισμού
του ακρυλαμιδίου

Έβη Σ. Καλυβιώτη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Πέτρος Ταούκης

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2011

Στην Άννη και στο Σπύρο

Πρόλογος

Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών της σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π..

Υπεύθυνος καθηγητής της εργασίας αυτής ήταν ο κ. Πέτρος Ταούκης, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση της εργασίας αυτής, για την καθοδήγησή του και τις χρήσιμες υποδείξεις του κατά την ερευνητική μου προσπάθεια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου αλλά και τους συμφοιτητές μου για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας που υπήρχε. Ιδιαίτερα, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τη διδάκτορα Έφη Δερμεσονλούογλου για την πολύτιμη βοήθεια της, την υπομονή της και την συνεργασία της κατά τη διάρκεια όλης της προσπάθειας μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Τσιμογιάννη Δημήτρη για τις πολύτιμες υποδείξεις του καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Τσεβδού για την καθοριστική συμβολή της.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου και ιδιαίτερα την οικογένειά μου, για την δύναμη που πάντα μου δίνει και τη συμπαράσταση προς την επίτευξη κάθε στόχου μου.

Περίληψη

Η αντίδραση Maillard είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός αντιδράσεων που συμβαίνει στα τρόφιμα κατά τη θερμική κατεργασία τους και έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών όπως καστανού χρώματος, χαρακτηριστικής γεύσης και αρώματος. Πραγματοποιείται μεταξύ καρβονυλοενώσεων με αμινομάδες και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία σκουρόχρωμων προϊόντων, γνωστών και ως μελανοΐδινες. Έχει αποδειχθεί ότι ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard είναι και το ακρυλαμίδιο μέσω της αντίδρασης κυρίως της ασπαραγίνης με ανάγοντα σάκχαρα. Το ακρυλαμίδιο όμως, συνιστά μια τοξική ένωση και μάλιστα θεωρείται ένας πιθανός καρκινογόνος παράγοντας σύμφωνα με τη διεθνή αντιπροσωπεία για την έρευνα κατά του καρκίνου (IARC).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αντίδραση Maillard ασπαραγίνης - φρουκτόζης σε υψηλές θερμοκρασίες και η προ-κατεργασία με ασπαραγινάση ως μεθόδου ελέγχου του ακρυλαμιδίου. Το ένζυμο ασπαραγινάση υδρολύει την ασπαραγίνη, μία από τις κυριότερες πρόδρομες ουσίες σχηματισμού του ακρυλαμιδίου, προς ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Μελετήθηκε ένα σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1 M σε θερμοκρασίες από 140 έως 200 °C και χρόνους από 0 έως 64 min, με και χωρίς προσθήκη του ενζύμου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, 3, 15 και 30 U/g ασπαραγίνης. Το σύστημα μοντέλο υποβλήθηκε σε επεξεργασία κάτω από τις ίδιες συνθήκες, αφού πρώτα τα δείγματα που περιείχαν το ένζυμο επώαστηκαν στους 40 °C για 20 min. Προσδιορίστηκαν η περιεκτικότητα σε ασπαραγίνη (kit προσδιορισμού ασπαραγίνης) και φρουκτόζη (μεθοδολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC), η περιεκτικότητα σε μελανοΐδινες (φασματοφωτομετρία), καθώς και το χρώμα (χρωματόμετρο, κλίμακα CIE Lab) και το pH.

Διαπιστώθηκε ότι η επίδραση του ενζύμου στη μείωση της ασπαραγίνης ήταν πολύ σημαντική αφού ακόμη και στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης (3 U/g ασπαραγίνης) η μείωση της ασπαραγίνης έφτασε το 72 %.

Για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ελάττωση αυτή έφτασε μέχρι 90 %. Η συγκέντρωση της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης για το σύστημα ασπαραγίνης – φρουκτόζης (χωρίς την προσθήκη ενζύμου) μειώθηκε με το χρόνο. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μαθηματική εξίσωση μέσω της οποίας υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μείωσης, k_{Asn} και k_{Fru} (Εξίσωση 3.1 και 3.4). Σημαντική επίδραση είχε η αύξηση της θερμοκρασίας στο ρυθμό κατανάλωσης και στα δύο συστήματα ασπαραγίνης – φρουκτόζης, με και χωρίς την προσθήκη του ενζύμου. Υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης για τη μείωση της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης σε 66,8 και 77,4 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στις υπόλοιπες ιδιότητες του συστήματος αυτές δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη του ενζύμου. Το χρώμα (δείκτες χρώματος L και DE), το pH και η περιεκτικότητα των μελανοϊδινών δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο συστημάτων ασπαραγίνης και φρουκτόζης. Για την αύξηση της περιεκτικότητας των μελανοϊδινών, βρέθηκε ότι η αντίδραση ακολουθεί κινητική τάξης $n=0,5$ ($R^2= 0,914$).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η χρήση του ενζύμου επιφέρει σημαντική μείωση στην περιεχόμενη ασπαραγίνη του συστήματος ασπαραγίνης φρουκτόζης που μελετήθηκε, χωρίς όμως να επηρεάζει την περιεκτικότητα των μελανοϊδινών, το χρώμα και το pH. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πραγματικά τρόφιμα χωρίς να μεταβάλλει τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η χρήση του ενζύμου προκαλεί μείωση στο σχηματιζόμενο ακρυλαμίδιο μέσω της αντίδρασης ασπαραγίνης και φρουκτόζης. Συγκεκριμένα, η προσθήκη του ενζύμου μπορεί να επιφέρει μείωση ως και 96 % του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου.

Εισαγωγή	13
Κεφάλαιο 1 ^ο	15
1.1. Μη Ενζυμικό Μαύρισμα	15
1.2. Αντίδραση Maillard	16
1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση Maillard	21
1.2.1.1. Θερμοκρασία – Χρόνος	21
1.2.1.2. Ενεργότητα νερού (a_w)	22
1.2.1.3. pH	23
1.2.1.4. Αντιδρώντα	23
1.2.2 Τρόποι για τον έλεγχο ή την παρεμπόδιση της αντίδρασης Maillard	23
1.3. Αντίδραση Maillard και επεξεργασία τροφίμων	24
1.3.1. <i>Flavor</i> / άρωμα	25
1.3.2. Χρώμα	26
1.3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα	27
1.3.4. Θρεπτική αξία	27
1.3.5. Τοξικές επιδράσεις	28
1.4. Ιδιότητες ακρυλαμιδίου	30
1.5. Παραγωγή	31
1.6. Αντιδράσεις του ακρυλαμιδίου	31
1.7. Χρήσεις	33
1.8. Τρόποι σχηματισμού – Μηχανισμοί	33
1.8.1. Ακρυλαμίδιο και αντίδραση Maillard	33
1.8.1.1. Ασπαραγίνη	33
1.8.1.2. Προτεινόμενος μηχανισμός ασπαραγίνης – γλυκόζης μέσω Maillard	34
1.8.2. Σχηματισμός μέσω της ακρολεΐνης	36
1.8.3. Σχηματισμός ακρυλαμιδίου μέσω αντιδράσεων αμινοξέων που δεν περιλαμβάνουν την ακρολεΐνη	37
1.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή του ακρυλαμιδίου	38
1.9.1. Περιεκτικότητα και είδος αναγωγικών σακχάρων	38
1.9.2. Θερμοκρασία και χρόνος	39

1.9.3. Υγρασία και ενεργότητα νερού (a_w)	40
1.8.4. pH 40	
1.9.5. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες	42
1.9.6. Προσθήκη αντιοξειδωτικών	43
1.9.7. Προσθήκη προσθέτων – Ανθρακικό αμμώνιο	44
1.9.7. Συνθήκες αποθήκευσης	44
1.10. Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	46
1.10.1. Αγρονομικοί παράγοντες	46
1.10.1.1. Αναγωγικά σάκχαρα	46
1.10.1.2. Ασπαραγίνη	47
1.10.2. Πρόσθετα κατά την Παρασκευή τροφίμων	48
1.10.2.1. Παράγοντες φουσκώματος	48
1.10.2.2. Δευτερεύοντα συστατικά	48
1.10.2.2.1. Προσθήκη γλυκίνης ή ιόντων ασβεστίου	48
1.10.2.2.2. Προσθήκη μέσων οξύνισης και Βιταμίνης C	49
1.10.2.3. pH	49
1.10.2.4. Αραίωση	49
1.10.3. Επεξεργασία	50
1.10.3.1. Ζύμωση	50
1.10.3.2. Θερμικό φορτίο, έλεγχος της θερμοκρασίας και περιεχόμενη υγρασία	50
1.10.3.3. Προεπεξεργασία	51
1.10.3.4. Ασπαραγινάση	52
1.10.4. Τελική επεξεργασία	52
1.10.4.1. Τελικό σημείο χρώματος	52
1.10.4.2. Οδηγός καταναλωτών	53
1.10.5. Καταστροφή ή εγκλωβισμός του ακρυλαμιδίου	53
1.11. Χρήση της ασπαραγινάσης για τη μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου	54
1.11.1. Ιδιότητες της ασπαραγινάσης	54
1.10.2. Βέλτιστες συνθήκες χρήσης του ενζύμου	56
1.11.3. Προτεινόμενες συγκεντρώσεις ενζύμου	58
1.11.4. Νομοθεσία πάνω στη χρήση του ενζύμου	60
Κεφάλαιο 2 ^ο	61

2.1. Σκοπός	61
2.2. Υλικά	64
2.2.1. Αντιδραστήρια	64
2.2.2. Όργανα	64
2.3. Πειραματική διαδικασία	65
2.3.1. Προετοιμασία των αντιδρώντων μιγμάτων	65
2.3.2. Πειραματική διάταξη	65
2.4. Αναλυτικές μέθοδοι	69
2.4.1. Προσδιορισμός ασπαραγίνης	69
2.4.2. Προσδιορισμός φρουκτόζης	72
2.4.3. Προσδιορισμός μελανοϊδινών	73
2.4.4. Μέτρηση χρώματος	74
2.4.5. Μέτρηση pH	75
2.5. Επεξεργασία αποτελεσμάτων	75
Κεφάλαιο 3 ^ο	77
3. Μελέτη της αντίδρασης Maillard σε υψηλές θερμοκρασίες	77
3.1. Μελέτη της αντίδρασης ασπαραγίνης – φρουκτόζης	77
3.1.1. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ασπαραγίνης	77
3.1.2. Μεταβολή της συγκέντρωσης της φρουκτόζης	80
3.1.3. Μεταβολή του χρώματος κατά την αντίδραση	82
3.1.4. Μελέτη της παραγωγής μελανοϊδινών	84
3.1.5. Μελέτη της μεταβολής του pH κατά την αντίδραση	87
3.2. Μελέτη της επίδρασης του ενζύμου ασπαραγινάση στην αντίδραση ασπαραγίνης – φρουκτόζης	88
3.2.1. Επίδραση της ασπαραγινάσης στις συγκεντρώσεις της ασπαραγίνης	88
3.2.2. Επίδραση του ενζύμου στις συγκεντρώσεις της φρουκτόζης	93
3.2.3. Επίδραση του ενζύμου στο χρώμα	95
3.2.4. Επίδραση του ενζύμου στη συγκέντρωση των μελανοϊδινών	97
3.2.5. Επίδραση του ενζύμου στο pH	101
Κεφάλαιο 4 ^ο	103
4.1. Γενικά συμπεράσματα	103
4.2. Πρόβλεψη για τη μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου	107

Περιεχόμενα

Βιβλιογραφία	111
Παράρτημα	117

Εισαγωγή

Υψηλές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου καταγράφηκαν σε τρόφιμα που περιέχουν υψηλό ποσοστό υδατανθράκων (σάκχαρα) και η επεξεργασία τους πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες (όπως πατάτες, προϊόντα πατάτας, δημητριακά, ψωμί). Έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα που περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδατανθράκων με πρωτεΐνες, αμινοξέα και λιπίδια. Ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου μέσω της αντίδρασης Maillard φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος. Παράλληλα, το αμινοξύ που φέρεται να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση είναι η ασπαραγίνη, η οποία συναντάται σε πολλά τρόφιμα. Οι μελέτες της επιστημονικής κοινότητας έχουν στραφεί προς διάφορους τρόπους μείωσης της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα. Αυτοί περιλαμβάνουν από αλλαγές στον τρόπο επεξεργασίας των τροφίμων, αλλαγές στις πρώτες ύλες – συστατικά τους ακόμη και πρακτικές οδηγίες προς τους καταναλωτές για το πώς πρέπει να προετοιμάζουν το κάθε τρόφιμο. Εναλλακτικός τρόπος μείωσης είναι η προσθήκη ενζύμων, όπως είναι η ασπαραγινάση που υδρολύει την ασπαραγίνη, μία από τις κυριότερες πρόδρομες ουσίες σχηματισμού του ακρυλαμιδίου, προς ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Σημαντικό είναι, οι διάφορες μέθοδοι μείωσης του ακρυλαμιδίου να πετυχαίνουν υψηλά ποσοστά μείωσης του, χωρίς όμως να επηρεάζουν τα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν στο πρώτο μέρος, η μελέτη της αντίδρασης Maillard μεταξύ της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης σε υψηλές θερμοκρασίες από 140 έως 200 °C και στο δεύτερο μέρος, η μελέτη της αντίδρασης Maillard μετά από την προκατεργασία των δειγμάτων με ασπαραγινάση καθώς και η επίδραση της στα διάφορα χαρακτηριστικά του συστήματος. Και στις δύο περιπτώσεις μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων, ασπαραγίνη και φρουκτόζη, η συγκέντρωση των μελανοϊδινών, το χρώμα και το pH.

Στο θεωρητικό μέρος της εργασίας (Κεφάλαιο 1) παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης Maillard, οι τρόποι σχηματισμού και μείωσης

του ακρυλαμιδίου μέσω της αντίδρασης αυτής. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στο ένζυμο ασπαραγινάση και τις χρήσεις του. Ακολουθεί ο πειραματικός σχεδιασμός, τα υλικά και οι μέθοδοι προσδιορισμού στο Κεφάλαιο 2. Στο Κεφάλαιο 3 δίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της μελέτης (πειραματικά δεδομένα, Παράρτημα εργασίας) και η επεξεργασία τους, με τα σημαντικότερα συμπεράσματα να συνοψίζονται στο Κεφάλαιο 4.

Κεφάλαιο 1^ο

1.1. Μη Ενζυμικό Μαύρισμα

Το μαύρισμα που παρατηρείται στα τρόφιμα διακρίνεται σε ενζυμικό και μη ενζυμικό. Το ενζυμικό μαύρισμα οφείλεται σε μια ενζυμικά καταλυόμενη οξειδωση η οποία μετατρέπει τις φαινολικές ουσίες (που βρίσκονται σε λαχανικά) σε μια σειρά από προϊόντα τα οποία πολυμερίζονται και δίνουν ένα σκούρο χρώμα. Παράδειγμα αποτελεί το μαύρισμα της μπανάνας, του μήλου και της πατάτας όταν κόβονται.

Οι αντιδράσεις μη ενζυμικού μαυρίσματος είναι αντιδράσεις που συμβαίνουν στα τρόφιμα κατά τη θερμική τους κατεργασία ή τη μακρά αποθήκευσή τους. Οι αντιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να έχουν είτε επιθυμητά είτε ανεπιθύμητα αποτελέσματα, ανάλογα με το είδος του τροφίμου. Παραδείγματα που το μαύρισμα είναι επιθυμητό είναι τα προϊόντα της αρτοποιίας, τα ψημένα φαγητά, η μπύρα και ο καφές. Το μη ενζυμικό μαύρισμα έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση καστανού χρώματος, χαρακτηριστικής οσμής και γεύσης ενώ επηρεάζει τα θρεπτικά συστατικά και την πρωτεϊνική ποιότητα του τροφίμου. Επιπλέον είναι πιθανή σε ορισμένες συνθήκες η δημιουργία ανεπιθύμητων ουσιών.

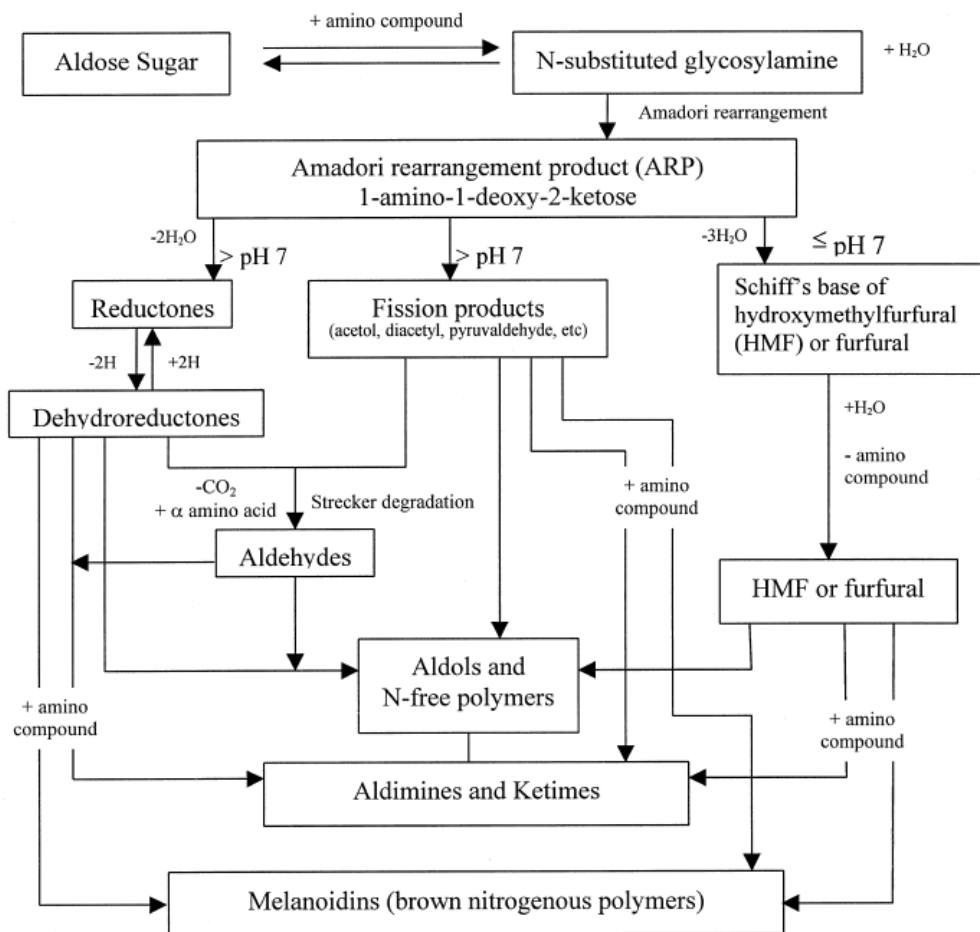
Γενικά, υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι αντιδράσεων μη ενζυμικού μαυρίσματος που απαντώνται στα τρόφιμα:

- Η αντίδραση Maillard, που είναι αντίδραση μεταξύ καρβονυλοενώσεων και αμινομάδων
- Η καραμελοποίηση, που οφείλεται στην διάσπαση σακχάρων σε υψηλές θερμοκρασίες
- Διάσπαση ασκορβικού οξέος, το τελικό στάδιο του οποίου περιλαμβάνει την αντίδραση Maillard

Σημαντικότερες κατά τη θερμική κατεργασία και την αποθήκευση των τροφίμων είναι η αντίδραση Maillard και η διάσπαση του ασκορβικού οξέος.

1.2. Αντίδραση Maillard

Το μη ενζυμικό μαύρισμα αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Maillard το 1912. Ο Maillard ανακάλυψε αυτήν την αντίδραση κατά τη διάρκεια πειραμάτων που έκανε με διάφορα σάκχαρα για το σχηματισμό πολυπεπτιδίων. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται σχηματικά η πορεία των αντιδράσεων Maillard (Εικόνα 1.1).



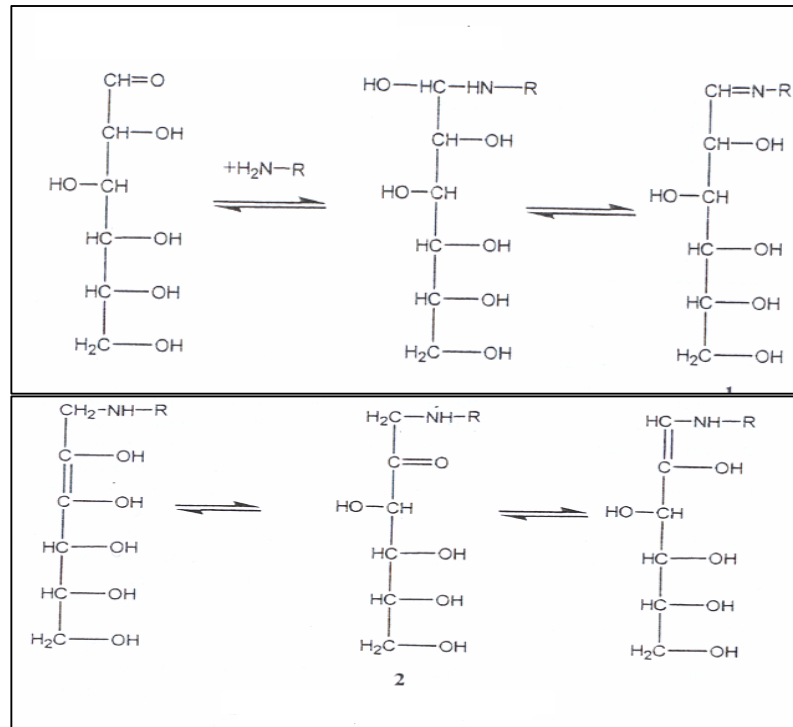
Εικόνα 1.1: Η αντίδραση Maillard (Martins et al., 2001)

Οι αντιδράσεις Maillard είναι μια σειρά διαδοχικών και αλληλοσυνδεόμενων διεργασιών. Είναι αντιδράσεις αμάρωσης στις οποίες συμμετέχουν αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες των οποίων η αμινική ομάδα δίνει αρχικά με ένα σάκχαρο προϊόντα συμπύκνωσης. Τα προϊόντα αυτά δρουν ως αυτοκαταλύτες για τις περαιτέρω αντιδράσεις ενολοποίησης, μετάθεσης

Amadori, αφυδάτωσης κ.λπ. Τελικά προϊόντα της σειράς αυτής των αντιδράσεων είναι οι μελανοϊδίνες.

Τα βασικά στάδια της αντίδρασης Maillard είναι τα παρακάτω:

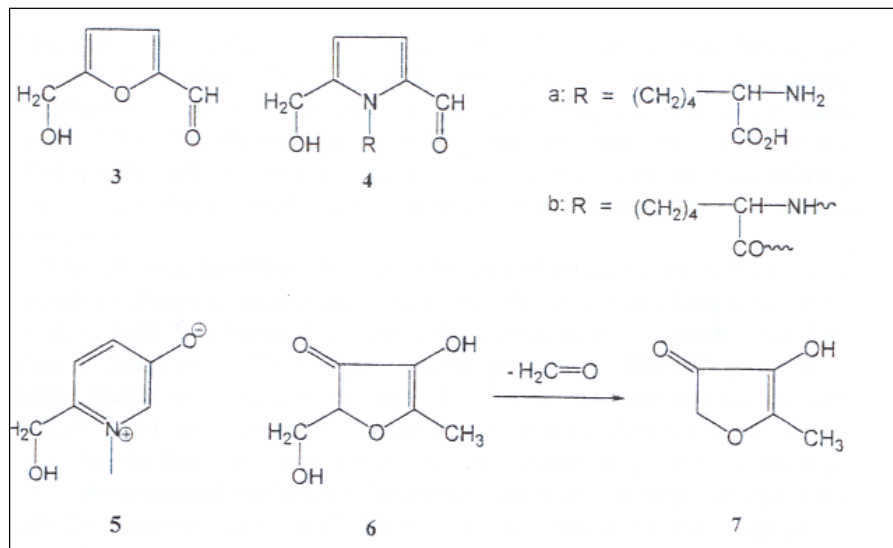
1. Στο αρχικό στάδιο, πραγματοποιείται συμπύκνωση της αλδεϋδομάδας του σακχάρου με τη βοήθεια της αμινομάδας, οπότε προκύπτει μία σχετικά ασταθής ένωση, η γλυκοσυλαμίνη.
2. Στο δεύτερο στάδιο η σχηματιζόμενη γλυκοσυλαμίνη μετασχηματίζεται σε αμινοκετόζη. Πρόκειται δηλαδή για το σχηματισμό των ενώσεων *Amadori* (Εικόνα 1.2). Αυτά τα ενδιάμεσα προϊόντα έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί σε συστήματα - μοντέλα και έχουν ανιχνευθεί σε πολλά τρόφιμα.



Εικόνα 1.2: Σχηματισμός ενώσεων *Amadori*

3. Δεοξυδικετόζες και δεοξαλδοκετόζες αποτελούν προϊόντα υποβάθμισης των αμινοκετοζών σε ένα εύρος τιμών pH από 4 έως 7. Διάνοιξη δακτυλίου ακολουθούμενη από 1-2 ή 1-3 ενολοποίηση είναι τα κρίσιμα στάδια αυτού του μετασχηματισμού. Ακολουθούν αφυδατώσεις και διασπάσεις και ο σχηματισμός πολλών δραστικών δικαρβονυλικών ενώσεων. Ένα από τα πιο σημαντικά τελικά προϊόντα της αντίδρασης της 3-δεοξυχελουλόζης

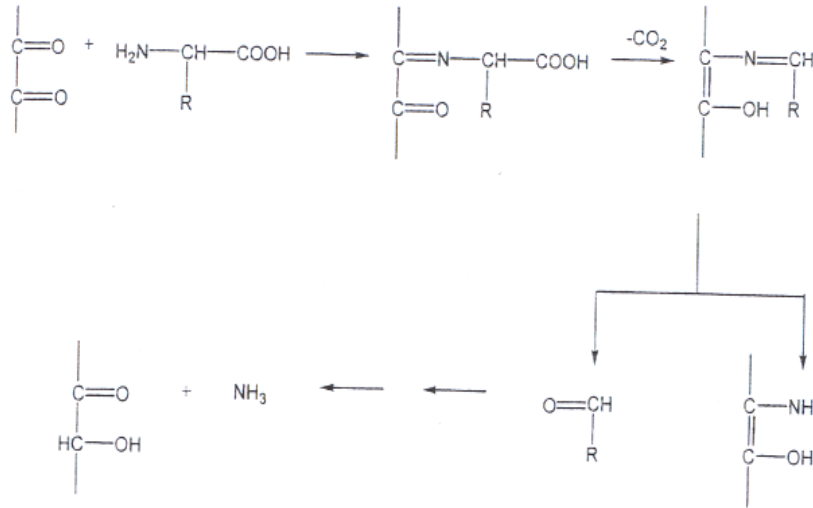
(*deoxyhelulose*) είναι η 5-υδροξυμεθυλ-φουρανοκαρβοξυαλδεΐδη (5-



hydroxymethyl- furancarboxaldehyde, HMF).

Εικόνα 1.3: Προϊόντα 3- δεοξυδικετόζης και 1- δεοξυδικετόζης

4. Με την παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων αμινών, η HMF αντικαθίσταται από πυραλδεΐδες (4) και από βεταΐνες (*betaines*) (5). Ενώσεις αυτής της μορφής προκύπτουν επίσης από τη μαλτόζη και την λακτόζη. Ένα τυπικό προϊόν υποβάθμισης της 1-δεοξυδικετόζης είναι η φουρανόνη (6), από την οποία εύκολα αποσπάται η φορμαλδεΐδη, οπότε προκύπτει η φουρανόνη (7) η οποία είναι η βάση για τον σχηματισμό ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους.



Εικόνα 1.5: Υποβάθμιση Strecker

Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αντίδραση των αμινοξέων με α-δικαρβονυλο-ενώσεις, και το σχηματισμό ενός β-κετοοξέος (*beta-ketoacid*) το οποίο είναι αποκαρβοξυλιωμένο. Έτσι, το αμινοξύ μετατρέπεται σε μια αλδεύδη, η οποία έχει έναν άνθρακα λιγότερο από το αρχικό αμινοξύ. Οι περισσότερες από αυτές τις αλδεύδες είναι πολύ δραστικά ενδιάμεσα. Οι αλδεύδες που σχηματίζονται από την αντίδραση *Strecker* αλλά και οι πυραζίνες σε συνδυασμό με τα ενδιάμεσα προϊόντα αποικοδόμησης των σακχάρων δίνουν χαρακτηριστικά αρώματα στα τρόφιμα και γι' αυτό η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη αρώματος στο ψωμί, στο μέλι, στη σοκολάτα κ.λ.π.

Γενικά, η αντίδραση Maillard και τα προϊόντα της είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μελανοΐδινες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ενέργεια απέναντι στο λινολενικό οξύ καθώς και σε σκούρα ποτά (μπύρες).

Η μελέτη του φαινομένου δίνει κίτρινο ή καφέ χρώμα που μετράται ποσοτικά στα 420 nm του εγγύς UV. Επίσης, μπορούν να απομονωθούν χρωματογραφικά προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης, ή ακόμα να μετρηθεί το εκλυόμενο CO₂ ως αποτέλεσμα των οξειδωτικών δράσεων. Στην αντίδραση Maillard αρχικά τα διαλύματα είναι άχρωμα και δεν απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους, εντούτοις παρουσιάζουν αυξημένη αναγωγική δράση. Μετά από

λίγο το αντιδρών αποκτά ένα κίτρινο χρώμα που παρουσιάζει μεγάλη απορρόφηση στο UV.

Η αντίδραση Maillard έχει θεωρηθεί ότι είναι μια άλλη οδός για το σχηματισμό της ακρολεΐνης (Tezer & Ozkan, 2001). Επίσης, μέσω της αντίδρασης Maillard μπορεί να πραγματοποιηθεί ο άμεσος μετασχηματισμός του ακρυλαμιδίου μέσω μετασχηματισμών των αμινοξέων.

Οι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης της αντίδρασης Maillard είναι η θερμοκρασία, το είδος και η συγκέντρωση του αναγόμενου σακχάρου και της αμινοενώσεως, η ενεργότητα του νερού (a_w), η παρουσία ιόντων χαλκού και το pH.

1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση Maillard

1.2.1.1. Θερμοκρασία - Χρόνος

Η εξάρτηση από τη θερμοκρασία για τις χημικές δράσεις εκφράζεται μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a), όπως φαίνεται και από την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 1.1.):

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \Leftrightarrow \ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (1.1)$$

όπου, k_0 η σταθερά της αντίδρασης, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η θερμοκρασία σε βαθμούς Κ.

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η εξάρτηση του ρυθμού αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Τα

δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί για την ενέργεια ενεργοποίησης, όσον αναφορά την αντίδραση Maillard, δίνουν ένα εύρος τιμών που φτάνει μέχρι την τιμή 160 kJ/mole. Αυτό εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως η ενεργότητα του νερού και το pH. Το πόσο επηρεάζει η θερμοκρασία την αντίδραση Maillard έχει να κάνει και με τα αντιδρώντα. Ο ρόλος της θερμοκρασίας διαφέρει ανάλογα με το κριτήριο σύμφωνα με το οποίο εξετάζεται, π.χ το σχηματισμό σκουρόχρωμων προϊόντων ή την απώλεια αμινοξέων. Για παράδειγμα αν θερμανθεί σύστημα γλυκόζης – γλυκίνης για μια ώρα στους 90 °C ή για 9 ώρες στους 70 °C παρατηρείται η ίδια απώλεια γλυκίνης αλλά στην πρώτη περίπτωση διαπιστώνεται διπλάσια UV απορρόφηση από την δεύτερη (δηλαδή διπλάσιος βαθμός μαυρίσματος). Αυτό σημαίνει ότι η ακριβής φύση των σκουρόχρωμων προϊόντων που σχηματίζονται είναι διαφορετική στους 70 °C με αυτή στους 90 °C.

1.2.1.2. Ενεργότητα νερού (a_w)

Η περιεχόμενη υγρασία και η ενεργότητα του νερού στα τρόφιμα είναι οι αμέσως πιο σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μετά τη θερμοκρασία που επιδρούν στο ρυθμό των αντιδράσεων και που καθορίζουν την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου. Η ενεργότητα του νερού είναι ένα μέτρο της διαθεσιμότητας του νερού στα διάφορα τρόφιμα. Το νερό δρα μερικώς ως αντιδρών, μερικώς σαν διαλύτης και σαν μέσο μεταφοράς των αντιδρώντων. Στα αρχικά στάδια της αντίδρασης Maillard, τρία mol H_2O σχηματίζονται ανά mol υδρογονάνθρακα. Έτσι η αντίδραση λαμβάνει χώρα λιγότερο εύκολα σε τρόφιμα με υψηλή ενεργότητα νερού. Η παρουσία νερού μπορεί στα αρχικά στάδια να παρεμποδίζει μερικώς την αντίδραση γλυκοσυλαμίνης αλλά ενισχύει την απαμίνωση που πραγματοποιείται σε επόμενο στάδιο. Ο ρυθμός της αντίδρασης της καστανώσης αυξάνει από την ξηρή κατάσταση καθώς η ενεργότητα του νερού αυξάνει, ως ένα μέγιστο ρυθμό με a_w από 0,5-0,8 ενώ μειώνεται για τιμές πάνω από 0,8, διότι οι διαλυμένες ουσίες διαλύονται ολοκληρωτικά. Η ενεργότητα συνδέεται και με την υγρασία, αλλά έχει να κάνει με το πόσο διαθέσιμο είναι το νερό στο τρόφιμο, πόσο ισχυρά δεσμευμένο είναι. Σε υψηλές

θερμοκρασίες που αφορούν και τις θερμικές κατεργασίες, χαμηλές ενεργότητες νερού ευνοούν την αντίδραση Maillard (Lingnert, 1990).

1.2.1.3. pH

Για την εκτίμηση της επίδρασης του pH στην αντίδραση Maillard είναι απαραίτητη η διάκριση δύο περιπτώσεων. Η πρώτη είναι η επίδραση του pH στην ανάπτυξη του χρώματος σε ένα σύστημα που περιέχει ελεύθερα αμινοξέα και αναγόμενα σάκχαρα. Η δεύτερη περίπτωση είναι η επίδραση του pH όταν το σύστημα περιέχει αναγόμενα σάκχαρα και ελεύθερες πρωτεΐνες.

Τα υδατικά συστήματα (μοντέλα) που βασίζονται σε βρασμό με κάθετο ψυκτήρα ροής (*reflux boiling*) σακχάρων και αμινοξέων πρέπει να ενισχύονται με ρυθμιστικό διάλυμα αφού το pH πέφτει απότομα από την τιμή 7 στην τιμή 5. Μικρές τιμές pH ($\text{pH} < 7$) ευνοούν το σχηματισμό φουρφουράλης, ενώ οι μηχανισμοί αναγωγής και διάσπασης ευνοούνται από υψηλές τιμές pH.

1.2.1.4. Αντιδρώντα

Η ταχύτητα αμαύρωσης του ανάγοντος σακχάρου σχετίζεται με την ευκολία διάνοιξης του δακτυλίου προς μια αναγωγική μορφή. Οι πεντόζες αμαυρώνονται ευκολότερα από τις εξόζες. Αναφέρεται ότι η αμαύρωση μειώνεται με την ακόλουθη σειρά: D-ξυλόζη > L-αραβινόζη > εξόζες > δισακχαρίτες. Η D-φρουκτόζη είναι πολύ λιγότερο δραστική από τις αλδόζες, εξαιτίας του διαφορετικού μηχανισμού που ακολουθεί από τις κετόζες. Ο ρυθμός της καστανώσης αυξάνεται όταν αυξάνει η συγκέντρωση του ενός αντιδρώντος ενώ παραμένει σταθερή σε μια τιμή η συγκέντρωση του άλλου αντιδρώντος.

1.2.2 Τρόποι για τον έλεγχο ή την παρεμπόδιση της αντίδρασης Maillard

Έχουν διατυπωθεί διάφοροι τρόποι για τον έλεγχο ή την παρεμπόδιση της αντίδρασης Maillard (Kaanane & Labuza, 1989). Μερικοί από αυτούς είναι οι παρακάτω:

1. Απομάκρυνση των υδατανθράκων που προσβάλλονται, μέσω διάλυσης ή με ενζυμική δράση. Είναι ένας τρόπος που δεν χρησιμοποιείται σε πολλά τρόφιμα.
2. Προσθήκη χημικών ουσιών που μπλοκάρουν την καρβονυλική ομάδα των σακχάρων, όπως είναι τα θειώδη άλατα. Η τεχνική αυτή σήμερα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη.
3. Προσθήκη χημικών ουσιών που συναγωνίζονται την αμινομάδα, προς το σχηματισμό ομοιοπολικών προϊόντων με το καρβονύλιο του σακχάρου, όπως είναι η κυστεΐνη που σχηματίζει θιζολιδίνη. Η μέθοδος αυτή είναι ακόμα υπό εξέταση.
4. Μπλοκάρισμα των αμινομάδων, συνήθως με τροποποίηση όπως σπάσιμο του κυκλικού δακτυλίου ή μεθυλοποίηση.
5. Μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w). Γενικά, για χαμηλότερες τιμές ενεργότητας νερού, παρατηρείται μείωση του ρυθμού.
6. Μείωση του pH.
7. Μείωση της θερμοκρασίας.
8. Απομάκρυνση του O_2 και των μετάλλων ειδικά στις περιπτώσεις που υπάρχει ασκορβικό οξύ.

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα. Η πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρεμπόδισης του μη ενζυμικού μαυρίσματος στα τρόφιμα, είναι η προσθήκη θειωδών αλάτων.

1.3 Αντίδραση Maillard και επεξεργασία τροφίμων

Εξερευνώντας την αντίδραση Maillard ο στόχος κλειδί για τη βιομηχανία τροφίμων είναι να κατανοήσει και να χρησιμοποιήσει τις οδούς της αντίδρασης που θα οδηγήσουν στην βελτίωση των προϊόντων που υπάρχουν αλλά και στην ανάπτυξη νέων προϊόντων. Ενώ είναι πολύ εύκολο να υποθέσει κανείς ότι αυτό σημαίνει τη δημιουργία *flavor* και χρώματος, πολλά από τα προϊόντα της αντίδρασης δεν δίνουν θετικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα και τα συστατικά τους. Έτσι, η θετική συνεισφορά της αντίδρασης Maillard από την μια μεριά, μπορεί να θεωρηθεί η ενίσχυση χρώματος και *flavor* αλλά και από την άλλη

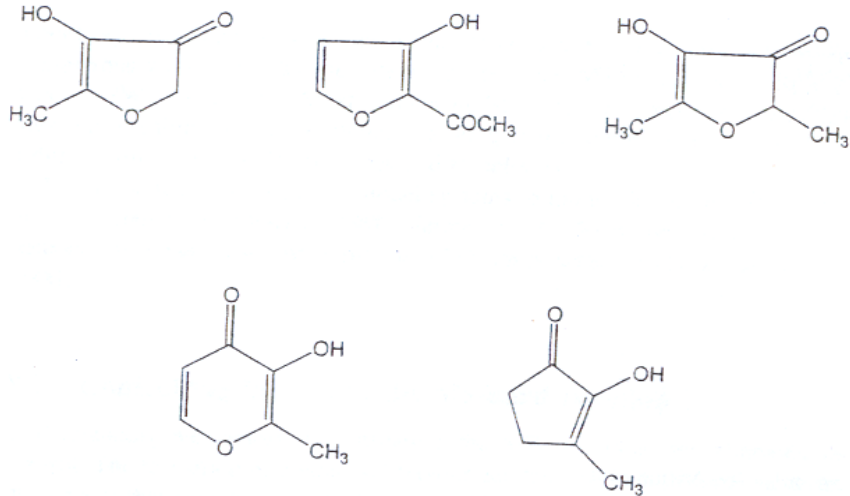
πλευρά, μπορεί να επιδράσει αρνητικά με αποχρωματισμό των τροφίμων, μείωση του *flavor*, μείωση της θρεπτικής αξίας και δημιουργία τοξικών προϊόντων.

1.3.1 *Flavor* / άρωμα

Το *flavor* και το άρωμα εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση των δικαρβονυλικών ενώσεων (ενδιάμεσα προϊόντα) με τα αμινοξέα μέσω των αντιδράσεων *Stecker*. Οι αλκυλικές πυραζίνες και οι αλδεΐδες (*Stecker*) θεωρούνται αρωματικές ενώσεις που προκύπτουν από την αντίδραση Maillard. Για παράδειγμα, χαμηλά επίπεδα πυραζίνης σχηματίζονται κατά τη διαδικασία παραγωγής νιφάδων πατάτας, όταν η θερμοκρασία είναι μικρότερη από 130 °C, αλλά αυξάνεται κατά δέκα φορές όταν η θερμοκρασία αυξηθεί στους 160 °C. Εντούτοις μειώνεται όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 190 °C λόγω πιθανής πρόσδεσης μακρομορίων ή λόγω εξάτμισης.

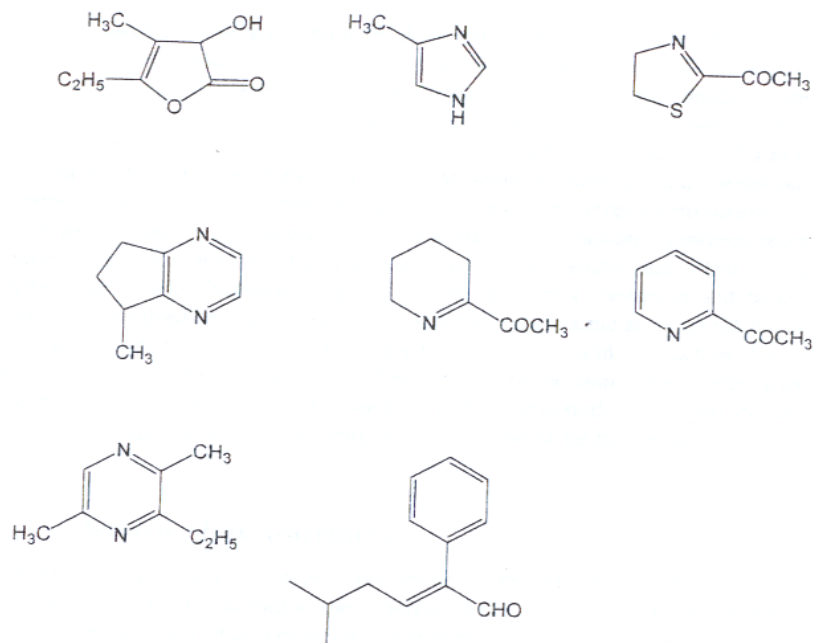
Το προφίλ του αρώματος ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία και το χρόνο θέρμανσης. Σε κάθε δεδομένη σχέση θερμοκρασίας – χρόνου προκύπτει και δεδομένο άρωμα που δεν είναι δυνατόν να δημιουργηθεί για άλλη σχέση θερμοκρασίας – χρόνου. Οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το άρωμα πρέπει να είναι μικρές σε μέγεθος και να είναι μη πολικές. Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές μπορούν να μελετηθούν με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας - φασματογραφίας μάζας (GC-MS) πολύ πιο εύκολα από άλλα προϊόντα της αντίδρασης Maillard. Εκατοντάδες ενώσεις τέτοιου είδους έχουν ταυτοποιηθεί. Ο Nursten (1980-81) τις χώρισε σε τρεις κατηγορίες:

- Προϊόντα αφυδάτωσης ή διάσπασης των σακχάρων, όπως φουράνες, καρβονύλια, οξέα (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Προϊόντα αφυδάτωσης ή διάσπασης των σακχάρων

- Προϊόντα υποβάθμισης των αμινοξέων, αλδεύδες Stecker και ενώσεις θείου.
- Πτητικές ενώσεις που προκύπτουν από διάφορες αλληλεπιδράσεις, όπως: πυρόλες, πυριδίνες, πυραζίνες, θειαζόλες κ.λ.π. (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7: Πτητικές ενώσεις που προκύπτουν από διάφορες αλληλεπιδράσεις

1.3.2 Χρώμα

Τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία χρώματος διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

- Μεγάλου μοριακού βάρους μακρομόρια που αναφέρονται ως μελανοΐδινες
- Χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις που περιέχουν 2 ή 3 ετεροκυκλικούς δακτυλίους (Ames et al., 1998)

Η ανάπτυξη χρώματος είναι μεγαλύτερη με αύξηση της θερμοκρασίας, του χρόνου θέρμανσης, της τιμής του pH και μιας μέσης τιμής ενεργότητας νερού ($a_w=0,3-0,7$). Γενικά, η καστανωση λαμβάνει χώρα αργά σε ξηρά συστήματα και σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι σχετικά αργή σε συστήματα υψηλής υγρασίας. Το χρώμα ενισχύεται σε τιμές pH μεγαλύτερες του 7. Η συγκέντρωση του ανάγοντος σακχάρου έχει μεγάλη επίδραση στην ανάπτυξη χρώματος. Μεταξύ των αμινοξέων, η λυσίνη δίνει τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην δημιουργία χρώματος και η κυστεΐνη τη μικρότερη.

1.3.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα

Υπάρχουν διάφορες αναφορές σχετικά με το σχηματισμό αντιοξειδωτικών προϊόντων της αντίδρασης Maillard. Η προσθήκη αμινοξέων ή γλυκόζης σε ζύμη μπισκότων δείχνει να βελτιώνει τη σταθερότητα της οξείδωσης κατά την αποθήκευση των μπισκότων. Η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων της αντίδρασης Maillard έχει ερευνηθεί εις βάθος. Τα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης Maillard μπορούν να σπάσουν τις ακραίες αλυσίδες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου. Η αντίδραση Maillard έχει ιδιότητες μετάλλων (σχηματίζει χηλική ένωση) και καθυστερεί την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Οι μελανοΐδινες θεωρούνται επίσης ως ουσίες που έλκουν ουσίες που φέρουν δραστικό οξυγόνο (Hayase et al., 1989)

1.3.4 Θρεπτική αξία

Η υποβάθμιση της ποιότητας της πρωτεΐνης σχετίζεται με την αντίδραση Maillard, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για τα προϊόντα δημητριακών και το γάλα κατά τη διαδικασία της θέρμανσης. Συνήθως, το βασικό αμινοξύ που έχει μια επιπλέον αμινομάδα, π.χ η λυσίνη, είναι πιο ευπαθή. Εάν το αμινοξύ αυτό έχει ήδη μειωμένη θρεπτική αξία, τότε η επίδραση της αντίδρασης Maillard στην ποιότητα της πρωτεΐνης είναι ουσιώδης. Αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα κατά το μαγείρεμα κρέατος ή ψαριών καθώς αυτά είναι πλούσια σε πρωτεΐνες. Η μείωση στην ποιότητα των πρωτεϊνών αποτελεί πρόβλημα για τα δημητριακά, τα μπισκότα, το ψωμί που υπόκεινται σε διαδικασίες θέρμανσης και αφυδάτωσης καθώς οι υδατάνθρακες κυριαρχούν έναντι των πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα είναι ιδιαίτερα χαμηλά σε αυτού του είδους τα τρόφιμα.

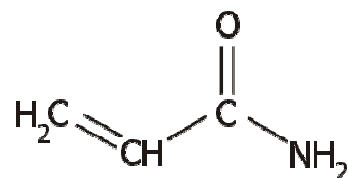
1.3.5 Τοξικές επιδράσεις

Οι πιθανότητες για να είναι παράγοντες καρκινογόνοι ή μεταλλαξογόνοι τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard μελετήθηκαν πριν από 20-25 χρόνια. Με τις μελέτες που ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια, αυτό αποδείχτηκε για διάφορα προϊόντα της αντίδρασης Maillard. Χημικά, αυτές οι ενώσεις ανήκουν στην τάξη των ετεροκυκλικών αμινών και καταμετρούνται περίπου 20 διαφορετικά είδη. Τα περισσότερα από αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί για πιθανά καρκινογενή τρόφιμα (*group 2B*) σύμφωνα με το διεθνή οργανισμό έρευνας του καρκίνου (*International Agency for Research in Cancer, IARC*). Οι ετεροκυκλικές ενώσεις προέρχονται από τα ελεύθερα αμινοξέα. Η αντίδραση Maillard ή η πυρόλυση είναι μηχανισμοί που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των ετεροκυκλικών αμινών.

Η απόδοση των αμινών αυτών αυξάνεται με αύξηση του χρόνου θέρμανσης και της θερμοκρασίας ιδιαίτερα πάνω από τους 150 °C. Η απόδοση αυξάνει και με την ενεργότητα νερού, όταν δηλαδή αυτή αγγίζει τη βέλτιστη τιμή της και σε θερμοκρασία 200-400 °C. Η μέση ημερήσια έκθεση στις αμίνες είναι 0.5 μg/ ημέρα /άνθρωπο με ένα εύρος 0-20 μg. Επιπλέον οι ετεροκυκλικές ενώσεις σπάνια βρίσκονται στα τρόφιμα που προέρχονται από φυτά (λαχανικά) ακόμα και μετά από μαγείρεμα.

1.4. Ιδιότητες ακρυλαμιδίου

Το ακρυλαμίδιο (2-προπεναμίδιο) με μοριακό τύπο C_3H_5NO και συντακτικό τύπο που απεικονίζεται στην Εικόνα 1.8 είναι ένα άχρωμο και άοσμο κρυσταλλικό στερεό που σχηματίζεται με την υδρόλυση του ακρυλονιτριλίου.



Εικόνα 1.8: Συντακτικός τύπος ακρυλαμιδίου

Μερικές από τις φυσικές του ιδιότητες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Dean, 1999):

Πίνακας 1.1: Φυσικές ιδιότητες ακρυλαμιδίου

Φυσικές ιδιότητες	Τιμές
Μοριακό βάρος	71,08 g/mol
Σημείο τήξης	84,5°C
Σημείο βρασμού	192,6°C
Πυκνότητα (στους 25°C)	1,22 g/cm ³
Μοριακός όγκος (στο κανονικό σημείο ζέσης)	80,8 cm ³ /mol

Έχει πολύ καλή διαλυτότητα στους πολικούς διαλύτες με καλύτερη διαλυτότητα στο νερό όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1.2.

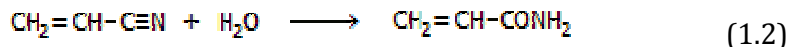
Πίνακας 1.2: Διαλυτότητες του ακρυλαμιδίου σε διάφορους διαλύτες.

Διαλυτότητες	g/100mL
Νερό	215
Μεθανόλη	155
Αιθανόλη	86
Ακετόνη	63
Αιθέρας	12,6
Χλωροφόρμιο	2,7
Βενζόλιο	0,3

1.5. Παραγωγή

Το ακρυλαμίδιο παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1893 στη Γερμανία, ενώ η βιομηχανική παρασκευή του άρχισε το 1954. Στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι η παραγωγή του φθάνει τους 100.000 τόνους ετησίως, ενώ η παγκόσμια φθάνει τους 400.000 τόνους.

Η πρώτη ύλη για την παρασκευή του ακρυλαμιδίου είναι, όπως αναφέρθηκε το ακρυλονιτρίλιο ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CN}$), βιομηχανικό προϊόν το οποίο παρασκευάζεται σε μεγάλες ποσότητες και χρησιμοποιείται για την παρασκευή πολυακρυλικών πολυμερών. Με πλήρη υδρόλυση το ακρυλονιτρίλιο παρέχει ακρυλικό οξύ ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$). Με ελεγχόμενη υδρόλυση του ακρυλονιτριλίου παράγεται ακρυλαμίδιο σύμφωνα με την αντίδραση:



Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία κραμάτων χαλκού. Οι σχετικά υψηλές απαιτούμενες θερμοκρασίες (80-140 °C) οδηγούν σε μερικό πολυμερισμό του προϊόντος, όπως επίσης και στο σχηματισμό σημαντικών ποσοτήτων ακρυλικού οξέος.

Σήμερα έχει αρχίσει να κατακτά έδαφος η ενζυμική υδρόλυση του ακρυλονιτριλίου, που θεωρείται αποδοτικότερη και περιβαλλοντικά ασφαλέστερη. Χρησιμοποιείται το ένζυμο νιτριλοϋδρατάση (nitrile hydratase) που καταλύει την υδρόλυση των νιτριλίων προς τα αντίστοιχα αμίδια ($\text{RCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCONH}_2$). Πρόσθετο πλεονέκτημα της ενζυμικής μεθόδου είναι το ότι το προϊόν περιέχει μόλις ίχνη του ανεπιθύμητου ακρυλικού οξέος (0,02 %).

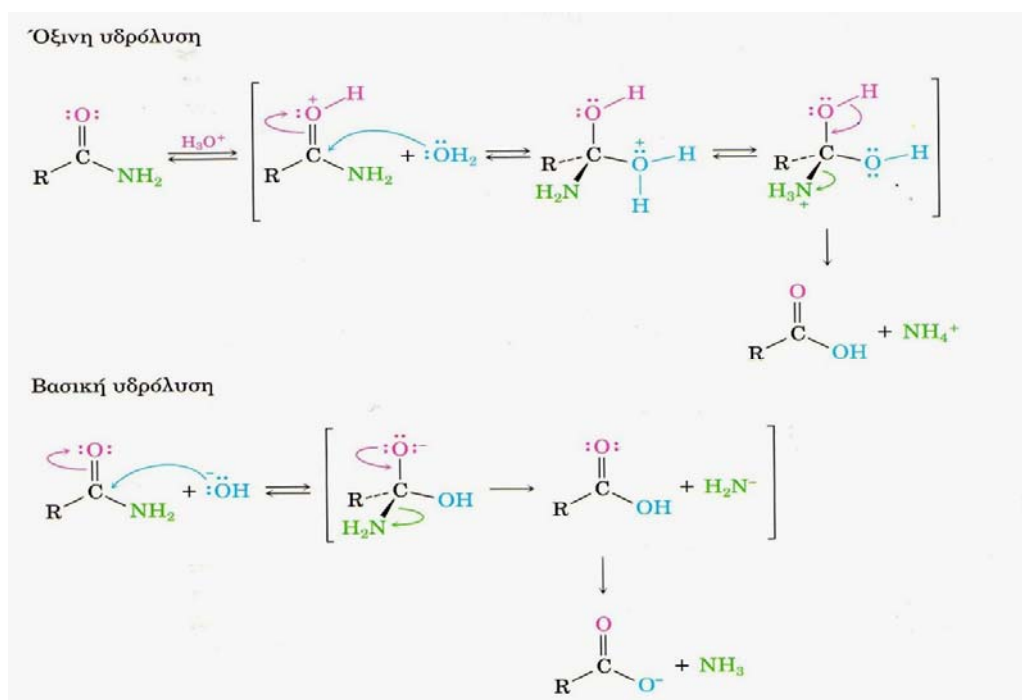
1.6. Αντιδράσεις του ακρυλαμιδίου

Κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ή όταν θερμαίνεται πολυμερίζεται με έκλυση θερμότητας γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε έντονη αντίδραση πολυμερισμού. Το ακρυλαμίδιο μπορεί να πολυμερισθεί και με χημικά μέσα, όπως π.χ. με επίδραση υπεροξειδίων και άλλων οξειδωτικών ουσιών. Για να

αποφευχθεί ο πολυμερισμός του πρέπει να φυλάσσεται σε ξηρό, σκοτεινό και ψυχρό μέρος.

Το ακρυλαμίδιο είναι τοξική ουσία, μπορεί να απορροφηθεί από το δέρμα και να προκαλέσει έντονο ερεθισμό και θα πρέπει να καταβάλλεται προσοχή κατά τη χρήση του.

Όπως όλα τα αμίδια, το ακρυλαμίδιο υφίσταται υδρόλυση προς σχηματισμό ακρυλικού οξέος και αμμωνίας όταν θερμανθεί σε υδατικό διάλυμα οξέος ή βάσης (Εικόνα 1.9). Η βασική υδρόλυση των αμιδίων πραγματοποιείται με πυρηνόφιλη προσθήκη του OH⁻ στην καρβonyλομάδα του αμιδίου, ακολουθούμενη από απόσπαση του αμιδικού ιόντος (NH₂⁻). Η αντίδραση όξινης υδρόλυσης πραγματοποιείται με πυρηνόφιλη προσθήκη νερού στο πρωτονιωμένο αμίδιο ακολουθούμενη από αποβολή αμμωνίας (McMurry, 2004).



Εικόνα 1.9: Όξινη και βασική υδρόλυση των αμιδίων

Οι αντιδράσεις του ακρυλαμιδίου πραγματοποιούνται κυρίως μέσω του διπλού δεσμού της μοριακής του δομής ή της αμινομάδας. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου για παράδειγμα πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης ελεύθερων ριζών με το διπλό δεσμό. Το ακρυλαμίδιο μπορεί επίσης να αντιδράσει ως ηλεκτρονιόφιλο με προσθήκη 1,4 σε πυρηνόφιλα μόρια όπως ομάδες SH⁻ ή και

NH₂ βιομορίων. Στο ανθρώπινο σώμα, το ακρυλαμίδιο μπορεί να μεταβολιστεί σε γλυκιδαμίδιο (glycidamide), ένα αντιδρών που σχηματίζεται μέσω της εποξειδωσης του διπλού δεσμού και θεωρείται ότι προκαλεί μεταλλάξεις και επάγει τη δημιουργία καρκίνου ή και να σχηματίσει υποδοχές στο μόριο της αιμογλοβίνης, που χρησιμοποιείται συχνά ως μέσο μέτρησης της έκθεσης σε ακρυλαμίδιο.

Έχει υψηλή κινητικότητα στο έδαφος και στα υπόγεια ύδατα και είναι βιοδιασπώμενο.

1.7. Χρήσεις

Χρησιμοποιείται σαν συνδετικό υλικό στο σκυρόδεμα και στη σύνθεση πολυμερών καθώς και σε τζελ. Τα πολυμερή και συμπολυμερή του ακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία χαρτιού και κλωστοϋφαντουργίας για κροκίδωση στην επεξεργασία των υγρών υδατικών αποβλήτων, ως βελτιωτικά εδάφους, στην επεξεργασία μεταλλευμάτων καθώς και σε καλλυντικά. Τα τζελ του πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακές έρευνες για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων συστατικών μέσω ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα το πολυμερές του χρησιμοποιείται στη συσκευασία τροφίμων.

1.8. Τρόποι σχηματισμού – Μηχανισμοί

1.8.1. Ακρυλαμίδιο και αντίδραση Maillard

1.8.1.1. Ασπαραγίνη

Έχει διαπιστωθεί ότι το αμινοξύ που συμβάλλει περισσότερο στην ανάπτυξη του ακρυλαμιδίου είναι η ασπαραγίνη. Μελέτες με φασματομετρία μάζας έδειξαν ότι τα τρία άτομα άνθρακα και το άτομο του αζώτου του ακρυλαμιδίου προήλθαν όλα από την ασπαραγίνη (Zyzak et al., 2003). Παρόμοια μελέτη έκαναν και οι Taeymans et al. (2004) καθώς και οι Stadler et al. (2002), οι οποίοι χρησιμοποιώντας επισημασμένα σάκχαρα και την 15-N ασπαραγίνη απέδειξαν ότι ο σκελετός του ακρυλαμιδίου αποτελείται αποκλειστικά από

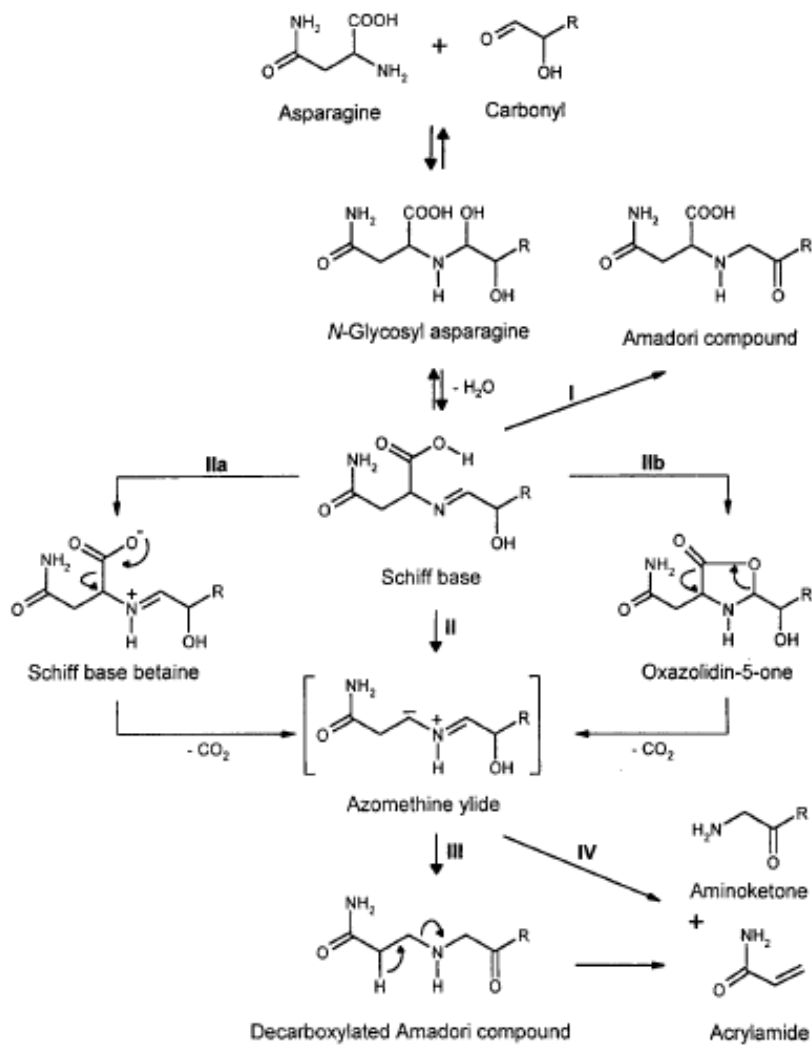
άτομα του μορίου της ασπαραγίνης και όχι από τα αντίστοιχα σάκχαρα. Στην Εικόνα 1.10 παρουσιάζονται τα επίπεδα περιεχόμενης ασπαραγίνης σε διάφορα τρόφιμα.

Εικόνα 1.10: Επίπεδα περιεχόμενης ασπαραγίνης σε τρόφιμα (Friedman, 2003)

food	asparagine ^a (mg/kg)
almonds, 19 cultivars	980–6410
apples, fresh pulp, 5 cultivars	315–588
apple juice	323
asparagus, dry	11000–94000
beans, green pods, dry	3840
broccoli, whole, dry	1920
broccoli, florets, fresh	578
broccoli, stems, fresh	189
cassava, processed, dry	10
cauliflower, fresh	54–1060
cocoa powder, unroasted	309
cocoa, roasted (125°C, 3 min)	145
cocoa, roasted (135°C, 3 min)	94
grape juice	4
lentils, dry	1900–6200
meat, bovine	0.4
meat, pork	11
pineapple juice	247
potatoes, fresh, 4 varieties	2500–3500
potatoes, fresh	1703–2581
potatoes, dry	580–3300
potatoes, dry	7700
rice, milled	29
rice, bran	282
rice, germ	236
spinach, dry	460–1470
wheat grain	1540
wines	0.67–27

1.8.1.2. Προτεινόμενος μηχανισμός ασπαραγίνης – γλυκόζης μέσω Maillard

Το 2005 οι Blank et al. με τα πειράματα τους επιβεβαίωσαν τον ρόλο των ενδιάμεσων προϊόντων των αρχικών σταδίων της αντίδρασης Maillard για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, δηλαδή του N-γλυκοζίτη που παράγεται από την ασπαραγίνη και τα σάκχαρα (Stadler et al. 2003), της αντίστοιχης αποκαρβονυλομένης βάσης Schiff (Zyzak et al., 2003) και του προϊόντος Amadori (Yaylayan et al., 2003). Πιο αναλυτικά, στηριζόμενοι στο μηχανισμό που πρότειναν οι Stadler et al. το 2004 (Εικόνα 1.11), περιγράφουν την διαδικασία ως εξής:



Εικόνα 1.11: Μηχανισμός παραγωγής του ακρυλαμιδίου από ασπαραγίνη και μία καρβονυλομάδα (Stadler et al., 2004)

Το πρώτο κρίσιμο βήμα είναι η αντίδραση μεταξύ ασπαραγίνης και καρβονυλίου, προτιμότερα κάποιου α-υδροξυ-καρβονυλίου, που έχει σαν αποτέλεσμα το συζευγμένο ενδιάμεσο, το οποίο κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας υδρολύεται και σχηματίζει τη βάση Schiff. Εάν η υγρασία βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, και ο N-γλυκοζίτης αλλά και η βάση Schiff είναι σταθερά. Σε υψηλής υγρασίας όμως συστήματα, η βάση Schiff μπορεί να υδρολυθεί στις πρόδρομες ενώσεις της ή να αναδιαταχθεί σε προϊόν *Amadori* (Εικόνα 1.11, path I), που δεν οδηγεί απαραίτητα στο σχηματισμό ακρυλαμιδίου,

αλλά ακόμη και υπό συνθήκες χαμηλή υγρασίας, αυτό είναι το κύριο προϊόν που στη συνέχεια οδηγεί στο σχηματισμό των 1- και 3- δεοξυσοσόνες (deoxyosones). Οι δεοξυσοσόνες στη συνέχεια, αποσυντίθενται και δίνουν χρώμα και *flavor*.

Εναλλακτικά, η βάση Schiff μπορεί να αποκαρβοξυλιωθεί σε ένα ενδιάμεσο προϊόν, το azomethine ylide (Εικόνα 1.11, path II), που παρουσιάζει δύο σταθερές δομές συντονισμού, η μία εκ των οποίων οδηγεί στο αποκαρβοξυλιωμένη ένωση *Amadori* (Εικόνα 1.11, path III). Προϋπόθεση της αντίδρασης αυτής είναι η παρουσία μια υδροξυλομάδας στη β θέση ως προς το άτομο του αζώτου στη βάση του Schiff. Γι' αυτό και αντιδρώντα όπως 1-υδρόξυκετόνες (π.χ. φρουκτόζη, ακετόλη) και 2-υδρόξυαλδεύδες (π.χ. γλυκόζη, 2-υδρόξυ-1-βουτανάλη) παράγουν περισσότερο ακρυλαμίδιο σε σχέση με τις αδικαρβονυλικές ενώσεις.

Η αποκαρβοξυλίωση της βάσης Schiff σε αζωμεθινικό υλίδιο (azomethine ylide) μέσω της διαδρομής (path) IIa, θεωρείται πιο πιθανή σε σχέση με τον κλασικό μηχανισμό αποικοδόμησης Strecker. Εναλλακτικά, μέσω της διαδρομής IIb, η βάση Schiff μπορεί να κυκλοποιηθεί. Τα προϊόντα και των δύο αυτών αντιδράσεων μπορούν να αποκαρβοξυλιωθούν και να οδηγηθούν ξανά στο προϊόν *Amadori* (Εικόνα 1.11, path III).

Στη συνέχεια απελευθερώνεται ακρυλαμίδιο μαζί με μία αμινοκετόνη, μέσω μιας αντίδρασης β-απαλοιφής και διαχωρισμού του δεσμού άνθρακα-αζώτου (Blank et al., 2005).

1.8.2. Σχηματισμός μέσω της ακρολεΐνης

Ένας άλλος τρόπος σχηματισμού του ακρυλαμιδίου είναι μέσω του ακρυλικού οξέος και με την παρουσία αμμωνίας. Το ακρυλικό οξύ παράγεται από την ακρολεΐνη, η οποία μπορεί να σχηματιστεί μέσω της θερμικής οξειδωσης των λιπαρών οξέων ή την θερμική αφυδάτωση της γλυκερόλης. Ο σχηματισμός της ακρολεΐνης αυξάνεται με την αύξηση της ακορεστότητας των ελαίων. Πιο συγκεκριμένα, με την θέρμανση των ελαίων πάνω από το σημείο καπνού τους, η γλυκερόλη υποβαθμίζεται σε ακρολεΐνη. Στον Πίνακα 1.3 φαίνονται τα σημεία καπνού μερικών από τα πιο συνηθισμένα έλαια. Στην αρχή το έλαιο υδρολύεται

σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η ακρολεΐνη παράγεται από την αφυδάτωση της γλυκερόλης.

Πίνακας 1.3: Σημεία καπνού διαφόρων ελαίων (Lingert & Skog 2002)

Έλαιο	Σημείο καπνού (°C)
Φοινικέλαιο	240
Φυστικέλαιο	220
Ελαιόλαδο	210
Ηλιέλαιο & Σόγια	170
Καλαμποκέλαιο	160
Μαργαρίνη	150
Βούτυρο	110

Παράλληλα το ακρυλικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω της αντίδρασης Maillard, είτε από ασπαρτικό οξύ με μια αντίδραση ανάλογη με αυτή που περιγράφεται από τους Yaylayan et al. (2003) για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, είτε μέσω των προϊόντων του μηχανισμού αποικοδόμησης Strecker συμπεριλαμβάνοντας την 2-προπενάλη. Στην τελευταία περίπτωση, η παρουσία του ελεύθερου ασπαρτικού οξέος είναι απαραίτητη για την παραγωγή του ακρυλικού οξέος μαζί με μια πηγή καρβονυλίου.

1.8.3. Σχηματισμός ακρυλαμιδίου μέσω αντιδράσεων αμινοξέων που δεν περιλαμβάνουν την ακρολεΐνη

Υπάρχουν επίσης πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα αμινοξέα (ή και οι πρωτεΐνες) μπορούν να σχηματίσουν ακρυλαμίδιο χωρίς να χρειαστεί να περάσουν από το στάδιο της ακρολεΐνης. Αυτό συμβαίνει στα πλαίσια πολύπλοκων μηχανισμών και αντιδράσεων με πολλά διαφορετικά στάδια, με τη συμμετοχή υδρολύσεων, ανακατατάξεων, αποκαρβοξυλιώσεων και απαμίνωσεων. Μερικά παραδείγματα των διαδρομών αντίδρασης που έχουν προταθεί είναι και η αποκαρβοξυλίωση και η απαμίνωση της ασπαραγίνης καθώς και οι μετασχηματισμοί δεϋδροαλανινών (που σχηματίζονται από τη σερίνη ή την κυστεΐνη).

1.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή του ακρυλαμιδίου

1.9.1. Περιεκτικότητα και είδος αναγωγικών σακχάρων

Η αντίδραση Maillard απαιτεί σάκχαρα. Η αντιδραστικότητα των διαφορετικών σακχάρων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως εξής:

- Όσο μικρότερη είναι η ανθρακική αλυσίδα του σακχάρου, τόσο περισσότερο ακρυλαμίδιο παράγεται. Γενικότερα, όσο μικρότερη είναι η ανθρακική αλυσίδα του σακχάρου, τόσο μεγαλύτερη είναι η απώλεια της λυσίνης και άρα τόσο πιο εύκολο είναι να αντιδράσει. Το μόριο αναγκάζεται να πάρει τη δομή κυκλικής ημιακετάλης και επομένως το καρβονύλιο αντιδρά πιο εύκολα με την α-αμίνη π.χ. της ασπαραγίνης.
- Οι πεντόζες είναι πιο δραστικές από τις εξόζες και τους δισακχαρίτες στην παραγωγικότητα του καστανού χρώματος.
- Οι αλδόζες είναι πιο αντιδραστικές από τις κετόζες και σε υδατικά διαλύματα αλλά και σε περιβάλλοντα χαμηλότερης υγρασίας.
- Συγκρίνοντας ισομερή σάκχαρα, σημαντικό ρόλο παίζει και η στερεοχημεία τους.

Πιο συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών σακχάρων στην παραγωγή του ακρυλαμιδίου. Οι Taeymans et al. το 2004 συγκρίνοντας την αντίδραση της φρουκτόζης, της σουκρόζης και της γλυκόζης με την ασπαραγίνη σε μήτρες άλευρου σίτου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όλα τα σάκχαρα παρήγαγαν ακρυλαμίδιο και την μεγαλύτερη συγκέντρωση την έδωσε η φρουκτόζη (Πίνακας 1.4). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Biedermann et al. (2002c), οι Stadler et al. (2002) καθώς και οι Yaylayan et al. (2003).

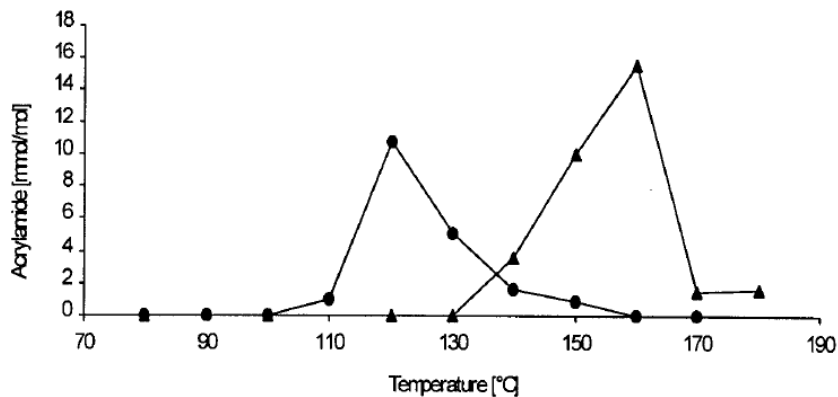
Πίνακας 1.4: Παραγωγή ακρυλαμιδίου από διάφορα σάκχαρα σε μήτρες άλευρου σίτου (Taeymans et al., 2004)

Σάκχαρο	Ακρυλαμίδιο (μg)
Γλυκόζη	72
Φρουκτόζη	110
Σουκρόζη	92

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι για παράδειγμα σε δείγματα πατάτας, η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της γλυκόζης ή της φρουκτόζης όταν η συγκέντρωσή τους παραμένει κάτω από περίπου 3%.

1.9.2. Θερμοκρασία και χρόνος

Η εξάρτηση των χημικών αντιδράσεων από τη θερμοκρασία εκφράζεται συνήθως με την ενέργεια ενεργοποίησης της εξίσωσης Arrhenius. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της, τόσο περισσότερο εξαρτάται ο ρυθμός της αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Οι ενέργειες ενεργοποίησης για την αντίδραση Maillard κυμαίνονται από 10 έως 160 kJ/mol και εξαρτώνται εκτός από άλλα και από το pH και την ενεργότητα του νερού του συστήματος στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση.

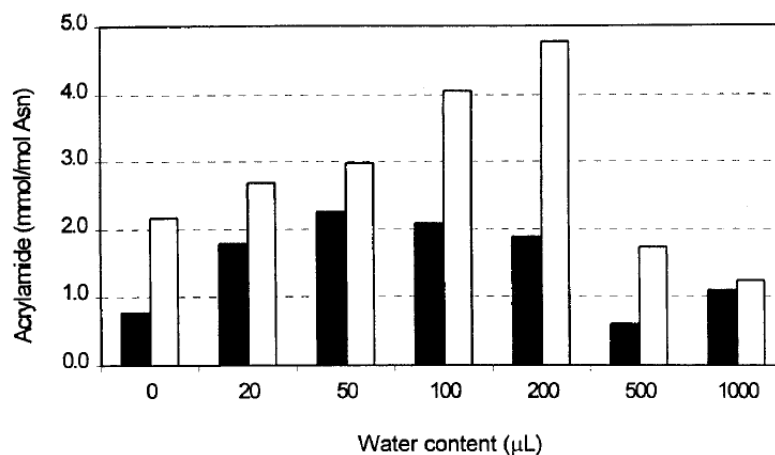


Εικόνα 1.12. Σχηματισμός ακρυλαμιδίου κατά τη θέρμανση ισομοριακού μίγματος ασπαραγίνης και γλυκόζης για 5 (●) και 60 (▲)λεπτά.

1.9.3. Υγρασία και ενεργότητα νερού (a_w)

Το νερό έχει διπλό ρόλο στην αντίδραση Maillard. Συμμετέχει και ως αντιδρών αλλά και ως μεταφορικό μέσο των υπόλοιπων αντιδρώντων. Στα αρχικά στάδια της αντίδρασης, 3 mol νερού σχηματίζονται για κάθε mol υδρογονάνθρακα. Επομένως η αντίδραση δεν ευνοείται σε περιβάλλοντα υψηλής ενεργότητας νερού. Το νερό μπορεί να καταστέλλει την αρχική αντίδραση παραγωγής της γλυκοζυλαμίνης, αλλά ενισχύει αργότερα την απαμίνωση στην αντίδραση παραγωγής του ακρυλαμιδίου. Αντίθετα, σε περιβάλλοντα πολύ χαμηλής υγρασίας, τα αντιδρώντα έχουν πολύ χαμηλή κινητικότητα και γι' αυτό παρεμποδίζεται η αντίδραση.

Οι μελέτες που έγιναν σε συστήματα μοντέλων για την ιδανική συγκέντρωση νερού, την ενεργότητα νερού αλλά και τη σχετική υγρασία δίνουν αποτελέσματα που εξαρτώνται από τα αντιδρώντα αλλά και από τους δείκτες που χρησιμοποιούμε για την αντίδραση Maillard (είτε την απώλεια της λυσίνης είτε την ένταση της αμαύρωσης). Τελικά, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ιδανική ενεργότητα βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 0,3 και 0,7 (Eichner & Karel, 1972).



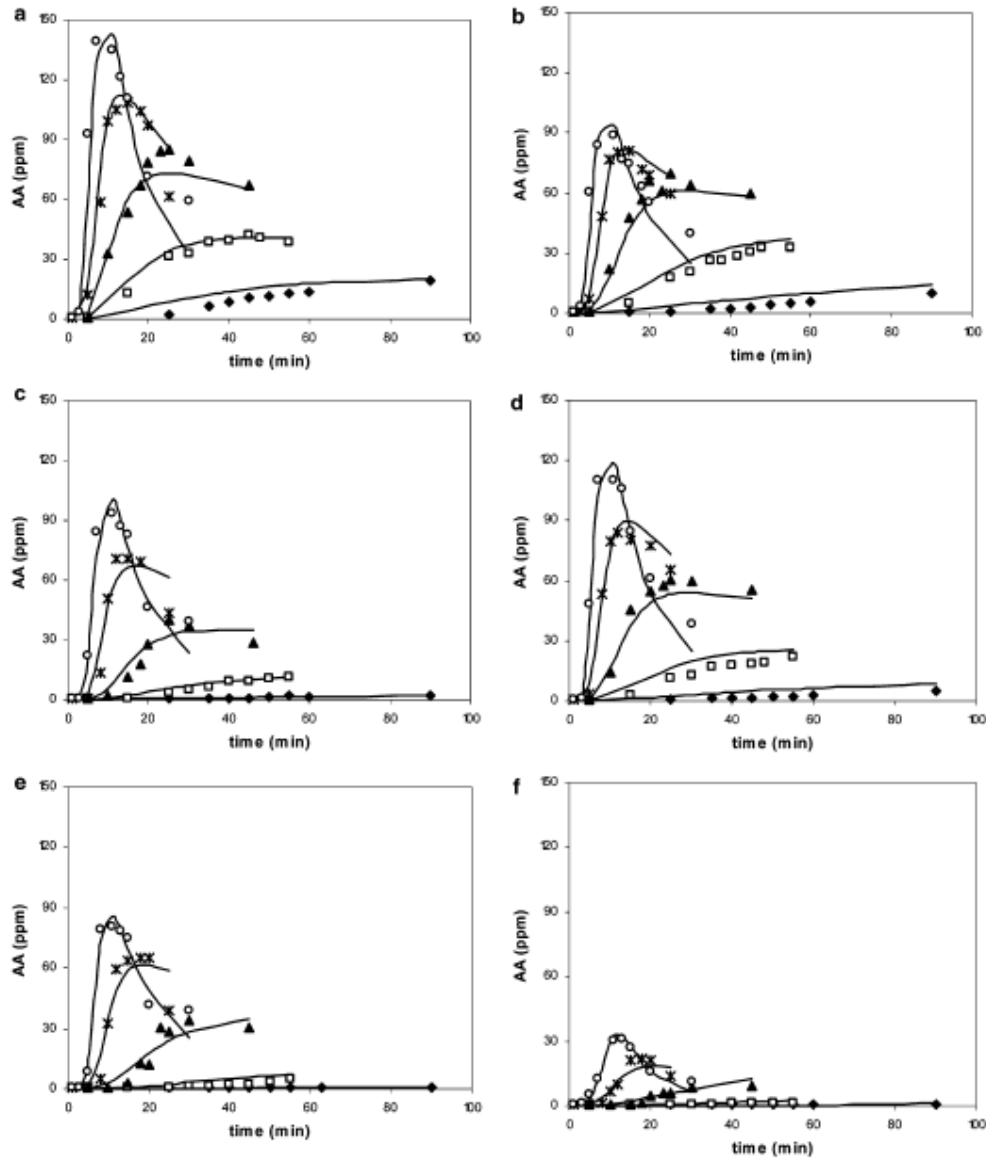
Εικόνα 1.13: Σχηματισμός ακρυλαμιδίου σε συστήματα ασπαραγίνης - γλυκόζης (μαύρες μπάρες) ή φρουκτόζης (άσπρες μπάρες) ως συνάρτηση της υγρασίας (180°C, 5min) (Blank et al., 2005)

1.8.4. pH

Ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το pH όπως ακριβώς και η αντίδραση Maillard. Το pH επηρεάζει τόσο την αντιδραστικότητα των σακχάρων όσο και των αμινομάδων. Το υψηλό pH ευνοεί την μορφή ανοιχτής αλυσίδας του σακχάρου και την μη πρωτονιομένη μορφή της αμινομάδας. Το προτεινόμενο ιδανικό pH είναι μεταξύ 7-8 (Brown, 2003; Rydberg et al., 2003). Σύμφωνα με μελέτη των Jung et al., (2003), ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου μειώνεται κατά 99 % σε σύστημα ασπαραγίνης - γλυκόζης με μείωση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος των φωσφορικών από 7 σε 4. Με τη μείωση του pH οι ελεύθερες μη πρωτονιομένες αμινομάδες της ασπαραγίνης μετατρέπονται σε πρωτονιομένες αμίνες (-NH₃⁺) και έτσι μπλοκάρεται ο σχηματισμός της βάσης Schiff, που είναι ένα βασικό βήμα για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου.

Οι Jung et al. (2003) έδειξαν ότι χαμηλώνοντας το pH, εμποτίζοντας ψητά ή τηγανητά τσιπς καλαμποκιού και τηγανιτές πατάτες σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 - 0,2 % και 1 - 2 %, αντίστοιχα, μειώθηκαν τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στο προϊόν. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και από τους Pedreschi et al. (2004) που εμπότισαν σε διαλύματα 1 και 2 % κιτρικού οξέος φέτες από πατάτες οι οποίες στη συνέχεια τηγανίστηκαν στους 150 °C. Από τα δείγματα που εμβάπτιστηκαν σε κιτρικό οξύ δεν φάνηκε να επηρεάζονται η ασπαραγίνη ή τα σάκχαρα, επομένως η μείωση του ακρυλαμιδίου αποδίδεται κυρίως στην ελάττωση του pH. Παρόλα αυτά, όταν η θερμοκρασία τηγανίσματος ανέβηκε στους 170 και 190 °C, το κιτρικό οξύ δεν φάνηκε να επηρεάζει το περιεχόμενο ακρυλαμίδιο.

Ένα μειονέκτημα της εμβάπτισης τροφίμων σε διάλυμα κιτρικού οξέως είναι η πιθανή όξυνση ή αλλαγή χρώματος και υφής αν δεν ακολουθηθεί πιστά μια συγκεκριμένη διαδικασία. Επίσης, τα τηγανιτά σκευάσματα μπορεί να υποβαθμιστούν ποιοτικά (ταγγισμός).



Εικόνα 1.14: Σχηματισμός του ακρυλαμιδίου ως συνάρτηση του χρόνου θέρμανσης στους 120(♦), 140(□), 160(▲), 180(x) και 200°C(○) σε ισομοριακό διάλυμα ασπαραγίνης - γλυκόζης (0,1M) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος (0,05M) σε pH 8 (a), 6(b), και 4(c) ή σε ρυθμιστικό κιτρικού οξέος σε pH 8(d), 6(e) και 4(f) (De Vleeschouwer et al., 2006)

1.9.5. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες

Από μετρήσεις ακρυλαμιδίου σε διάφορα τρόφιμα είναι φανερό ότι οι ποσότητες αυτού σε προϊόντα κρέατος είναι συγκριτικά πολύ μικρότερες. Αυτό οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων όπως ότι είναι τρόφιμα υψηλής υγρασίας, ότι περιέχουν σχετικά πιο μικρή ποσότητα ασπαραγίνης και ότι έχουν πολλές πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέεται το ακρυλαμίδιο μετά την παραγωγή του. Ο

πίνακας 1.5 συνοψίζει την παραγωγή ακρυλαμιδίου σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων με την προσθήκη ασπαραγίνης – γλυκόζης.

Πίνακας 1.5: Επεξεργασία στους 200°C για 30 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου είναι ανά g δείγματος (Biedermann et al., 2002c).

Μήτρα	Προσθήκη γλυκόζης, ασπαραγίνης (mmol γλυκόζης , mmol ασπαραγίνης)	Ακρυλαμίδιο (μg)
Πολτός βοδινού	-	0,1
Πολτός βοδινού	0,25, 0,25	14
Πολτός βοδινού	0,5, 0,5	6
Πολτός βοδινού	0,5, 0,5	12
Πουρές πατάτας	0,5, 0,5	30
Άλευρο σίτου	0,5, 0,5	62

Παράλληλα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι με την προσθήκη άλλων αμινοξέων σε συστήματα ασπαραγίνης – γλυκόζης μειώθηκε η παραγωγή ακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της προσθήκης κυστεΐνης και λυσίνης φαίνονται στον Πίνακα 1.6. Οι μετρήσεις έγιναν σε μήτρα πατάτας.

Πίνακας 1.6: Αποτελέσματα μελέτης για το σχηματισμό ακρυλαμιδίου από δείγματα, πατάτας, ασπαραγίνης, και ασπαραγίνης-λυσίνης/κυστεΐνης (Taeymans et al., 2004)

Αμινοξύ	Ακρυλαμίδιο (μg/δοκιμαστικό σωλήνα) ± SD
Δείγμα αναφοράς (μόνο πατάτα)	<0,1
Ασπαραγίνη (0,5 mmol)	46 ± 1
Ασπαραγίνη (1 mmol)	50 ± 16
Ασπαραγίνη (0,5 mmol) + Λυσίνη (0,5 mmol)	34 ± 4
Ασπαραγίνη (0,5 mmol) + Κυστεΐνη (0,5 mmol)	10 ± 4

1.9.6. Προσθήκη αντιοξειδωτικών

Οι Tareke et al. (2003) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη αντιοξειδωτικών (όπως BHT, βιταμίνη E) στο κρέας πριν από το ψήσιμο ενίσχυσαν την παραγωγή του ακρυλαμιδίου, πιθανότατα επειδή

προστάτησαν το ακρυλαμίδιο από αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες. Ταυτόχρονα έχει προταθεί ότι η αυξημένη παραγωγή ακρυλαμιδίου με την προσθήκη ελαίου κατά την θερμική επεξεργασία της πατάτας μπορεί να οφείλεται στα αντιοξειδωτικά του ελαίου. Σαν αποτέλεσμα οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ελαίων μπορεί να σχετίζονται με την διαφορετική τους αντιοξειδωτική δράση.

Αντίθετα, η προσθήκη βοτάνων τύπου δενδρολίβανου σε έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για το τηγάνισμα πατάτας, μείωσε τη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου. Ανάλογη συμπεριφορά παρουσίασε και η προσθήκη ασκορβικού οξέος σε μοντέλο πατάτας.

Επομένως, είναι δύσκολο να αποφασίσει κανείς για τον αν τελικά ουσίες με αντιοξειδωτική δράση μειώνουν ή αυξάνουν τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου είτε σε συστήματα μοντέλα είτε σε πραγματικά τρόφιμα.

1.9.7. Προσθήκη προσθέτων – Ανθρακικό αμμώνιο

Από βιομηχανικές δοκιμές έχει βρεθεί ότι η προσθήκη όξινου ανθρακικού αμμωνίου σε αρτοποιήματα, που χρησιμεύει στο φούσκωμα, ενισχύει την παραγωγή ακρυλαμιδίου. Το ίδιο γεγονός επιβεβαιώνεται και από πείραμα που έγινε σε μήτρα σιτάλευρου. Η παραγωγή ακρυλαμιδίου ενισχύεται γιατί το όξινο ανθρακικό αμμώνιο ευνοεί το σχηματισμό α-δικαρβονυλικών ενώσεων από τη διάσπαση γλυκόζης και φρουκτόζης. Οπότε η επίδραση του NH_4HCO_3 εξαρτάται από είδος και την περιεκτικότητα των αναγωγικών σακχάρων (Amrein, 2007).

Όμως με προσθήκη όξινου ανθρακικού αμμωνίου σε σύστημα μοντέλο γλυκόζης-ασπαραγίνης και γλυκόζης-διαφόρων αμινοξέων (χωρίς μήτρα τροφίμου) δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση (Taeymans, 2004).

1.9.7. Συνθήκες αποθήκευσης

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τις συνθήκες αποθήκευσης των τροφίμων και πώς αυτές επηρεάζουν το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Μία χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή της ψύξης πατάτας σε θερμοκρασία 8-10°C. Στην περίπτωση αυτή προκαλείται μια έντονη αύξηση στην

περιεκτικότητα σε αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία προέρχονται από το περιεχόμενο άμυλο και η δράση αυτή καλείται «low temperature sweetening» ενώ όμως τα απελευθερωμένα σάκχαρα προστατεύουν την πατάτα από την ψύξη, οδηγούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου κατά την θέρμανση. Ακόμη και η ψύξη για μικρό χρονικό διάστημα (λιγότερο από πέντε ημέρες) φαίνεται να προκαλεί ανάλογα αποτελέσματα στο παραγόμενο ακρυλαμίδιο.

Όσον αφορά στο φως, φαίνεται να προκαλεί μια αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων στις πατάτες (Biedermann et al., 2002a) και επομένως αύξηση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Επομένως προτείνεται οι πατάτες να αποθηκεύονται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 8°C. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι εφικτό, γιατί η πατάτα είναι ένα προϊόν που αποθηκεύεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα πριν παραδοθεί στον καταναλωτή. Πάνω σε αυτό το θέμα, γίνονται διάφορες μελέτες για τη διατήρηση της πατάτας είτε με κάποια χημική μέθοδο, που δεν είναι όμως επιθυμητή από τον καταναλωτή, είτε με κατάψυξη του προϊόντος που φαίνεται όμως να προκαλεί παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της ψύξης.

Από την άλλη πλευρά, τα δημητριακά μπορούν να αποθηκευτούν για 2-3 χρόνια χωρίς να επέλθει απώλεια τα ποιότητάς τους, υπό την προϋπόθεση η περιεχόμενη υγρασία του καρπού (20-24%) να μειωθεί τουλάχιστον μέχρι 14% (Belitz et al., 1987). Τέλος, δεν έχει αναφερθεί καμία αξιοσημείωτη επίδραση της αποθήκευσης στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου όσον αφορά στα άλευρα.

1.10. Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Οι τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες σύμφωνα με την οδηγία της CIAA για το 2009:

Αγρονομικοί παράγοντες, Συνταγή, Επεξεργασία και τελική προετοιμασία του προϊόντος. Θα αναλύσουμε τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά.

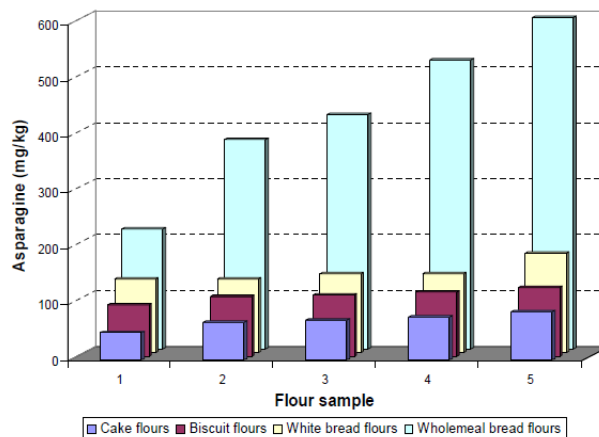
1.10.1. Αγρονομικοί παράγοντες

1.10.1.1. Αναγωγικά σάκχαρα

Μία συνήθης πρακτική σε βιομηχανική κλίμακα είναι η μείωση του ακρυλαμιδίου μέσω της ελάττωσης των αναγωγικών σακχάρων των τροφίμων. Τα σάκχαρα αυτά αποτελούν ένα από τα βασικά συστατικά για την παραγωγή του ακρυλαμιδίου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων σχετίζεται με τη συγκέντρωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου στα προϊόντα ειδικά αν αυτά περιέχουν το συνδυασμό ασπαραγίνης – φρουκτόζης σε αναλογία μεγαλύτερη του 2.

Όσον αφορά στη μείωση του περιεχόμενου ακρυλαμιδίου στις τηγανιτές πατάτες και στα τσιπς, επιλέγονται ήδη σε πρώτο επίπεδο, ποικιλίες πατάτας με χαμηλή συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων. Στη συνέχεια, ρυθμίζονται οι συνθήκες αποθήκευσης πριν την επεξεργασία του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία αποθήκευσης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 6°C για την αποφυγή του φαινομένου «cold sweetening», να χρησιμοποιούνται χημικά λιπάσματα (GAP) και να προσαρμόζεται η θερμοκρασία για παράδειγμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε μια περίοδο λίγων εβδομάδων. Επίσης, η συγκομιδή γίνεται όταν οι πατάτες είναι ώριμες γιατί τότε η συγκέντρωση των σακχάρων είναι μικρότερη. Αυτές οι πρακτικές εφαρμόζονται ήδη στη βιομηχανία ενώ υπάρχουν και άλλες που μελετώνται ακόμη, όπως η καλλιέργεια νέων ποικιλιών πατάτας με χαμηλότερα επίπεδα αναγωγικών σακχάρων ή με περιορισμένο το φαινόμενο cold sweetening. Περαιτέρω γίνεται προσπάθεια βελτιστοποίησης των γεωργικών πρακτικών για τη μείωση των σακχάρων και της ασπαραγίνης.

Από την άλλη πλευρά, στα δημητριακά η ασπαραγίνη είναι αυτή που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την παραγωγή του ακρυλαμιδίου. Από μελέτες που έγιναν σε τέσσερις ποικιλίες σίτου το 2004 δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και σουκρόζη) και της παραγωγής του ακρυλαμιδίου. Η επιλογή των αλεύρων που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα μπορεί να είναι ευνοϊκή για τη μείωση του ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα όπου η συνταγή δεν περιλαμβάνει προσθήκη αναγωγικών σακχάρων (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15: Επίπεδα ασπαραγίνης σε τέσσερα διαφορετικά εμπορικά άλευρα (Homlet et al., 2005)

1.10.1.2. Ασπαραγίνη

Η ασπαραγίνη ενώ είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη των φυτών είναι επίσης ένας καθοριστικός παράγοντας στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου.

Στις πατάτες η ασπαραγίνη είναι το αμινοξύ με τη μεγαλύτερη αφθονία, αποτελώντας το 20-60 % των ολικών ελεύθερων αμινοξέων. Τα επίπεδα της ασπαραγίνης δεν σχετίζονται με τα επίπεδα των αναγωγικών σακχάρων. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη τεχνική μείωσης των επιπέδων της ασπαραγίνης κατά την καλλιέργεια της πατάτας. Εξετάζεται όμως εργαστηριακά, η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων βολβών όπου η ασπαραγίνη θα παράγεται σε πολύ μικρές ποσότητες και θα έχουν συγκρίσιμες οργανοληπτικές ικανότητες με τις φυσικές.

Στα δημητριακά και γενικότερα στα άλευρα, η μείωση της ασπαραγίνης φαίνεται ακόμη πιο δύσκολη, αφού σε όσες μελέτες έχουν γίνει είτε σε άλευρα σίτου είτε σε δημητριακά ολικής άλεσης φαίνεται να επηρεάζονται τελικά αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Ακόμη είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης της ασπαραγίνης στη διατροφή των καταναλωτών.

1.10.2. Πρόσθετα κατά την Παρασκευή τροφίμων

1.10.2.1. Παράγοντες φουσκώματος

Η αντικατάσταση του ανθρακικού αμμωνίου σε προϊόντα όπως το ψωμί, τα μπισκότα και τα δημητριακά με εναλλακτικά πρόσθετα για φούσκωμα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Αυτή η τεχνική έχει ήδη εφαρμοστεί σε προϊόντα όπως είναι τα μπισκότα και παρόλο που αρκετές φορές επιφέρει αλλαγές στο flavor, την υφή και το χρώμα, είναι μια αλλαγή που έχει γίνει δεκτή από το καταναλωτικό κοινό. Παρόλα αυτά για την επίτευξη του βέλτιστου φουσκώματος, υφής, χρώματος, γεύσης χρησιμοποιούνται συνδυασμοί NH_4HCO_3 , NaHCO_3 και μέσου οξύνισης. Το μέσο οξύνισης εκτός από την ενίσχυση απελευθέρωσης CO_2 μειώνει και το pH οπότε ενισχύει την μείωση.

1.10.2.2 Δευτερεύοντα συστατικά

1.10.2.2.1 Προσθήκη γλυκίνης ή ιόντων ασβεστίου

Έχει παρουσιαστεί μείωση του ακρυλαμιδίου με την προσθήκη αμινοξέων όπως η γλυκίνη ή με την απενεργοποίηση της ασπαραγίνης χρησιμοποιώντας άλατα ασβεστίου. Τα αμινοξέα μπορούν είτε να δράσουν ανταγωνιστικά με την ασπαραγίνη, είτε να αντιδράσουν με το ακρυλαμίδιο μέσω της αντίδρασης Michael.

Ένα παράδειγμα είναι αυτό της προσθήκης ενός συνδυασμού κιτρικού οξέος – πατάτας (περίπου 0,39% το καθένα στη συνταγή), που επέφερε μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Ακόμη, η εφαρμογή σε ένα σνακ πατάτας περίπου 1% χλωριούχου ασβεστίου απέδωσε μείωση του ακρυλαμιδίου που σε ορισμένες περιπτώσεις έφτασε το 80%, ανάλογα με το σχεδιασμό του προϊόντος.

Αντίθετα, καμία από τις δύο τεχνικές δεν απέδωσε ανάλογα αποτελέσματα στις τηγανιτές πατάτες. Θα πρέπει να ανεφερθεί όμως ότι η προσθήκη μεγάλης ποσότητας γλυκίνης ή ασβεστίου προκαλεί αλλαγή στα επίπεδα μαυρίσματος αλλά και πικρή γεύση, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μη αποδεκτό προϊόν από τους καταναλωτές. Αυτό συνέβη στις δοκιμές που έγιναν για χρήση των δύο μεθόδων σε μπισκότα και ψωμί με τζίντζερ, τα οποία δεν μπόρεσαν να γίνουν εμπορικά. Ακόμη θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην ποσότητα ασβεστίου που προστίθεται στην διατροφή των καταναλωτών.

1.10.2.2 Προσθήκη μέσων οξύνισης και Βιταμίνης C

Η χρήση μέσων οξύνισης (οξικό ή κιτρικό οξύ) και βιταμίνης C στις τηγανιτές πατάτες αποδείχθηκε ως μία μέθοδος πολλά υποσχόμενη για τη μείωση του ακρυλαμιδίου σε εργαστηριακό επίπεδο. Παρόλα αυτά θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη συνταγή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξινή γεύση στο προϊόν.

1.10.2.3 pH

Η προσθήκη κιτρικού ή ασκορβικού οξέος όπως αναφέρθηκε, μειώνει το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου και χρησιμοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα σε κάποια τυποποιημένα προϊόντα όπως τα τσιπς. Παρόλα αυτά, η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων οξέων έχει βρεθεί ότι μπορεί να δημιουργήσει ξινή γεύση στο τρόφιμο. Στα τρόφιμα της ευρύτερης κατηγορίας δημητριακών (ψωμί, μπισκότα κ.α.) η προσθήκη οργανικών οξέων έχει εφαρμοσθεί σε πειραματικό επίπεδο μόνο και το ποσοστό της μείωσης του ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το εκάστοτε τρόφιμο.

1.10.2.4 Αραίωση

Μία ακόμη τεχνική που χρησιμοποιείται και σε βιομηχανική κλίμακα είναι η μερική αντικατάσταση συστατικών που ενισχύουν το σχηματισμό του

ακρυλαμιδίου. Για παράδειγμα, σε προϊόντα πατάτας έχει περιοριστεί η παραγωγή του ακρυλαμιδίου με μείωση των επιπέδων ασπαραγίνης μέσω αντικατάστασης μέρους της συνταγής με σιτάρι, καλαμπόκι ή ρύζι. Ακόμη, με τη μείωση της αναλογίας επιφάνειας προς τον όγκο του προϊόντος της πατάτας ή του ψωμιού μπορούν να μειωθούν τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου.

1.10.3 Επεξεργασία

1.10.3.1 Ζύμωση

Μελέτες έδειξαν ότι η χρήση παλαιωμένης ζύμης ή ζύμης που ζυμώνεται για δεύτερη φορά μπορεί να προκαλέσει αύξηση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου ακόμη και όταν αυτή έχει παραμείνει χωρίς επεξεργασία για 3 ώρες (περίπου 35 % αύξηση). Μία θεωρία είναι ότι με το πέρασμα του χρόνου αυξάνεται η συγκέντρωση της ελεύθερης ασπαραγίνης και άρα μετά το ψήσιμο αυξάνονται και τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου. Παρόλα αυτά, σε βιομηχανική κλίμακα δεν έχει αποδειχθεί ότι η επαναχρησιμοποίηση της ζύμης προκαλεί αύξηση στα επίπεδα του ακρυλαμιδίου.

1.10.3.2 Θερμικό φορτίο, έλεγχος της θερμοκρασίας και περιεχόμενη υγρασία

Τα επίπεδα του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και του χρόνου επεξεργασίας του τροφίμου. Είναι σκόπιμο επομένως, όπου αυτό είναι επιτρεπτό, να ελαττώνεται και η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος επεξεργασίας (Claeys et al., 2005). Από την άλλη πλευρά όμως, μελέτες έχουν δείξει ότι το εκτεταμένο ψήσιμο ή τηγάνισμα οδηγεί σε μείωση του περιεχόμενου ακρυλαμιδίου και αυτό έχει μελετηθεί και σε συστήματα μοντέλων (Knol et al., 2010; De Vleeschouwer et al., 2008) αλλά και σε πραγματικά τρόφιμα.

Το θερμικό φορτίο καθώς και η περιεχόμενη υγρασία είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες ελέγχου της παραγωγής ακρυλαμιδίου για αρκετές κατηγορίες τροφίμων όπως είναι τα τσιπς, οι τηγανιτές πατάτες, το ψωμί, τα δημητριακά ακόμη και ο καφές.

Μελέτες που έγιναν στην Αγγλία για την παραγωγή ψωμιού έδειξαν πως με κάποια απλά μέτρα μπορεί να επιτευχθεί μείωση του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου. Αυτά περιλαμβάνουν την αποφυγή δημιουργίας έντονης κρούστας και έντονου χρώματος, την επιλογή χύτρας ή τηγανιών με καπάκι για το ψήσιμο και την χρήση φούρνων μειούμενης θερμοκρασίας.

Παράλληλα, η εφαρμογή τεχνικών όπως υπέρυθρη ακτινοβολία ή αέρα για το ψήσιμο, απέδωσε μείωση του ακρυλαμιδίου που έφτασε μέχρι το 60% σε κέικ, ενώ ταυτόχρονα δεν μεταβλήθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ακόμη, η χρήση φούρνων ατμού στα τελευταία στάδια του ψησίματος απέδωσε μείωση 40% στο λευκό ψωμί, με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά να παραμένουν και πάλι σταθερά.

Συγκεκριμένα, για προϊόντα όπως οι τηγανιτές πατάτες κρίνεται απαραίτητο να ρυθμίζει κανείς την περιεχόμενη υγρασία αφού η επιρροή της είναι μεγάλη στην αμαύρωση του τροφίμου καθώς και στην παραγωγή του ακρυλαμιδίου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις νερού, η ενέργεια ενεργοποίησης για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου είναι μεγαλύτερη από αυτή για την αμαύρωση. Αυτό εξηγεί γιατί η τελική φάση του τηγανίσματος είναι κρίσιμη και είναι αυτή που πρέπει να ελέγχεται καλύτερα.

Για την περίπτωση των δημητριακών, ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου συνδέεται και με την περιεχόμενη υγρασία αλλά και με το χρόνο και τη θερμοκρασία ψησίματος. Ένας τρόπος ελάττωσης του θα ήταν εφικτός αν μπορούσαμε να πετύχουμε προϊόντα τα οποία θα ψήνονταν με σταθερή υγρασία, παρόλο που ο χρόνος ψησίματος θα ήταν μεγαλύτερος για να πετύχουμε το επιθυμητό χρώμα.

Αντίθετα, μελέτες που έγιναν στην επεξεργασία του καφέ, δεν έφεραν κάποιο αποτέλεσμα, που να μειώνει τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στο τελικό προϊόν χωρίς να το αλλοιώνει σε τέτοιο βαθμό που να μην γίνεται αποδεκτό από τον καταναλωτή.

1.10.3.3. Προεπεξεργασία

Η διαδικασία της εμβάπτισης (blanching) είναι πλέον μια κοινή μέθοδος για την μείωση του ακρυλαμιδίου στις πατάτες. Με την εμβάπτιση ελέγχονται τα επίπεδα των αναγωγικών σακχάρων. Παράλληλα συνήθως χρησιμοποιείται καιθεικό οξύ αμέσως μετά το blanching, το οποίο δεν επιτρέπει την δυσχρωμία στις άψητες πατάτες και ταυτόχρονα μειώνει το pH, που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ενισχύει την ελάττωση του ακρυλαμιδίου.

1.10.3.4. Ασπαραγινάση

Το ένζυμο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα απέναντι στη μείωση του ακρυλαμιδίου. Πιο συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί σε σύστημα – μοντέλο πατάτας με πολύ καλά αποτελέσματα, με την προϋπόθεση όμως οι συνθήκες pH και θερμοκρασίας να είναι τέτοιες που να επιτρέπουν τη δράση του.

Σε πολλά προϊόντα, όπως μπισκότα, ψωμί και σνακ δημητριακών χρησιμοποιείται ήδη με αποτελέσματα που φτάνουν ως και 90% μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Αντίθετα, η επίδραση της δεν ήταν εξίσου αποτελεσματική στα δημητριακά για πρωινό αφού η περιεχόμενη υγρασία στα προϊόντα αυτά είναι πολύ χαμηλή και δεν επιτρέπει την αντίδραση του ενζύμου σε όλο το τρόφιμο.

Αξιοσημείωτο είναι ότι η νομοθεσία γύρω από τη χρήση της ασπαραγίνης είναι πιο ξεκάθαρη πλέον στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η Δανία και η Γαλλία έχουν εγκρίνει τη χρήση των δύο εμπορικών ενζύμων ασπαραγινάσης σε συγκεκριμένα προϊόντα.

1.10.4. Τελική επεξεργασία

1.10.4.1. Τελικό σημείο χρώματος

Έρευνα του πανεπιστημίου του Ghent έδειξε ότι το χρώμα του τελικού προϊόντος είχε καλύτερη συσχέτιση με το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε σχέση με τα περιεχόμενα αναγωγικά σάκχαρα. Γι' αυτό ενδείκνυται στις συσκευασίες ημι-έτοιμων τροφίμων που θα μαγειρευτούν από τους καταναλωτές, όπως για παράδειγμα στις τηγανιτές πατάτες, να αναγράφονται

ακριβείς οδηγίες για τις συνθήκες μαγειρέματος. Οι βασικές οδηγίες που πρέπει να δίνονται είναι οι εξής: να ψήνονται έως ένα χρυσοκίτρινο χρώμα χωρίς να μαυρίζουν, να ελαττώνεται ο χρόνος μαγειρέματος αν η ποσότητα τροφίμου είναι μικρή και στο τηγάνισμα ως μέγιστη θερμοκρασία είναι οι 175 °C για συγκεκριμένο χρόνο. Περαιτέρω οδηγίες δίνονται με βάση το εκάστοτε τρόφιμο.

Στην περίπτωση του καφέ, το καβούρδισμα μέχρι ένα πιο σκούρο χρώμα δεν θεωρείται μία πιθανή επιλογή, γιατί θα αλλοιωθούν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

1.10.4.2. Οδηγός καταναλωτών

Στις συσκευασίες ημι-έτοιμων τροφίμων που θα μαγειρευτούν από τους καταναλωτές πρέπει να αναγράφονται ακριβείς οδηγίες για τις συνθήκες μαγειρέματος. Οι βασικές οδηγίες που πρέπει να δίνονται είναι οι εξής: να ψήνονται έως ένα χρυσοκίτρινο χρώμα χωρίς να μαυρίζουν, να ελαττώνεται ο χρόνος μαγειρέματος αν η ποσότητα τροφίμου είναι μικρή και στο τηγάνισμα ως μέγιστη θερμοκρασία είναι οι 175°C για συγκεκριμένο χρόνο. Περαιτέρω οδηγίες δίνονται με βάση το εκάστοτε τρόφιμο.

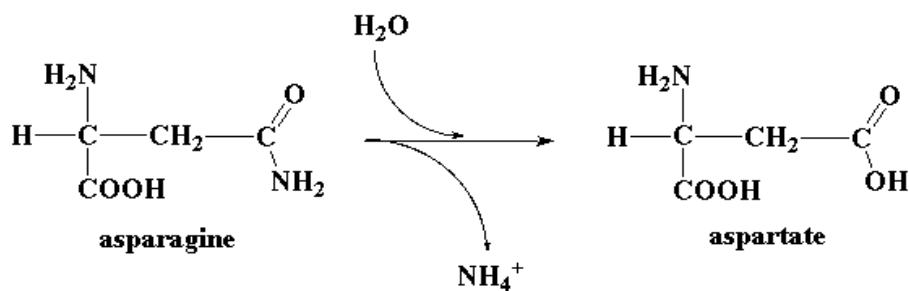
1.10.5. Καταστροφή ή εγκλωβισμός του ακρυλαμιδίου

Εκτός από τις μεθόδους παραγωγής του ακρυλαμιδίου έχουν προταθεί και μέθοδοι καταστροφής του ή περιορισμού του. Ανάμεσα σε αυτές είναι η ενζυμική υδρόλυση του αμιδίου του ακρυλαμιδίου σε ακρυλικό οξύ και αμμωνία. Ένας άλλος τρόπος είναι με τον πολυμερισμό του μονομερούς του ακρυλαμιδίου σε πολυακρυλαμίδιο σε διάφορα τρόφιμα μέσω UV ακτινοβολίας. Τέλος, το ακρυλαμίδιο μπορεί να μειωθεί με αντίδραση του με αμινοξέα που περιέχουν ρίζες SH- ή πρωτεΐνες.

1.11 Χρήση της ασπαραγινάσης για τη μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου

1.11.1 Ιδιότητες της ασπαραγινάσης

Η ασπαραγινάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ασπαραγίνης σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Ο μηχανισμός φαίνεται στην Εικόνα 1.16. Παράγεται από μικροοργανισμούς και συνήθως από *Escherichia coli*. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι ασπαραγινάσης καθένας από τους οποίους χρησιμοποιείται για διαφορετικούς βιομηχανικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς. Η πιο κοινή χρήση της ασπαραγινάσης είναι στην παραγωγή τροφίμων για την μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου σε προϊόντα διατροφής όπως τα αμυλούχα σνακ, οι τηγανιτές πατάτες, τα μπισκότα και το ψωμί, μέσω της μείωσης της περιεχόμενης ασπαραγίνης. Εκτός από την αντίδραση με την ασπαραγίνη, το ένζυμο αυτό δρα μόνο με την γλουταμίνη και κανένα άλλο αμινοξύ.



Εικόνα 1.16: Αντίδραση απαμίνωσης της ασπαραγίνης προς ασπαρτικό οξύ που καταλύεται από το ένζυμο ασπαραγινάση

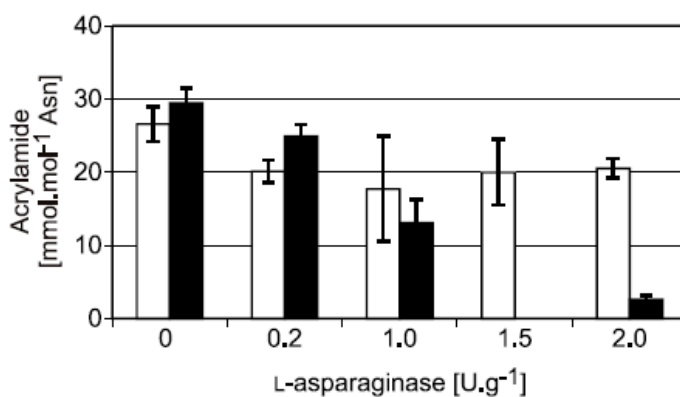
Κοινές εμπορικές ονομασίες της ασπαραγινάσης είναι η Acrylaway και η PreventASe. Ένα διαφορετικό είδος ασπαραγινάσης που διατίθεται επίσης στην αγορά είναι η Elspar και πρόκειται για φαρμακευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL). Σε αντίθεση με άλλους χημικοθεραπευτικούς παράγοντες, μπορεί να χορηγείται με ενδομυϊκή, υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση χωρίς τον φόβο του ερεθισμού των ιστών.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η ασπαραγινάση αποτελεί μία από τις μεθόδους μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα. Χαρακτηριστικό είναι ότι στις

περισσότερες περιπτώσεις έχει πολύ μικρή έως καμία επίδραση στα υπόλοιπα προϊόντα της αντίδρασης Maillard αλλά και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου.

Η δράση της ασπαραγινάσης για την μείωση του ακρυλαμιδίου έχει δοκιμαστεί σε πολλές μελέτες, είτε σε μοντέλα είτε σε πραγματικά τρόφιμα. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι με την μείωση της ασπαραγίνης επιτυγχάνεται τελικά και μείωση του ακρυλαμιδίου, συγκρίνοντας δείγματα που είχαν υποστεί επεξεργασία με το ένζυμο και τυφλά δείγματα. Παρόλα αυτά, η σύγκριση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η ποσοστιαία μείωση της ασπαραγίνης δεν συσχετίζεται άμεσα με την ποσοστιαία μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην επίδραση παραγόντων στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου όπως οι συνθήκες επεξεργασίας αλλά και η συνταγή, που ποικίλουν από τρόφιμο σε τρόφιμο (Hendriksen et al., 2009).

Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν πάνω στη χρήση της ασπαραγινάσης ήταν αυτή των Zyzak et al. το 2003, οι οποίοι χρησιμοποίησαν το ένζυμο σε σνακ πατάτας επεξεργασμένο σε φούρνο μικροκυμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της περιεχόμενης ασπαραγίνης έως 88% ενώ οι τιμές της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου μειώθηκαν κατά 99% σε σχέση με τα δείγματα που δεν είχαν υποστεί την επεξεργασία με το ένζυμο.

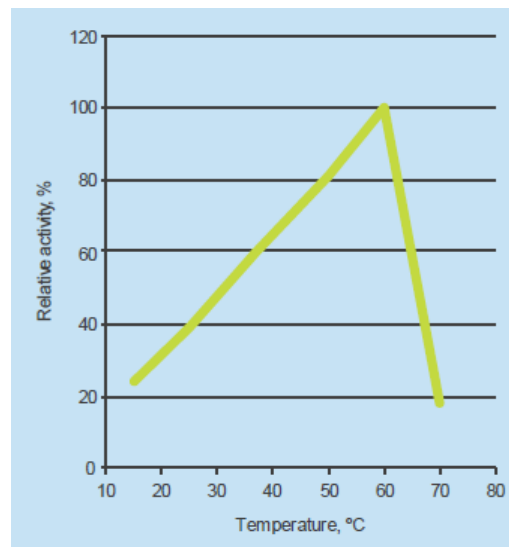


Εικόνα 1.17: Περιεχόμενο ακρυλαμίδιο μετά από θέρμανση στους 180 °C για 20min με διαφορετικές συγκεντρώσεις ασπαραγινάσης στους 20 °C για 60 min (λευκές μπάρες) και στους 37 °C για 30 min (μαύρες μπάρες) για ένα μοντέλο πατάτας (Ciesarová et al., 2006).

1.10.2. Βέλτιστες συνθήκες χρήσης του ενζύμου

Η εταιρεία Novozymes έχει παρουσιάσει την επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην ενεργότητα του ενζύμου. Οι πειραματικές μετρήσεις για την κατασκευή διαγραμμάτων έγιναν σε εργαστηριακές συνθήκες και σε ρυθμιστικά διαλύματα και γι' αυτό μπορεί να μην είναι ακριβείς εάν χρησιμοποιηθούν σε ένα πραγματικό τρόφιμο. Πρέπει να γίνεται κάθε φορά ξεχωριστή δοκιμή για την εφαρμογή του ενζύμου σε ένα νέο προϊόν.

Όσον αφορά στη θερμοκρασία, η επίδραση της φαίνεται στην Εικόνα 1.18. Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης είναι 60 °C.

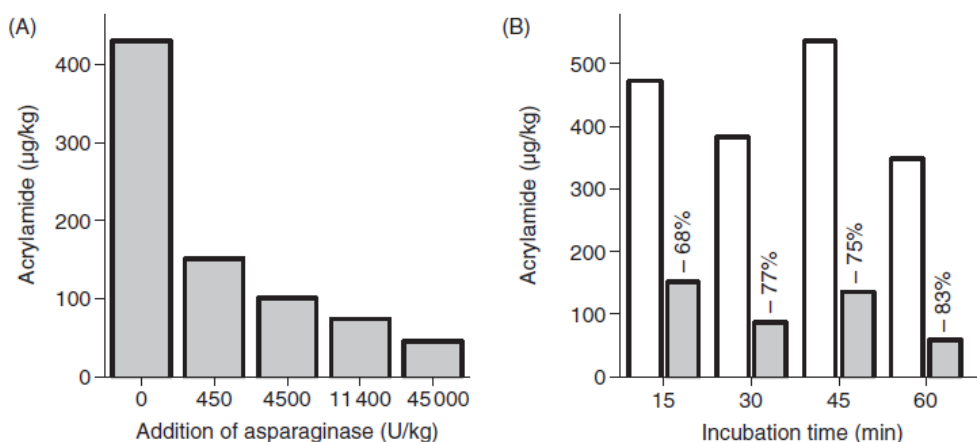


Εικόνα 1.18: Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου ασπαραγινάση

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες πάνω στην επίδραση της θερμοκρασίας αλλά και του χρόνου επώασης είτε σε συστήματα μοντέλων είτε σε πραγματικά τρόφιμα. Το 2006 οι Ciesarón et al., χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο πατάτας μελέτησαν την επίδραση δύο διαφορετικών χρόνων και θερμοκρασιών επώασης σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου μετά από επεξεργασία του μοντέλου στους 180 °C για 20 min φαίνονται στην Εικόνα 1.19. Η επώαση των δειγμάτων στους 37 °C

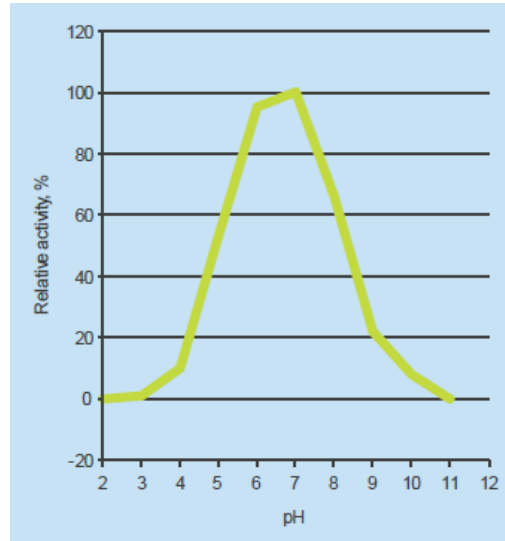
για 30 min έφερε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την επώαση στους 20 °C για 60 min. Η μείωση του ακρυλαμιδίου έφτασε το 90 % στην περίπτωση της επεξεργασίας των δειγμάτων με 2 U ενζύμου για κάθε γραμμάριο του μίγματος – μοντέλου.

Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης έχουν σημαντική επίδραση στη μείωση του ακρυλαμιδίου μόνο όταν οι συγκεντρώσεις του ενζύμου είναι πολύ χαμηλές. Οι Amrein et al. το 2007 μελέτησαν την επίδραση της δόσης αλλά και του χρόνου επώασης της ασπαραγινάσης σε μπισκότα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για δόση ενζύμου 450 U/kg μπισκότων ο χρόνος επώασης δεν επηρεάζει σημαντικά τη μείωση του ακρυλαμιδίου (Εικόνα 1.19)



Εικόνα 1.19: Επίδραση της συγκέντρωσης της ασπαραγινάσης (A) και του χρόνου επώασης (B) στην συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου σε μπισκότα. (A) Χρόνος επώασης 15min. (B) Δόση ενζύμου 450U/kg. Οι λευκές μπάρες αντιπροσωπεύουν το προϊόν αναφοράς ενώ οι γκρι μπάρες το προϊόν που επεξεργάστηκε με ασπαραγινάση (Amrein et al., 2007).

Όσον αφορά στην επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου αυτή φαίνεται στην Εικόνα 1.20. Η βέλτιστη τιμή του εντοπίζεται περίπου στο διάστημα από 6 έως 7.



Εικόνα 1.20: Επίδραση του pH στην ενεργότητα του ενζύμου ασπαραγινάση

1.11.3. Προτεινόμενες συγκεντρώσεις ενζύμου

Το ένζυμο προστίθεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων. Σε προϊόντα με βάση κάποια ζύμη το ένζυμο προστίθεται στη ζύμη πριν το ψήσιμο. Επίσης το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση των τσιπς. Το ένζυμο απενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας.

Όσον αφορά στα επίπεδα συγκέντρωσης του ενζύμου που απαιτούνται για τη βέλτιστη δράση του, αυτά ποικίλουν στα διάφορα τρόφιμα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω οδηγίες, όπως αυτές προτείνονται από την εταιρία Novozymes:

- Προϊόντα ζύμης

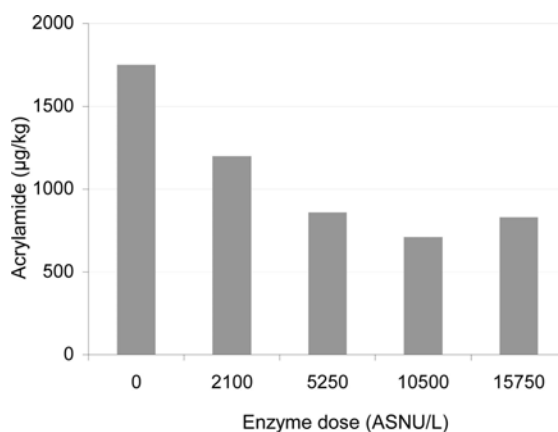
Για την εφαρμογή σε προϊόντα ζύμης, η συνιστώμενη δόση ενζύμου κυμαίνεται μεταξύ 200 και 2500 ASNU για κάθε κιλό τροφίμου (όπου 1ASNU είναι η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1μmol αμμωνίας ανά λεπτό κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης).

- Προϊόντα πατάτας

Για την επεξεργασία τροφίμων με βάση την πατάτα (τηγανιτές πατάτες, τσιπς) η δόση υπολογίζεται ανά κιλό τελικού προϊόντος και φτάνει μέχρι τα 2000 ASNU.

Στην περίπτωση των τηγανιτών πατατών προτείνεται η κοπή τους είτε σε λωρίδες είτε σε φέτες και η εμβάπτισή τους σε ένα διάλυμα ενζύμου με συγκέντρωση έως 12000 ASNU/L νερού για συγκεκριμένο χρόνο. Το διάλυμα αυτό μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για ένα χρονικό διάστημα. Το νερό που απορροφούν οι πατάτες κατά την διαδικασία αυτή, υπολογίζεται σε δόση ενζύμου περίπου στα 600 ASNU/kg κομμένης πατάτας και αντίστοιχα στα 1420 ASNU/kg τελικού προϊόντος. Για τον υπολογισμό αυτό, γίνεται η παραδοχή ότι 1kg κομμένης πατάτας αντιστοιχεί σε 0,42 kg προϊόντος έτοιμου προς κατανάλωση. Για τα τσιπς πατάτας, η αναλογία αυτή αλλάζει και γίνεται 0,33 kg τελικού προϊόντος ανά kg αποφλοιωμένης πατάτας. Στην περίπτωση αυτή, η δόση του ενζύμου στο τελικό προϊόν είναι περίπου 1820 ASNU/kg (Generally regarded as safe notice for Acrylaway, US FDA, 2006).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η μεγαλύτερη προσθήκη ενζύμου, δεν συνεπάγεται απαραίτητα και μεγαλύτερη μείωση του ακρυλαμιδίου. Οι Hendriksen et al. (2009) δοκίμασαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου σε τσιπς πατάτας. Η επεξεργασία έγινε σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 15 min και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.21.



Εικόνα 1.21: Επίπεδα ακρυλαμιδίου σε τσιπς πατάτας σαν συνάρτηση της δόσης ασπαραγινάσης. Η επώαση έγινε στους 40 °C για 15min (Hendriksen et al., 2009).

1.11.4. Νομοθεσία πάνω στη χρήση του ενζύμου

Η ασπαραγινάση αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ασφαλής για τη χρήση της σε τρόφιμα το Νοέμβριο του 2006 από την US FDA (Federal Drug Administration). Στη συνέχεια το ένζυμο πήρε πολύ ευνοϊκή αξιολόγηση από την JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) το 2007. Αυτή τη στιγμή επιτρέπεται η χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στη Νέα Ζηλανδία και στη Δανία. Το 2008, η Standing Committee on the Food Chain and Animal Health ενέκρινε την ασπαραγινάση για χρήση σε προϊόντα αρτοποιίας (SANCO & Animal Health, 2008). Στον Καναδά έχουν ζητηθεί τροποποιήσεις στη νομοθεσία που θα επιτρέψουν τη χρήση του ενζύμου ως πρόσθετου στην επεξεργασία των τροφίμων (Health Canada, 2009).

Κεφάλαιο 2^ο

2.1. Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε, το ακρυλαμίδιο εμφανίζεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής μας διατροφής. Ο μηχανισμός σχηματισμού του θεωρείται εξαιρετικά πολύπλοκος με πρωταρχικό ρόλο την αντίδραση Maillard. Η αντίδραση Maillard αποτελείται μια σειρά διαδοχικών και αλληλοσυνδεδεμένων αντιδράσεων αμαύρωσης στις οποίες συμμετέχουν αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες των οποίων η αμινική ομάδα δίνει αρχικά με ένα σάκχαρο προϊόντα συμπύκνωσης. Τα προϊόντα αυτά δρουν ως αυτοκαταλύτες για τις περαιτέρω αντιδράσεις ενολοποίησης, μετάθεσης *Amadori*, αφυδάτωσης κ.λπ. Τελικά προϊόντα της σειράς αυτής των αντιδράσεων είναι οι μελανοϊδίνες. Σημαντικοί παράγοντες για την αντίδραση Maillard είναι η θερμοκρασία, το είδος και η συγκέντρωση του αναγόμενου σακχάρου και της αμινοενώσεως, η ενεργότητα του νερού (a_w) και το pH.

Εξερευνώντας την αντίδραση Maillard ο στόχος κλειδί για τη βιομηχανία τροφίμων είναι να κατανοήσει και να χρησιμοποιήσει τις οδούς της αντίδρασης που θα οδηγήσουν στα βέλτιστα αποτελέσματα. Η θετική συνεισφορά της αντίδρασης Maillard είναι η ανάπτυξη επιθυμητού καστανού χρώματος και *flavor* σε τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Από την άλλη πλευρά, μπορεί να επιδράσει αρνητικά με τη δημιουργία τοξικών προϊόντων. Οι πιθανότητες για να είναι παράγοντες καρκινογόνοι ή μεταλλαξογόνοι τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard (που οδηγούν στη δημιουργία ετεροκυκλικών αμινών) μελετήθηκαν πριν από 20-25 χρόνια. Το 2002, ανακηρύχθηκε το ακρυλαμίδιο ως πιθανώς καρκινογόνο.

Οι μελέτες στράφηκαν προς διάφορους εναλλακτικούς τρόπους μείωσης (όπως εναλλακτικοί τρόποι επεξεργασίας των τροφίμων, επιλογή των συστατικών - πρώτων υλών) της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα. Η χρήση του ενζύμου ασπαραγινάση, το οποίο δρα υδρολύοντας την ασπαραγίνη, μία από τις κυριότερες πρόδρομες ουσίες σχηματισμού του ακρυλαμιδίου προς

ασπαρτικό οξύ και αμμωνία, αποτελεί μέθοδο ελέγχου για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Υπάρχουν ήδη στην αγορά διαθέσιμα παρασκευάσματα ασπαραγινάσης (όπως Acrylaway/Novozymes, PreventASe/DSM) καθώς και οδηγοί προς τη βιομηχανία τροφίμων για τη χρήση τους (όπως σε προϊόντα ζύμης). Έχουν δημοσιευτεί μελέτες για τη χρήση του ενζύμου σε συστήματα μοντέλα τροφίμων και καθώς και σε πραγματικά τρόφιμα (που αφορούν κυρίως στην πατάτα και στα προϊόντα της πατάτας). Οι μελέτες αυτές επικεντρώνονται στη χρήση του ενζύμου και την επίδραση του στο ακρυλαμίδιο τελικού προϊόντος. Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένες κινητικές μελέτες (εύρος θερμοκρασιών και χρόνων) για την επίδραση της προσθήκης του ενζύμου τόσο σε συστήματα μοντέλα τροφίμων όσο και σε πραγματικά τρόφιμα, καθώς και στο μηχανισμό δράσης του.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της αντίδρασης Maillard σε σύστημα μοντέλου ασπαραγίνης και φρουκτόζης 0,1M σε υψηλές θερμοκρασίες από 140 έως 200 °C και η προκατεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο ασπαραγινάση ως μεθόδου ελέγχου της αντίδρασης. Η προ-κατεργασία δειγμάτων με ένζυμο έχει ως στόχο τον έλεγχο του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου μέσω της αντίδρασης Maillard.

Η αντίδραση Maillard μεταξύ ασπαραγίνης και φρουκτόζης (ισομοριακό διάλυμα, 0,1 M) σε θερμοκρασίες >140C παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς κατά τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί η φρουκτόζη αποτελεί το σάκχαρο με τη μεγαλύτερη σχηματιζόμενη ποσότητα ακρυλαμιδίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε pH 6 χρήσει ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων όπως αναφέρεται από τους Knol et al. (2006; 2010) για σύστημα μοντέλο ασπαραγίνης – γλυκόζης (ισομοριακό διάλυμα, 0,1 M).

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποτέλεσε το κρίσιμο σημείο της πειραματικής διαδικασίας. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιήθηκαν ερμητικά κλειστοί, ειδικά κατασκευασμένοι ανοξείδωτοι χαλύβδινοι σωλήνες προκειμένου να αποφευχθούν απώλειες νερού, απορροφήσεις λαδιού και εξάτμιση του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου. Επιπλέον, για τον έλεγχο και την καταγραφή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων κατασκευάστηκε ορειχάλκινο κάλυμμα θερμοστοιχείου τύπου K σε καπάκι σωλήνα. Ήταν απαραίτητο η

πειραματική διαδικασία να πραγματοποιείται σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας ή έστω σταθερής στο μεγαλύτερο διάστημα της ώστε να ήταν εφικτή η κινητική μελέτη στην επιλεγμένη θερμοκρασία. Για τη μείωση του χρόνου θέρμανσης με μεταβαλλόμενη τη θερμοκρασία (από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος ως την επιθυμητή), επιλέχθηκε η χρήση ελαιόλουτρου προθέρμανσης σε σταθερή θερμοκρασία 220 °C. Με την προθέρμανση των δειγμάτων, ο χρόνος μειώθηκε σημαντικά (π.χ. 29 min-140 °C έναντι 2,5 min-220 °C).

Κατά τη μελέτη προσδιορίστηκαν: συγκέντρωση των αντιδρώντων (ασπαραγίνη και φρουκτόζη), συγκέντρωση των μελανοϊδινών (ως προϊόν της αντίδρασης), pH και χρώμα. Στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενζύμου τόσο στα συστατικά (αντιδρώντα και προϊόντα) της αντίδρασης Maillard όσο και στα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συστήματος.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό παρασκεύασμα Acrylaway®L της Novozymes σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, 3, 15 και 30 U/g ασπαραγίνης σε αντιστοιχία με συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Ciesarova et al., 2006; Pedreschi et al., 2008). Για την επιλογή της θερμοκρασίας (από 25 έως 60 °C) και του χρόνου επώασης (από 10 έως 60 min) του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα με τα βέλτιστα αποτελέσματα τη θερμοκρασία επώασης των 40°C και το χρόνο 20 min.

Απώτερος στόχος της εργασίας είναι μία πρώτη προσέγγιση στην επίδραση του ενζύμου ασπαραγινάση στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου μέσω της αντίδρασης Maillard που πραγματοποιείται ανάμεσα στην ασπαραγίνη και τη φρουκτόζη.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία καθώς και ο πειραματικός σχεδιασμός αναλυτικά.

2.2. Υλικά

2.2.1. Αντιδραστήρια

- L-asparagine monohydrate (99%, Acros Organics, New Jersey, USA)
- D – Φρουκτόζη (Ferak, Berlin, Germany)
- Ασπαραγινάση (εμπορική ονομασία: Acrylaway®L) Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) (Πίνακας 2.1)

Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά Acrylaway®L

Χαρακτηριστικά προϊόντος	Acrylaway®L
Ένζυμο	Ασπαραγινάση
Ενεργότητα ενζύμου	3500 ASNU/g
Χρώμα	Ανοιχτό καφέ
Μορφή	Υγρό
Πυκνότητα κατά προσέγγιση	1,17
Σταθεροποιητής	Γλυκερόλη
Συντηρητικά	Σορβικό κάλιο & βενζοϊκό Νάτριο
Οργανισμός από τον οποίο παράχθηκε	Aspergillus oryzae

- Ρυθμιστικό διάλυμα ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- L-asparagine/L-glutamine/Ammonia Rapid Kit (Megazyme International Ireland Ltd., Ireland)
- Λιπαντικό μεταφοράς θερμότητας Eldon's Trans SG (για θερμοκρασίες λειτουργίας μέχρι τους 260°C) (Eldon's, Αθήνα, Ελλάδα)
- Ακετονιτρίλιο, κατάλληλο για HPLC (Fisher Chemical UK Limited, Leicestershire, UK)
- Νερό, κατάλληλο για HPLC (Fisher Chemical UK Limited, Leicestershire, UK)

2.2.2. Όργανα

- Ανοξείδωτοι χαλύβδινοι (τύπου 316L) σωλήνες διαστάσεων 112*30 mm (23 mm, εσωτερική διάμετρος) (Ευστάθιος Μουρατίδης, Πειραιάς, Ελλάδα)
- Ελαιόλουτρο Memmert, Type OB (Memmert GmbH & Co KG, Γερμανίας)

- Ελαιόλουτρο - Ηλεκτρική φριτέζα 0(+50 °C έως +300 °C) (Διακουλάκος Ι., Ltd, Αθήνα, Ελλάδα)
- Υδατόλουτρο Memmert, Type WB (Memmert GmbH & Co KG, Γερμανίας)
- pH-μετρο (UV Bayern, WTW Bayern, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο (UNICAM Model Helios Alpha, Cambridge, UK)
- Microplate Spectrophotometer Spectramax 250 (Molecular Devices, Inc., USA)
- Χρωματόμετρο Minolta CR-200 (Minolta Co., Chuo-Ku, Osaka, Japan)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HP 1100 Series, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany)
- Συσκευή υπέρηχων (Elmasonic, Elma S 30 H, Germany)

2.3. Πειραματική διαδικασία

2.3.1. Προετοιμασία των αντιδρώντων μιγμάτων

Στο πρώτο μέρος, προετοιμάστηκαν ισομοριακά διαλύματα φρουκτόζης – ασπαραγίνης συγκέντρωσης 0,1M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6. Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκαν τα ίδια διαλύματα, τα οποία όμως επεξεργάστηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ασπαραγινάσης 3, 15 και 30U/g περιεχόμενης ασπαραγίνης. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 40 °C και χρόνο 20 λεπτά σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση.

2.3.2. Πειραματική διάταξη

Για τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ερμητικά κλειστοί, ειδικά κατασκευασμένοι ανοξείδωτοι χαλύβδινοι σωλήνες διαστάσεων 112*30 mm (23 mm, εσωτερική διάμετρος) (Ευστάθιος Μουρατίδης, Πειραιάς, Ελλάδα) για να αποφευχθούν κατά το δυνατό απώλειες νερού, απορροφήσεις λαδιού και εξάτμιση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου. Για την



Εικόνα 2.1: Ανοξείδωτοι χαλύβδινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, με και χωρίς κάλυμμα θερμοστοιχείου τοποθετημένο στο καπάκι.

παρακολούθηση και την καταγραφή της θερμοκρασίας κατασκευάστηκε ορειχάλκινο κάλυμμα θερμοστοιχείου σε καπάκι σωλήνα. Η θερμοκρασία ελεγχόταν με τη χρήση ηλεκτρονικού καταγραφικού θερμοκρασίας (Type K, HOBO Thermocouple Logger, Onset Computer Corp. Pocasset, Massachusetts, USA) με συχνότητας καταγραφής τα 10 s (Εικόνα 2.1, Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Ανοξείδωτος, χαλύβδινος δοκιμαστικός σωλήνας και το θερμοστοιχείο τύπου K τοποθετημένο στο ειδικό κάλυμμα στο καπάκι.

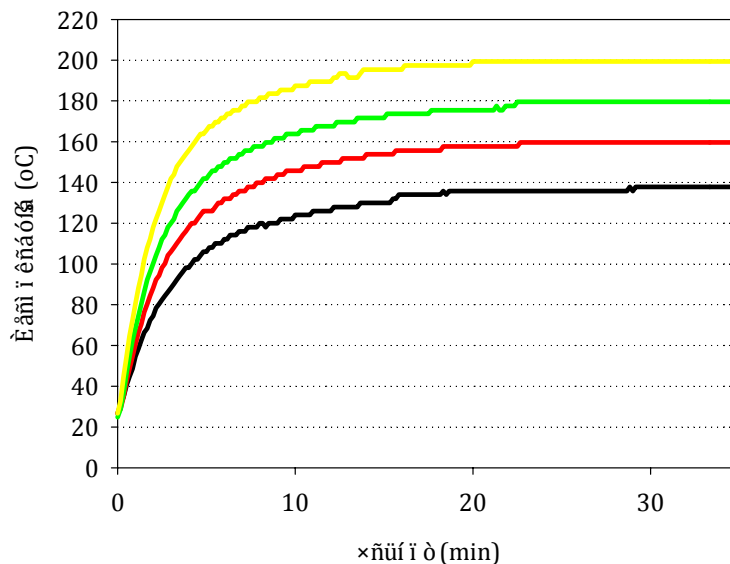
Η θερμική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ελαιόλουτρο Memmert, Type OB (+20 έως +200 °C) (Mettler GmbH & Co KG, Γερμανίας) στους 140, 160, 180 και 200°C (Εικόνα 2.3). Τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το ελαιόλουτρο σε προκαθορισμένους χρόνους (0, 2, 4, 8, 16, 32 και 64 min) και αμέσως ψύχθηκαν σε παγωμένο νερό για να σταματήσει η αντίδραση. Ένα πρόβλημα που έπρεπε να λυθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν αυτό της



Εικόνα 2.3: Ελαιόλουτρο Memmert, Type OB και ελαιόλουτρο προθέρμανσης Διακουλάκος I, Ltd.

θέρμανσης των δειγμάτων. Οι θερμοκρασίες στις οποίες τα δείγματα επεξεργάστηκαν ήταν υψηλές. Επομένως, ήταν δύσκολο να εξασφαλίσουμε σταθερή την θερμοκρασία στα πρώτα λεπτά του πειράματος καθώς και να πετύχουμε τις υψηλές αυτές θερμοκρασίες σε μικρό χρόνο. Αρχικά, δοκιμάσαμε την εμβάπτιση των δειγμάτων απευθείας στο ελαιόλουτρο, το οποίο

είχε ρυθμιστεί στην εκάστοτε επιθυμητή θερμοκρασία. Η καταγραφή της θερμοκρασίας φαίνεται στο διάγραμμα (Διάγραμμα 2.1).



Διάγραμμα 2.1 : Απόκριση θερμοκρασίας δειγμάτων στην απευθείας θέρμανση.
(— 140, — 160, — 180, — 200)

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα οι απαιτούμενοι χρόνοι για την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας ήταν πολύ μεγάλοι (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Χρόνοι θέρμανσης για τις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες.

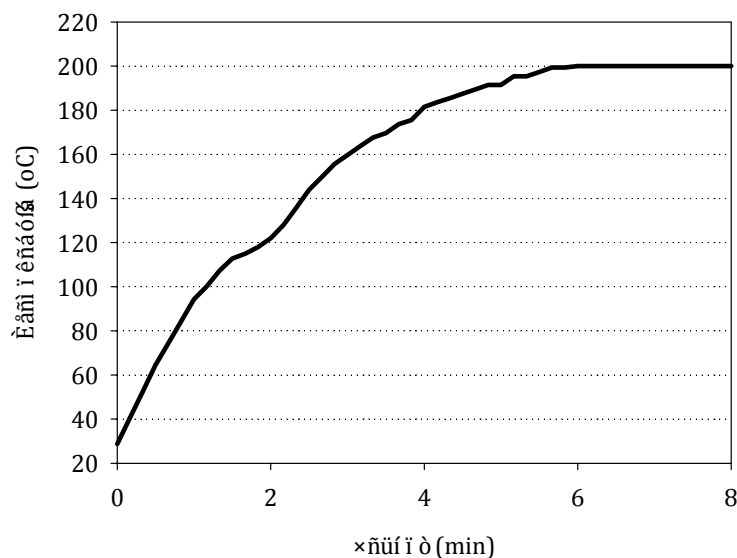
Επιθυμητή θερμοκρασία (°C)	Χρόνος θέρμανσης (min)
140	29
160	26
180	22
200	20

Ήταν απαραίτητο η πειραματική διαδικασία να πραγματοποιείται σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας ή έστω σταθερής στο μεγαλύτερο διάστημα της ώστε να ήταν εφικτή η κινητική μελέτη στην κάθε θερμοκρασία.

Για να μειωθεί ο χρόνος στον οποίο τα δείγματα θα υποβάλλονταν σε θέρμανση με μεταβαλλόμενη τη θερμοκρασία (από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος ως την επιθυμητή) χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο ελαιόλουτρο ως λουτρό προθέρμανσης. Το δεύτερο αυτό λουτρό, λειτουργούσε σταθερά στους

220 °C. Τα δείγματα αρχικά τοποθετούνταν στο λουτρό προθέρμανσης μέχρι να φτάσουν στην επιθυμητή θερμοκρασία και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο κυρίως λουτρό όπου παρέμεναν στην θερμοκρασία αυτή για όσο χρόνο απαιτούσε η πειραματική διαδικασία.

Έγιναν δοκιμαστικά πειράματα, έτσι ώστε να υπολογιστούν οι απαραίτητοι χρόνοι προθέρμανσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2.2).



Διάγραμμα 2.2: Απόκριση της θερμοκρασίας των δειγμάτων κατά την προθέρμανσή τους στους 220 °C.

Συγκεκριμένα, οι χρόνοι προθέρμανσης που τηρήθηκαν για κάθε θερμοκρασία φαίνονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Χρόνοι προθέρμανσης για τις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες σε ελαιόλουτρο 220°C

Επιθυμητή θερμοκρασία (°C)	Χρόνος προθέρμανσης (min)
140	2,5
160	3
180	4
200	6

Με τον τρόπο αυτό μειώθηκε πολύ η υστέρηση στη θέρμανση. Μάλιστα, οι χρόνοι προθέρμανσης είναι χαμηλότεροι από αυτούς που αναφέρονται

βιβλιογραφικά σε παρόμοιες πειραματικές διαδικασίες, στις οποίες όμως αντί για ελαιόλουτρο χρησιμοποιείται σαν σύστημα θέρμανσης ένα *heating block* (Knol et al., 2010).

2.4. Αναλυτικές μέθοδοι

2.4.1. Προσδιορισμός ασπαραγίνης

Η περιεκτικότητα σε ασπαραγίνη μετρήθηκε με τη χρήση του L-asparagine/L-glutamine/Ammonia rapid kit της Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Ireland) που βασίζεται σε ταχεία μέθοδο προσδιορισμού (περίπου 20 λεπτά) της L - ασπαραγίνης του δείγματος. Οι μετρήσεις έγιναν με φασματοσκοπική μέθοδο μικροκυψελίδων και κυβετών (Microplate readers, Spectramax 250, Molecular Devices, Inc., USA). Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση της ασπαραγίνης στο φασματοφωτόμετρο μικροκυψελίδων (μήκος κύματος: 340 nm, μικροκυψελίδες πολυπροπυλενίου).

Πίνακας 2.4: Αντίδραση μέτρησης της ασπαραγίνης με τη χρήση του L-asparagine/ L- glutamine/Ammonia rapid kit

Αντιδραστήρια		
	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (pH 4,9)	20μL	20μL
Δείγμα	-	10μL
Γλουταμινάση (2500U/mL)	2μL	2μL
Ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου		
Απιονισμένο νερό	160μL	150μL
Ρυθμιστικό διάλυμα NADPH	50μL	50μL
Ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου		
Αφυδρογονάση Γλουταμινικού (GIDH)	2μL	2μL
Ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης μετά από 5 min. Εάν η αντίδραση δεν έχει σταματήσει μετά από 5 min, μετράται ξανά η απορρόφηση κάθε λεπτό μέχρι να σταθεροποιηθεί. (A ₁)		
Διάλυμα ασπαραγινάσης	2μL	2μL
Ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης μετά από 5min. Εάν η αντίδραση δεν έχει σταματήσει μετά από 5 min, μετράται ξανά η απορρόφηση κάθε λεπτό μέχρι να σταθεροποιηθεί (A ₂).		

Για τον υπολογισμό της περιεχόμενης ασπαραγίνης στο δείγμα χρησιμοποιούνται οι διαφορές των απορροφήσεων μεταξύ του τυφλού και του δείγματος. Υπολογίζεται ο παράγοντας $\Delta A_{L-ασπαραγίνη} = (A_1 - A_2)_{\text{δείγματος}} - (A_1 - A_2)_{\text{τυφλού}}$. Αυτή η διαφορά των απορροφήσεων θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,100 για να είναι ακριβή τα αποτελέσματα. Η συγκέντρωση της ασπαραγίνης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A \text{ [g/L]} \quad (2.1)$$

όπου V ο τελικός όγκος του δείγματος (236 μL), MW το μοριακό βάρος της ασπαραγίνης (150,14 g/mol), ε ο συντελεστής για NADPH στα 340 nm που είναι ίσο με 6300 (L·mol⁻¹·cm⁻¹), d το ύψος της κυψελίδας (0,6657 cm) και v ο όγκος του δείγματος (0,01 mL). Επομένως, η τελικά μορφή της εξίσωσης 2.1 είναι

$$c_{\text{Ασπαραγίνης}} = 0,8448 \cdot \Delta A \quad (2.2)$$

Ακόμη, ήταν απαραίτητες κάποιες αραιώσεις για την αποτελεσματικότητα του kit και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5.

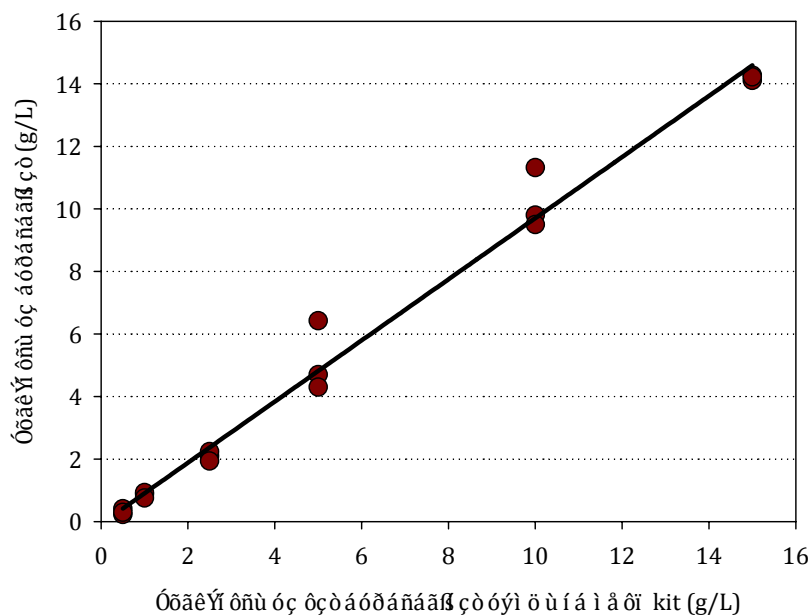
Πίνακας 2.5: Πίνακας αραιώσεων

Αναμενόμενη συγκέντρωση ασπαραγίνης στο δείγμα (g/L)	Αραίωση με νερό	Παράγοντας Αραίωσης (F)
<0,50	-	1
0,50 – 5,0	1+9	10
5,0 – 50	1+99	100
>50	1+999	1000

Για την ποσοτικοποίηση των μετρήσεων κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα υδατικά διαλύματα L(-)-ασπαραγίνης συγκέντρωσης από 0,5 έως 15 g/L (Διάγραμμα 2.3). Η γραμμική εξίσωση ($R^2=0,986$) που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

$$c_{\text{Ασπαραγίνης}} = 1,0237 \cdot c_{\text{indicated}} \quad (2.3)$$

όπου και $C_{\text{Ασπαραγίνης}}$ η συγκέντρωση της ασπαραγίνης στο δείγμα και $c_{\text{indicated}}$ η συγκέντρωση όπως προέκυψε από το kit (g/L).



Διάγραμμα 2.3 Καμπύλη αναφοράς ασπαραγίνης

2.4.2. Προσδιορισμός φρουκτόζης

Ο προσδιορισμός της φρουκτόζης πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HP 1100 Series, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) με χρήση διαθλασίμετρου (HP 1047A, Hewlett Packard, Waldbronn, Γερμανίας) ως ανιχνευτή (Εικόνα 2.4). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Nucleosil Carbohydrate EC 250/4 (Macherey-Nagel, Duren, Γερμανίας)

με προστήλη Nucleosil Carbohydrate CC 8/4 (Macherey-Nagel, Duren, Γερμανίας), ενώ η κινητή φάση ήταν μίγμα ακετονιτρίλιου/νερού σε αναλογία 80/20 (ακετονιτρίλιο: κατάλληλο για HPLC, Fisher Chemical UK Limited, Leicestershire, UK και νερό: κατάλληλο για HPLC, Fisher Chemical UK Limited, Leicestershire, UK) το οποίο υποβλήθηκε σε απαέρωση με χρήση συσκευής υπερήχων. Όλα τα δείγματα πριν την ανάλυση τους φυγοκεντρήθηκαν.

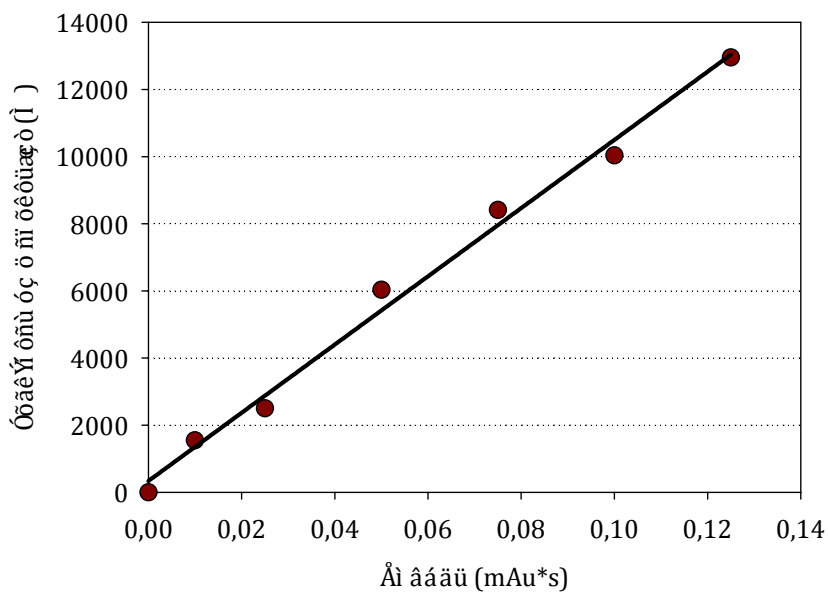


Εικόνα 2.4: Συσκευή HPLC

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μετρήσεων κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα υδατικά διαλύματα καθαρής D(-)-φρουκτόζης συγκέντρωσης από 0,01 έως 0,125 M (εξαιρετικής καθαρότητας, RIEDEL-de Haen AG, Seelze, Γερμανία). Η γραμμική εξίσωση ($R^2=0,991$) που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

$$c_{Fr} = 9 \cdot 10^{-6} \cdot E \quad (2.4)$$

όπου E το εμβαδόν της επιφάνειας που περικλείεται από το χρωματογράφημα (mAu·s) και C η συγκέντρωση της φρουκτόζης στο ενέσιμο δείγμα (M).



Διάγραμμα 2.4: Καμπύλη αναφοράς της φρουκτόζης

2.4.3. Προσδιορισμός μελανοϊδινών



Εικόνα 2.5: Φασματοφωτόμετρο Helios α UNICAM

Η συγκέντρωση των μελανοϊδινών υπολογίστηκε με τη μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 470 nm, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 2.5). Τα δείγματα αραιώθηκαν, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο, με απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση των μελανοϊδινών υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης Lambert - Beer, με συντελεστή 282 L/mol·cm (Leong, 1999). Παρόλο που οι μελανοϊδίνες αποτελούνται από ένα περίπλοκο μίγμα διαφόρων μορίων, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να μετρηθούν με αυτό τον τρόπο.

2.4.4. Μέτρηση χρώματος

Το χρώμα μετρήθηκε με χρωματόμετρο Minolta CR-200 (Minolta Co., Chuo-Ku, Osaka, Japan) (Εικόνα 2.6) με επιφάνεια μέτρησης διαμέτρου 8 mm. Πρότυπη λευκή πλακέτα της Minolta χρησιμοποιήθηκε για την βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις συνθήκες της CIE (Commission International de L'Eclairage). Για τη μέτρηση του χρώματος, 3 mL δείγματος τοποθετήθηκαν σε γυάλινο διαφανές τρυβλίο Petri με καπάκι, διαμέτρου 25 mm και όγκου 5 mL, και στη συνέχεια μετρήθηκε το χρώμα με την εφαρμογή του χρωματομέτρου στην επιφάνεια του τρυβλίου.



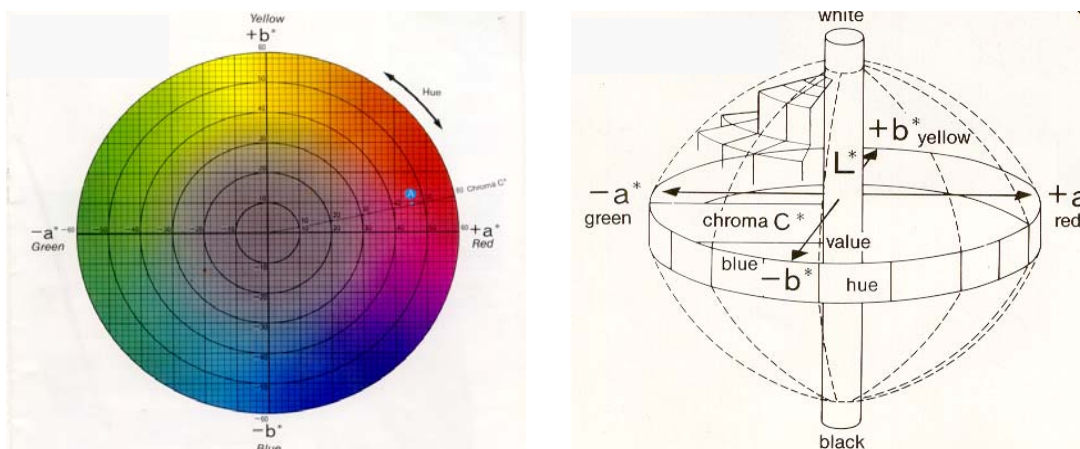
Εικόνα 2.6: Φορητό χρωματόμετρο Minolta CR-200

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν στην κλίμακα CIE (L, a, b). Οι τιμές a και b είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος (συχνά ονομάζονται χρωματικότητα) πάνω στο επίπεδο διατομής του χρώματος, κάθετο στον άξονα μαύρου-άσπρου. Εάν ένα δείγμα έχει μηδενική τιμή για τα a και b πρέπει να βρίσκεται πάνω στον άξονα μαύρου-άσπρου, να έχει δηλαδή κάποια απόχρωση του γκρι. Μία θετική τιμή για το a υποδεικνύει κόκκινο χρώμα (redness), ενώ μία αρνητική τιμή πράσινο χρώμα (greeness). Μία θετική τιμή για το b υποδεικνύει κίτρινο χρώμα (yellowness), ενώ μία αρνητική τιμή μπλε χρώμα (blueness). Το L εκφράζει την φωτεινότητα (λαμπρότητα) του χρώματος (Εικόνα 2.7). Η παράμετρος $C = \sqrt{a^2 + b^2}$ συμβολίζει το χρώμα, ενώ η παράμετρος $E = \sqrt{a^2 + b^2 + L^2}$ το ολικό χρώμα. Επιπλέον, οι παράμετροι αυτές επιτρέπουν τον υπολογισμό της συνολικής μεταβολής χρώματος (ΔC) και της συνολικής μεταβολής της οπτικής απόκρισης (ΔE), που δίνονται αντίστοιχα από τις παρακάτω σχέσεις (MacDougall, 1988):

$$\Delta C = \sqrt{(\alpha - \alpha_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (2.5)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (\alpha - \alpha_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (2.6)$$

όπου L_0 , a_0 και b_0 είναι οι αντίστοιχες αρχικές τιμές των παραμέτρων L , a και b σε χρόνο $t = 0 \text{ min}$.



Εικόνα 2.7: Συντεταγμένες L , a και b του χρώματος σε κλίμακα CIE (L,a,b).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος της φωτεινότητας L και της συνολικής μεταβολής της οπτικής απόκρισης, γιατί αυτές ανταποκρίθηκαν καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα.

2.4.5. Μέτρηση pH

Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιείται pHμετρο (UV Bayern, WTW Bayern, Germany, Εικόνα 2.8). Για τη βαθμονόμηση της συσκευής χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα σταθερής τιμής pH 4 και 7.



Εικόνα 2.8: Συσκευή μέτρησης pH

2.5. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα πειραματικά δεδομένα για τη συγκέντρωση ασπαραγίνης, τη συγκέντρωση φρουκτόζης, τη συγκέντρωση μελανοϊδινών, και τους δείκτες χρώματος L και DE προσαρμόστηκαν σε μαθηματικές εξισώσεις με χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., 2006, Germany).

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσον αφορά την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης 2 παραμέτρων (ANOVA, 2-way) για να εκτιμηθεί η σημαντικότητα των παραμέτρων της αντίδρασης (θερμοκρασία επεξεργασίας και χρόνος επεξεργασίας).

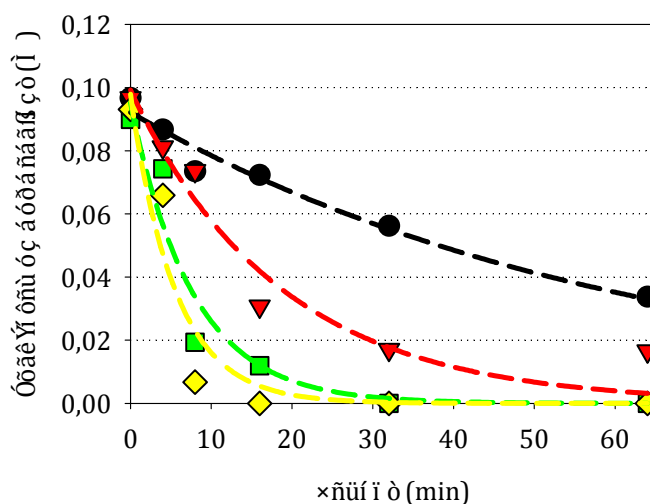
Κεφάλαιο 3^ο

3. Μελέτη της αντίδρασης Maillard σε υψηλές θερμοκρασίες

Όπως αναφέρθηκε και στην πειραματική διαδικασία, έγιναν δύο σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη σειρά, μελετήθηκε η αντίδραση Maillard σε σύστημα ασπαραγίνης - φρουκτόζης pH 6, σε θερμοκρασίες από 140 ως 200 °C. Μελετήθηκαν η μείωση της συγκέντρωσης της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης, καθώς και η μεταβολή του χρώματος, του pH και της συγκέντρωσης των παραγόμενων μελανοϊδινών. Για την κινητική μελέτη της αντίδρασης έγινε δειγματοληψία σε διάφορους χρόνους (0, 2, 4, 8, 16, 32 και 64 min).

3.1 Μελέτη της αντίδρασης ασπαραγίνης - φρουκτόζης

3.1.1 Μεταβολή της συγκέντρωσης της ασπαραγίνης



Σχήμα 3.1: Μεταβολή της συγκέντρωσης της ασπαραγίνης σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασίες 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(◆).

Κατά τη θέρμανση των δειγμάτων η συγκέντρωση της ασπαραγίνης μειώθηκε και μάλιστα ο ρυθμός μείωσης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Στους 140 και στους 160 °C η ασπαραγίνη μετά από 64 min βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στην περίπτωση των 180 και 200 °C η ασπαραγίνη μηδενίζεται ήδη από τα 32 και 16 min, αντίστοιχα. Η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στη μείωση της ασπαραγίνης επαληθεύτηκε στατιστικά ($F > F_{crit}$).

Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν στην παρακάτω μαθηματική εξίσωση (Εξίσωση 3.1, Πίνακας 3.1) μέσω της οποίας υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μείωσης της ασπαραγίνης, k_{asn} .

$$C_{asn} = a_{asn} \cdot e^{\left(-k_{asn} \cdot t\right)} \quad (\text{Εξίσωση 3.1})$$

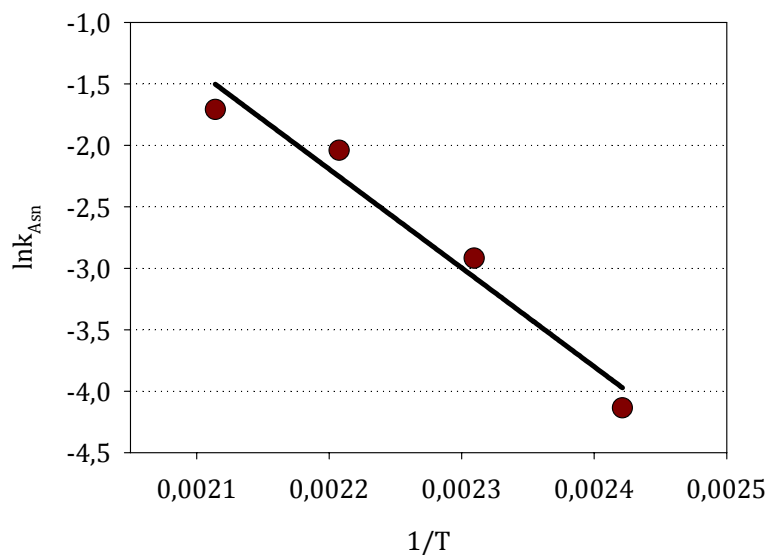
Πίνακας 3.1: Παράγοντες της Εξ. 3.1 και R^2 για τη μείωση της ασπαραγίνης σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.

Θερμοκρασία (°C)	a_{asn} (M)	k_{asn} (min ⁻¹)	R^2
140	0,092	0,016	0,968
160	0,099	0,054	0,936
180	0,095	0,130	0,930
200	0,098	0,181	0,923

Για την επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό μείωσης της ασπαραγίνης, υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 3.2, Σχήμα 3.2) η ενέργεια ενεργοποίησης.

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \Leftrightarrow \ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (\text{Εξίσωση 3.2})$$

όπου k ο ρυθμός μείωσης της ασπαραγίνης, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης, T η θερμοκρασία σε βαθμούς Κ και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 Jmol⁻¹K⁻¹).

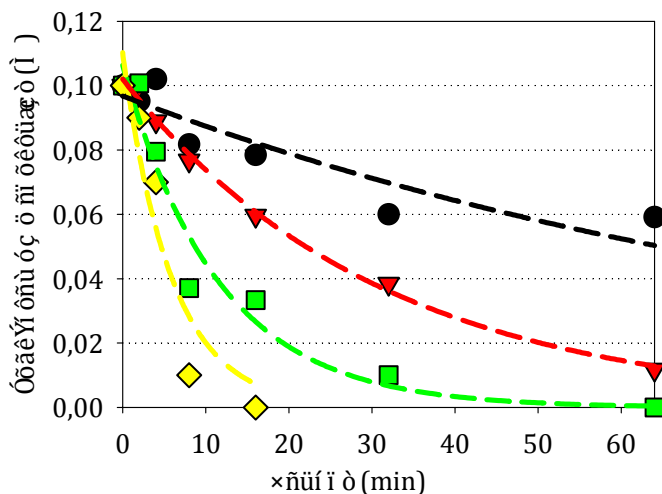


Σχήμα 3.2: Μεταβολή του λογαρίθμου του ρυθμού της μείωσης της ασπαραγίνης (k_{Asn}) συναρτήσει του αντιστρόφου του χρόνου για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης.

Η εξίσωση 3.3 προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα ($R^2=0,961$). Με πολλαπλασιασμό της κλίσης της ευθείας με τη σταθερά των αερίων R προκύπτει η ενέργεια ενεργοποίησης ίση με $E_a=66,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$$\ln k = -8035,3 \cdot \frac{1}{T} + 15,48 \quad (\text{Εξίσωση 3.3})$$

3.1.2. Μεταβολή της συγκέντρωσης της φρουκτόζης



Σχήμα 3.3: Μεταβολή της συγκέντρωσης της φρουκτόζης σε συνάρτηση με το χρόνο. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασίες 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(◆).

Η συγκέντρωση της φρουκτόζης μειώθηκε με το χρόνο, όπως και αυτή της ασπαραγίνης (Σχήμα 3.3). Ο ρυθμός μείωσης αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Για την περίπτωση των 140 °C η μείωση της φρουκτόζης δεν είναι πολύ μεγάλη. Αντίθετα, στους 180 και 200 °C η περιεχόμενη φρουκτόζη μηδενίζεται στα 16 και 64 min, αντίστοιχα. Επαληθεύτηκε και στατιστικά η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στη μείωση της φρουκτόζης ($F > F_{crit}$).

Ενώ, η συγκέντρωση της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης φαίνεται να μειώνεται με τον ίδιο ρυθμό στους 200 °C, αυτό δεν ισχύει και για τις υπόλοιπες θερμοκρασίες. Στους 140, 160 και 180 °C η ασπαραγίνη βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από την φρουκτόζη στους αντίστοιχους χρόνους. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στη μείωση του pH, αφού έτσι αυξάνεται η απαμίνωση της ασπαραγίνης.

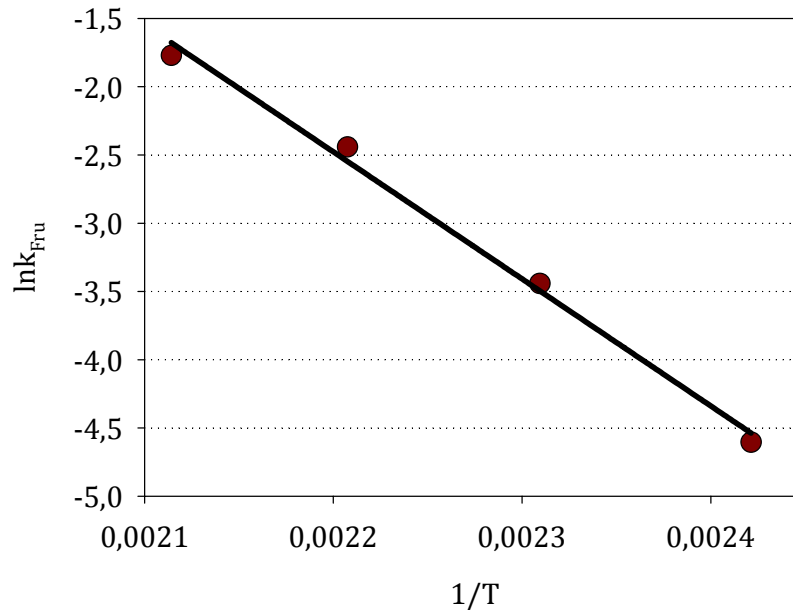
Στα πειραματικά δεδομένα εφαρμόστηκαν καμπύλες που περιγράφονται από τη μαθηματική εξίσωση 3.4 (Πίνακας 3.2).

$$C_{Fru} = a_{Fru} \cdot e^{(-k_{Fru} \cdot t)} \quad (\text{Εξίσωση 3.4})$$

Πίνακας 3.2: Παράγοντες της Εξ. 3.4 και R^2 για τη μείωση της φρουκτόζης σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C

Θερμοκρασία (°C)	$a_{\text{Fru}}(\text{M})$	$k_{\text{Fru}}(\text{min}^{-1})$	R^2
140	0,097	0,010	0,825
160	0,102	0,032	0,995
180	0,106	0,087	0,952
200	0,110	0,170	0,903

Εφαρμόζοντας και πάλι την εξίσωση Arrhenius υπολογίζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στη συγκέντρωση της φρουκτόζης. Με βάση τους ρυθμούς μείωσης της φρουκτόζης προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4: Μεταβολή του λογαρίθμου του ρυθμού της μείωσης της φρουκτόζης (k_{Fru}) συναρτήσει του αντιστρόφου του χρόνου για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης.

Η εξίσωση 3.5 προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα ($R^2=0,994$). Με πολλαπλασιασμό της κλίσης της ευθείας με τη σταθερά των αερίων προκύπτει η ενέργεια ενεργοποίησης ίση με $E_a=77,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$$\ln k = -9,310 \cdot \frac{1}{T} + 18,004 \quad (\text{Εξίσωση 3.5})$$

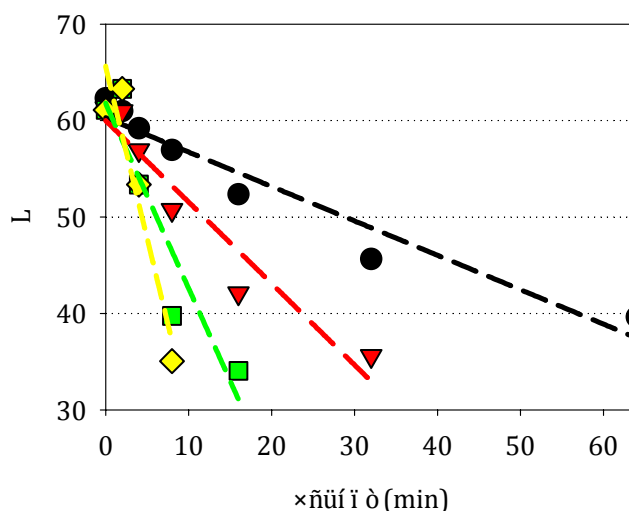
Παρατηρείται ότι οι τιμές των ενεργειών ενεργοποίησης, τόσο της ασπαραγίνης όσο και της φρουκτόζης είναι υψηλές, όπως αναμενόταν για την αντίδραση Maillard και μάλιστα είναι συγκρίσιμες αριθμητικά.

3.1.3. Μεταβολή του χρώματος κατά την αντίδραση

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του χρώματος παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

Η παράμετρος που ανταποκρίθηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα είναι η φωτεινότητα L. Παρατηρούμε ότι μειώνεται με την πάροδο του χρόνου ενώ ο ρυθμός μείωσης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως ήταν αναμενόμενο. Η μείωση της φωτεινότητας των δειγμάτων οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης των μελανοϊδινών στα δείγματα με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της θερμοκρασίας μέσω της αντίδρασης Maillard. Ο δείκτης L σταθεροποιείται στην τιμή 35 με ρυθμό ανάλογο της θερμοκρασίας επεξεργασίας.

Για την εύρεση του ρυθμού μείωσης της φωτεινότητας προσαρμόστηκαν στα δεδομένα γραμμικές εξισώσεις (Εξίσωση 3.6, Πίνακας 3.3) μέχρι το χρόνο εκείνο που ξεκινάει η δημιουργία πλατό και στις δύο ιδιότητες.



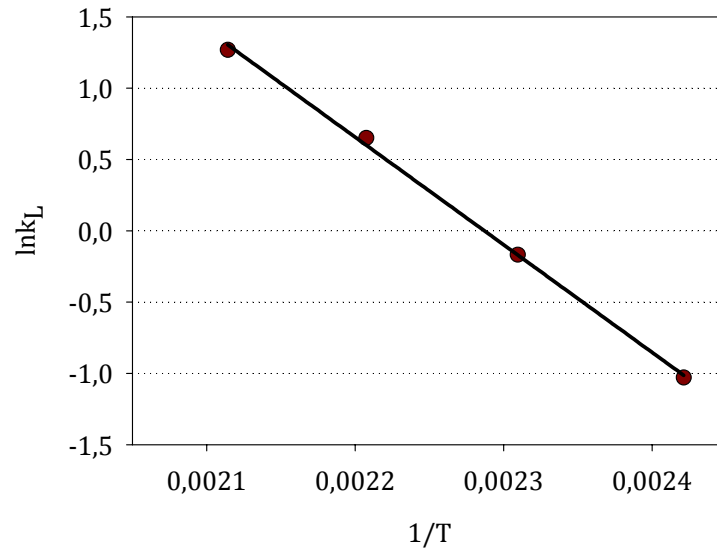
Σχήμα 3.5: Μέτρηση της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασίες 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(♦).

$$L = L_0 + k_L \cdot t \quad (\text{Εξίσωση 3.6})$$

Πίνακας 3.3: Παράγοντες της Εξ. 3.6 και R^2 για τη μεταβολή της φωτεινότητας σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.

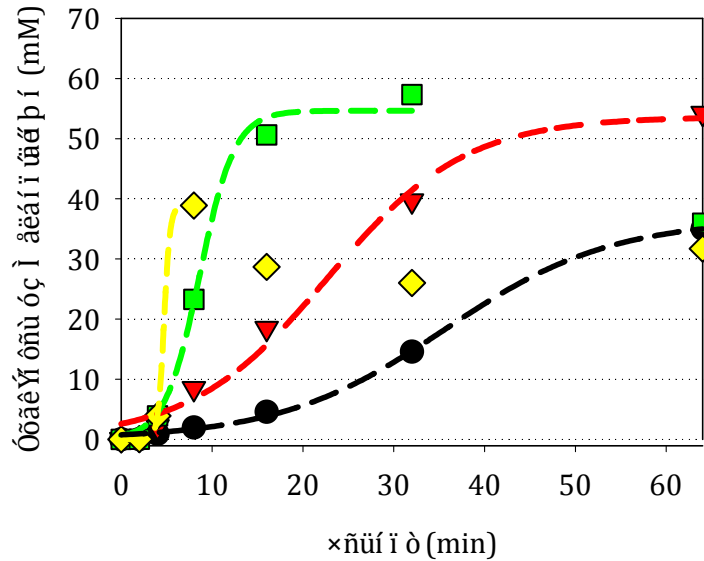
Θερμοκρασία (°C)	L_0	k_L (min ⁻¹)	R^2
L 140	60,29	-0,357	0,939
160	59,99	-0,845	0,926
180	61,81	-1,916	0,876
200	65,64	-3,554	0,896

Εφαρμόζοντας την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.2) υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης $E_a=62,73\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Σχήμα 3.6, $R^2=0,999$). Με τη στατιστική επεξεργασία επαληθεύτηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στους ρυθμούς μεταβολής του χρώματος ($F>F_{\text{crit}}$).



Σχήμα 3.6: Μεταβολή του λογαρίθμου του ρυθμού μείωσης της φωτεινότητας (k_L) συναρτήσει του αντιστρόφου του χρόνου για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης.

3.1.4. Μελέτη της παραγωγής μελανοϊδινών



Σχήμα 3.7: Εξάρτηση της παραγωγής των μελανοϊδινών από τη θερμοκρασία. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασία 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(◆).

Η συγκέντρωση των μελανοϊδινών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας όπως φαίνεται και από το διάγραμμα για τις θερμοκρασίες των 140, 160 και 180 °C (Παράρτημα). Στην περίπτωση των 180 και των 200 °C όμως η συγκέντρωση φαίνεται να αρχίζει να μειώνεται από τα 32 και 8 λεπτά, αντίστοιχα. Η μείωση αυτή είναι πλασματική. Στην πραγματικότητα, οι μελανοϊδίνες απλώς μετατρέπονται σε μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους, τα οποία είναι αδιάλυτα και εμποδίζουν τη σωστή μέτρηση της απορρόφησης (scattering effect) (Knol et al., 2005).

Για την εύρεση του ρυθμού σχηματισμού των μελανοϊδινών προσαρμόστηκαν σιγμοειδείς καμπύλες (Εξίσωση 3.7) στα πειραματικά δεδομένα.

$$c_{\text{Mel}} = \frac{a_{\text{Mel}}}{1 + \exp\left(-\frac{t - t_0}{b_{\text{Mel}}}\right)} \quad (\text{Εξίσωση 3.7})$$

όπου c_{Mel} η συγκέντρωση των μελανοϊδινών (M), t ο χρόνος (min), t_0 ο χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή του μισού της μέγιστης συγκέντρωσης των μελανοϊδινών και $1/b_{\text{Mel}}$ ο ρυθμός σχηματισμού των μελανοϊδινών (min^{-1}).

Πίνακας 3.4 : Παράγοντες της Εξ. 3.7 και R^2 για την παραγωγή των μελανοϊδινών σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.

Θερμοκρασία (°C)	α_{Mel}	$1/b_{\text{Mel}}$ (min^{-1})	t_0 (min)	R^2
140	36,6	0,11	35,6	0,998
160	53,6	0,13	22,7	0,987
180	54,6	0,52	8,66	0,994
200	38,9	3,03	4,73	0,995

Στη βιβλιογραφία, ο ρυθμός παραγωγής των μελανοϊδινών μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση μπορεί να εκφραστεί με την εξίσωση 3.8 (Weissman et al., 1993).

$$\frac{dC_{\text{Mel}}}{dt} = k \cdot C_{\text{Mel}}^n \quad (\text{Εξίσωση 3.8})$$

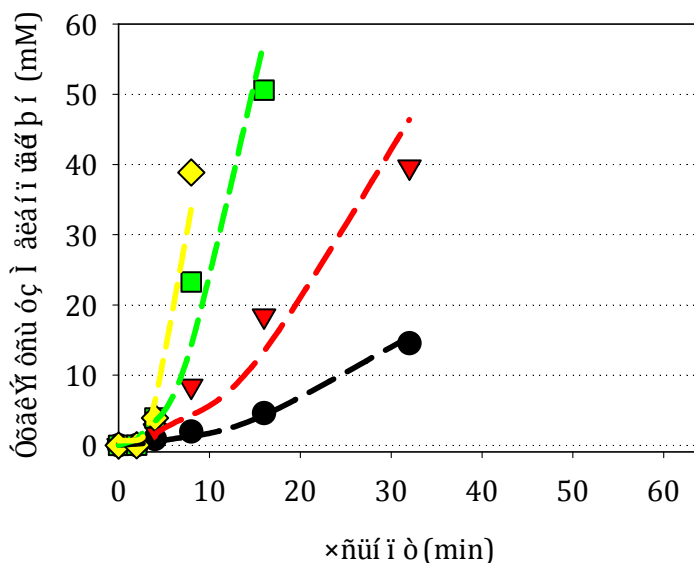
όπου C_{Mel} η συγκέντρωση των μελανοϊδινών (mM), k ο ρυθμός της αντίδρασης (min^{-1}), t ο χρόνος και n η τάξη της αντίδρασης.

Για $n=0$ η εξίσωση γίνεται $C_{\text{Mel}} - C_{\text{Mel}_0} = k_{\text{Mel}} \cdot t$

Για $n=1$ $\ln\left(\frac{C_{\text{Mel}}}{C_{\text{Mel}_0}}\right) = k_{\text{Mel}} \cdot t$

και για $n \neq 1$ $C_{\text{Mel}}^{1-n} - C_{\text{Mel}_0}^{1-n} = (1-n) \cdot k_{\text{Mel}} \cdot t$ (Εξίσωση 3.9)

Η καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα αντιστοιχεί σε τάξη αντίδρασης ίση με 0,5 (Σχήμα 3.8).



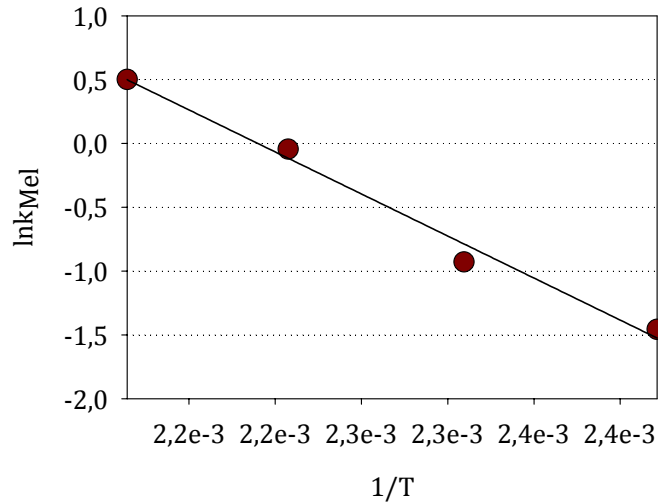
Σχήμα 3.8: Εξάρτηση της παραγωγής των μελανοϊδινών από τη θερμοκρασία για τάξη αντίδρασης ίση με 0,5. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασία 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(◆).

Σύμφωνα με τις καμπύλες προσαρμογής αυτές προκύπτουν οι παρακάτω ρυθμοί για την παραγωγή των μελανοϊδινών (Πίνακας3.5).

Πίνακας3.5: Παράγοντες της Εξ. 3.9 και R^2 για την παραγωγή των μελανοϊδινων σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.

Θερμοκρασία (°C)	k_{Mel} ($mM^{0.5} \cdot min^{-1}$)	R^2
140	0,233	0,972
160	0,395	0,932
180	0,955	0,948
200	1,651	0,935

Εφαρμόζοντας και πάλι την εξίσωση Arrhenius υπολογίζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή των μελανοϊδινών. Με βάση τους ρυθμούς παραγωγής προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 3.9).

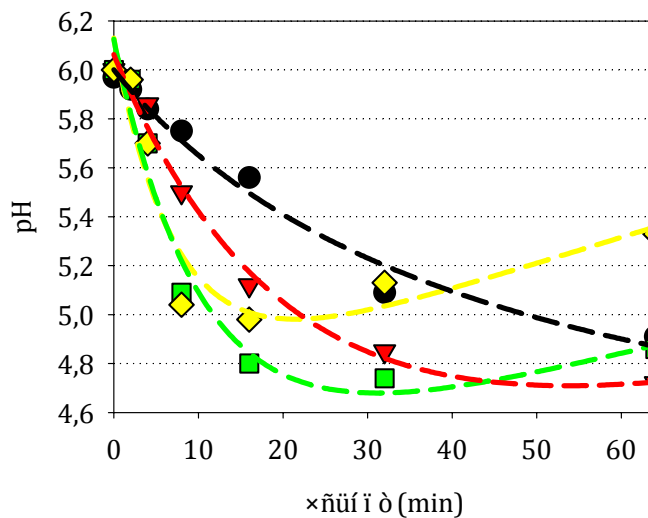


Σχήμα 3.9: Μεταβολή του λογαρίθμου του ρυθμού παραγωγής των μελανοιδινών (k_{Mel}) συναρτήσει του αντιστρόφου του χρόνου για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης.

Η εξίσωση 3.10 προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα ($R^2=0,987$). Με πολλαπλασιασμό της κλίσης της ευθείας με τη σταθερά των αερίων προκύπτει η ενέργεια ενεργοποίησης ίση με $E_a=54,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$$\ln k = -6588,8 \cdot \frac{1}{T} + 14,43 \quad (\text{Εξίσωση 3.10})$$

3.1.5. Μελέτη της μεταβολής του pH κατά την αντίδραση



Σχήμα 3.10: Μεταβολή της τιμής του pH συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι καμπύλες αντιστοιχούν σε θερμοκρασία 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(♦).

Η τιμή του pH μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας καθώς και με την πάροδο του χρόνου (Σχήμα 3.10). Ο ρυθμός μείωσης του ακρυλαμιδίου είναι μεγαλύτερος στους μικρότερους χρόνους. Χαρακτηριστικό είναι ότι για τις θερμοκρασίες των 180 και 200 °C εμφανίζεται ένα ελάχιστο στα 32 και 16 λεπτά, αντίστοιχα, ενώ στη συνέχεια η τιμή αυξάνεται μέχρι ένα μέγιστο. Στην περίπτωση μάλιστα των 200 °C η τιμή του pH είναι υψηλότερη από κάθε άλλη θερμοκρασία στο τελικό σημείο.

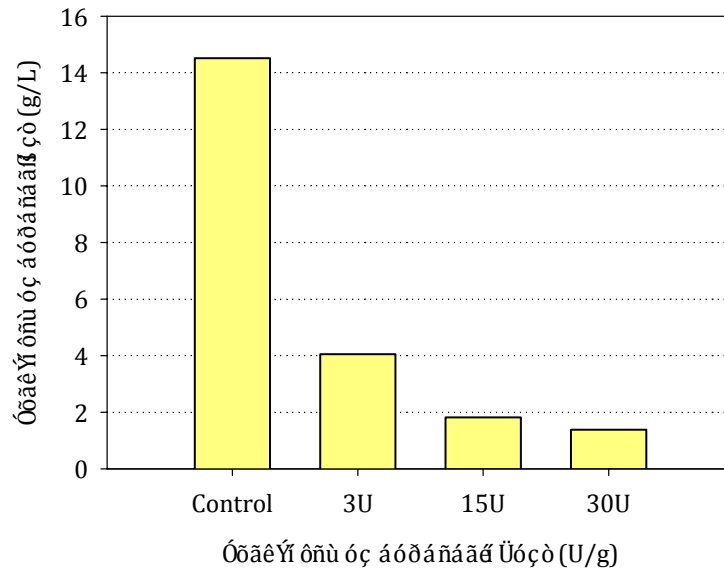
Η αύξηση του pH οφείλεται πιθανότατα στην απαμίνωση της ασπαραγίνης σε ασπαρτικό οξύ (de Vleeschouwer et al., 2008a). Ακόμη είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά τη διάλυση των αντιδρώντων στο ρυθμιστικό διάλυμα μειωνόταν κατά περίπου 0,3 μονάδες η τιμή του pH. Παρόλα αυτά αύξηση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος, θα οδηγούσε και σε αύξηση του σχηματιζόμενου ακρυλαμιδίου. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι οι αναφερόμενες τιμές του pH μετρήθηκαν όταν τα δείγματα είχαν πια κρυώσει, οπότε δεν γνωρίζουμε τις ακριβείς τιμές του κατά την πειραματική διαδικασία (Knol et al., 2010).

3.2. Μελέτη της επίδρασης του ενζύμου ασπαραγινάση στην αντίδραση ασπαραγίνης - φρουκτόζης

Η ασπαραγινάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την υδρόλυση της ασπαραγίνης προς ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν η επίδραση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του ενζύμου στο μοντέλο ασπαραγίνης - φρουκτόζης

3.2.1. Επίδραση της ασπαραγινάσης στις συγκεντρώσεις της ασπαραγίνης

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (3, 15 και 30 U/g ασπαραγίνης). Η επίδραση των τριών διαφορετικών αυτών συγκεντρώσεων στην περιεχόμενη ασπαραγίνη είναι αυτή που φαίνεται στο σχήμα 3.11.



Σχήμα 3.11: Επίδραση της προκατεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης μετά την επώαση των δειγμάτων στους 40 °C για 20 min.

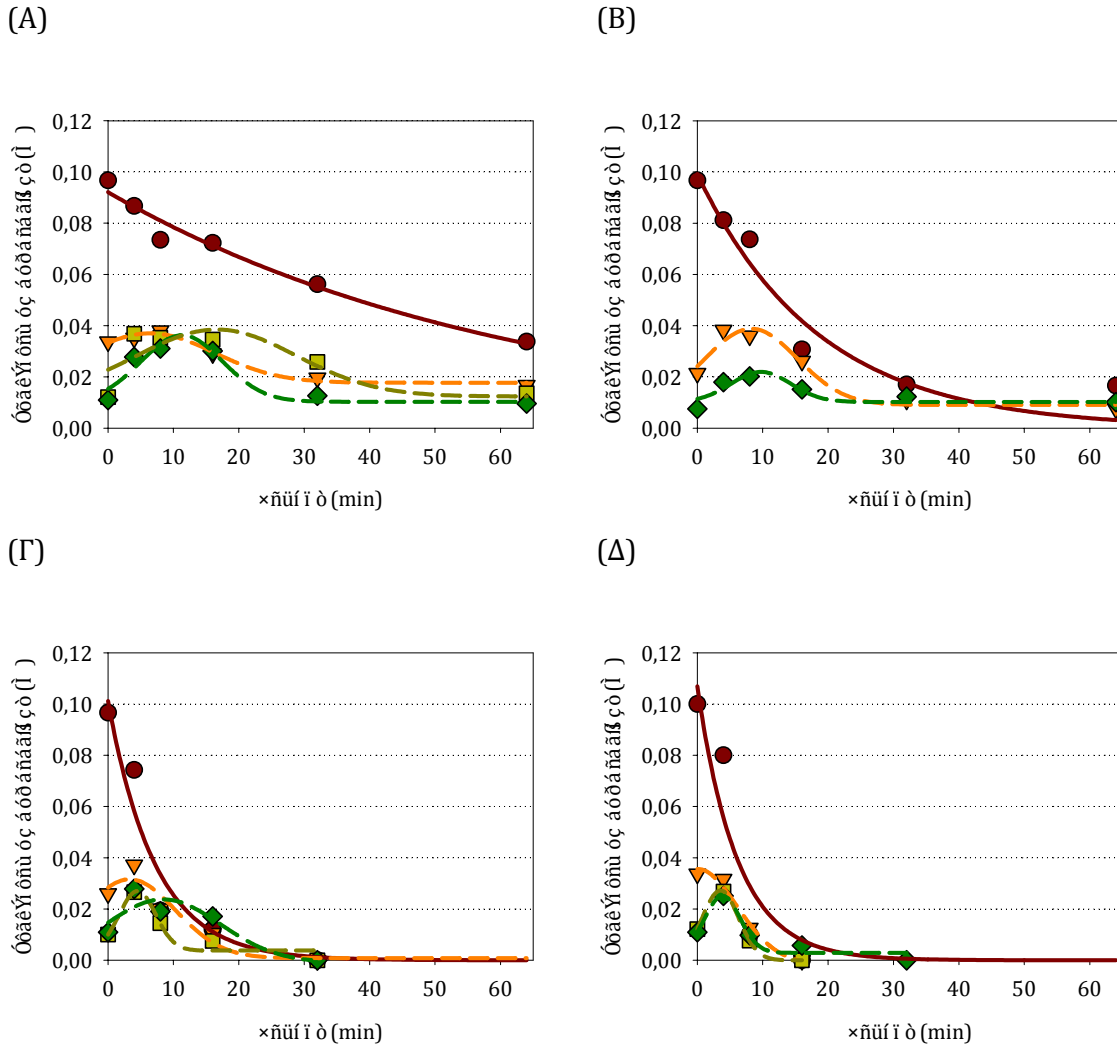
Μετρώντας την συγκέντρωση της ασπαραγίνης στα δείγματα πριν και μετά την επώαση σε υδατόλουτρο 40 °C για 20 min για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου, παρατηρούμε ότι ακόμη και η χαμηλή συγκέντρωση του ενζύμου ήταν αποτελεσματική στη μείωση της περιεχόμενης ασπαραγίνης. Συγκεκριμένα, η προσθήκη 3 U/g ασπαραγίνης οδήγησε στην ελάττωση κατά 72 % της περιεχόμενης ασπαραγίνης στο σύστημα, ενώ στα 15 και 30 U/g προκάλεσαν μείωση κατά 87 και 90 %, αντίστοιχα (Πίνακας 3.6).

Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συγκριθούν με αντίστοιχη μελέτη που έγινε από τους Ciesarova et al. (2006). Εκείνοι μελετώντας παράλληλα την επίδραση της ασπαραγινάσης, με παρόμοιες συγκεντρώσεις, σε ένα μοντέλο πατάτας αλλά και σε πραγματικές πατάτες, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με την εφαρμογή 30 U/g ασπαραγίνης η μείωση του ακρυλαμιδίου έφτασε στο 90% μετά από θέρμανση στο 180 °C για 5 min.

Πίνακας 3.6: Επίδραση της προκατεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης μετά την επώαση των δειγμάτων στους 40 °C για 20 min.

Συγκέντρωση ασπαραγινάσης (U/g ασπαραγίνης)	Μείωση της ασπαραγίνης (%)
3	72
15	87
30	90

Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα μείωσης της ασπαραγίνης σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε μία από τις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες, συγκρίνοντας κάθε φορά την επίδραση του ενζύμου στη μείωση αυτή (Σχήμα 3.12 – 3.15).



Σχήματα 3.12-3.15: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης συναρτήσεϊ του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g (▼), 15 U/g(■), 30 U/g(♦) ασπαραγινάσεϊς.

Μετά τη χρήση του ενζύμου, οι συγκεντρώσεϊς της ασπαραγίνης είναϊ αρχικά πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την αρχική συγκεντρωσεϊ των τυφλών δειγμάτων. Παρατηρήθηκε ότϊ στους πρώτους χρόνους, δηλαδή μέχρι τα 8 min για τους 140 και 160 °C και τα 4 min για τους 180 και 200 °C η συγκεντρωσεϊ της ασπαραγίνης παρουσιάζει μία αύξηση. Στη συνέχεια, και στις δύο περιπτώσεϊς η συγκεντρωσεϊ αρχίζει να μειώνεται με το χρόνο. Ο ρυθμός μειώσεϊς της ασπαραγίνης φαίνεται να είναϊ χαμηλότερος για τις δύο χαμηλές θερμοκρασίεϊς σε σχέση με τα τυφλά δείγματα. Στην περίπτωσεϊ των δύο υψηλών

θερμοκρασιών, ο ρυθμός μείωσης φαίνεται να είναι ο ίδιος για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με ένζυμο και για το τυφλό δείγμα μετά τα 8 min.

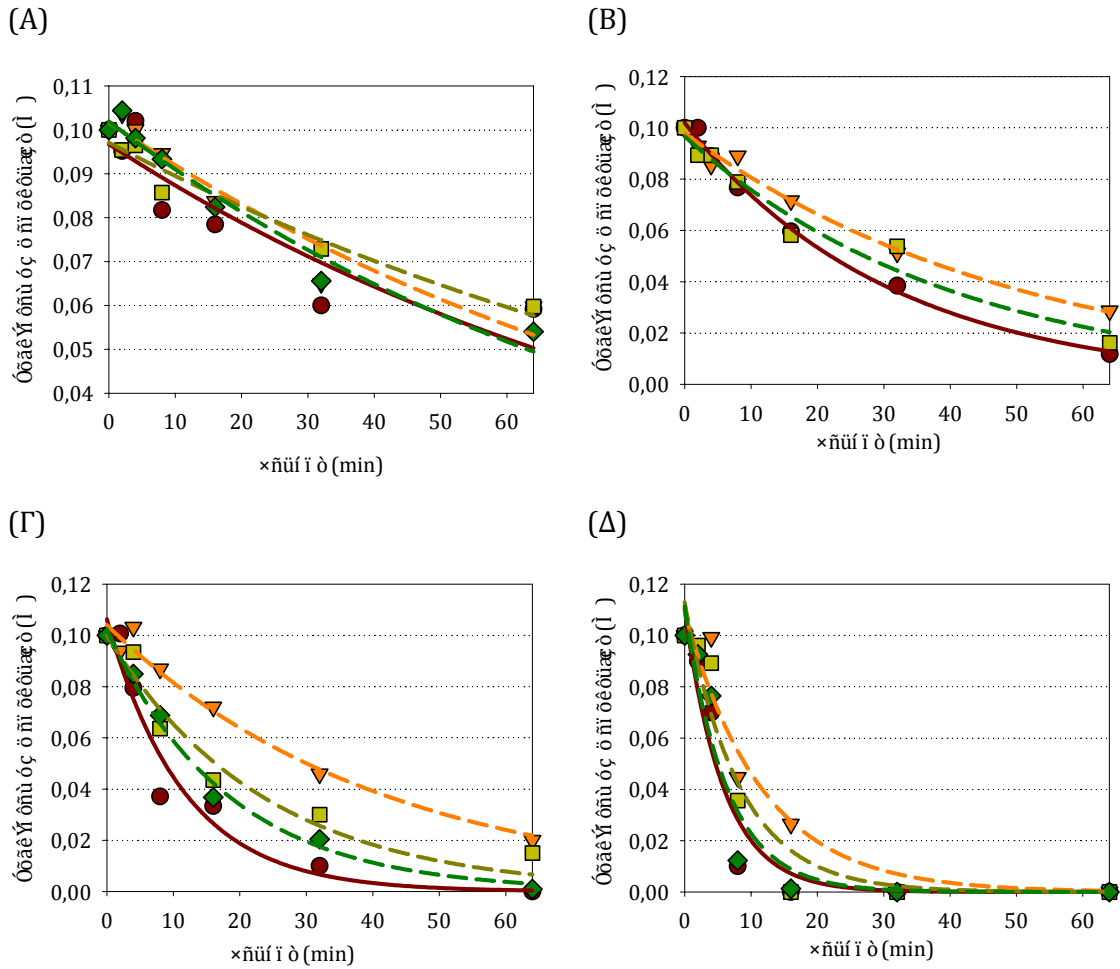
Έγινε μια προσπάθεια μοντελοποίησης των δεδομένων της μείωσης της ασπαραγίνης μετά τη χρήση του ενζύμου. Η καμπύλη που προσαρμόστηκε καλύτερα είναι η παρακάτω (Εξίσωση 3.11, Πίνακας 3.7):

$$c_{Asn} = a + b \cdot \exp \left[-0,5 \cdot \left(\frac{\ln \left(\frac{t}{t_0} \right)}{c} \right)^2 \right] \quad (\text{Εξίσωση 3.11})$$

Πίνακας 3.7: Παράγοντες της Εξ. 3.11 και R² για την μείωση της ασπαραγίνης σε δείγματα προ-επεξεργασμένα με ασπαραγινάση ενός συστήματος ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.

Συγκέντρωση						
Θερμοκρασία (°C)	ένζυμο (U/g)	b	c	t ₀	a	R ²
140	3	0,02	9,81	6,44	0,02	0,983
	15	0,03	6,24	11,29	0,01	0,910
	30	0,03	12,25	16,58	0,01	0,644
160	3	0,03	7,09	8,25	0,01	0,949
	15	-	-	-	-	-
	30	0,01	4,57	9,72	0,01	0,773
180	3	0,03	7,04	3,30	0,001	0,925
	15	0,02	2,79	4,52	0,004	0,926
	30	0,03	8,76	8,41	-0,001	0,798
200	3	0,04	6,10	0,01	-0,002	0,979
	15	0,03	2,79	3,55	0,00	0,985
	30	0,02	2,71	3,86	0,003	0,953

3.2.2. Επίδραση του ενζύμου στις συγκεντρώσεις της φρουκτόζης



Σχήμα 3.15-3.18: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της φρουκτόζης συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g (▼), 15 U/g (■), 30 U/g (◆) ασπαραγινάσης.

Η επεξεργασία με ένζυμο των δειγμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα την συγκέντρωση της φρουκτόζης κατά την πειραματική διαδικασία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διάσπαση της φρουκτόζης λόγω της θερμικής επεξεργασίας. Στην περίπτωση των 3 και 15 U/g η κατανάλωση της φρουκτόζης φαίνεται να πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό για κάθε θερμοκρασία σε σχέση με τα τυφλά δείγματα. Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία, η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ρυθμό μείωσης της φρουκτόζης δεν είναι σημαντική ($F < F_{crit}$).

Στα πειραματικά δεδομένα εφαρμόστηκαν καμπύλες που περιγράφονται από τη μαθηματική εξίσωση 3.4.

Πίνακας 3.8: Παράγοντες της Εξ. 3.4 και R^2 για τη μείωση της φρουκτόζης σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C, προεπεξεργασμένο με ασπαραγινάση.

Συγκέντρωση				
Θερμοκρασία (°C)	ενζύμου (U/g)	$a_{Fru}(M)$	$k_{Fru}(min^{-1})$	R^2
140	3	0,102	0,010	0,923
	15	0,098	0,008	0,960
	30	0,102	0,011	0,962
160	3	0,098	0,020	0,985
	15	-	-	-
	30	0,097	0,024	0,964
180	3	0,104	0,024	0,977
	15	0,100	0,043	0,952
	30	0,102	0,055	0,991
200	3	0,109	0,086	0,931
	15	0,113	0,121	0,932
	30	0,111	0,158	0,925

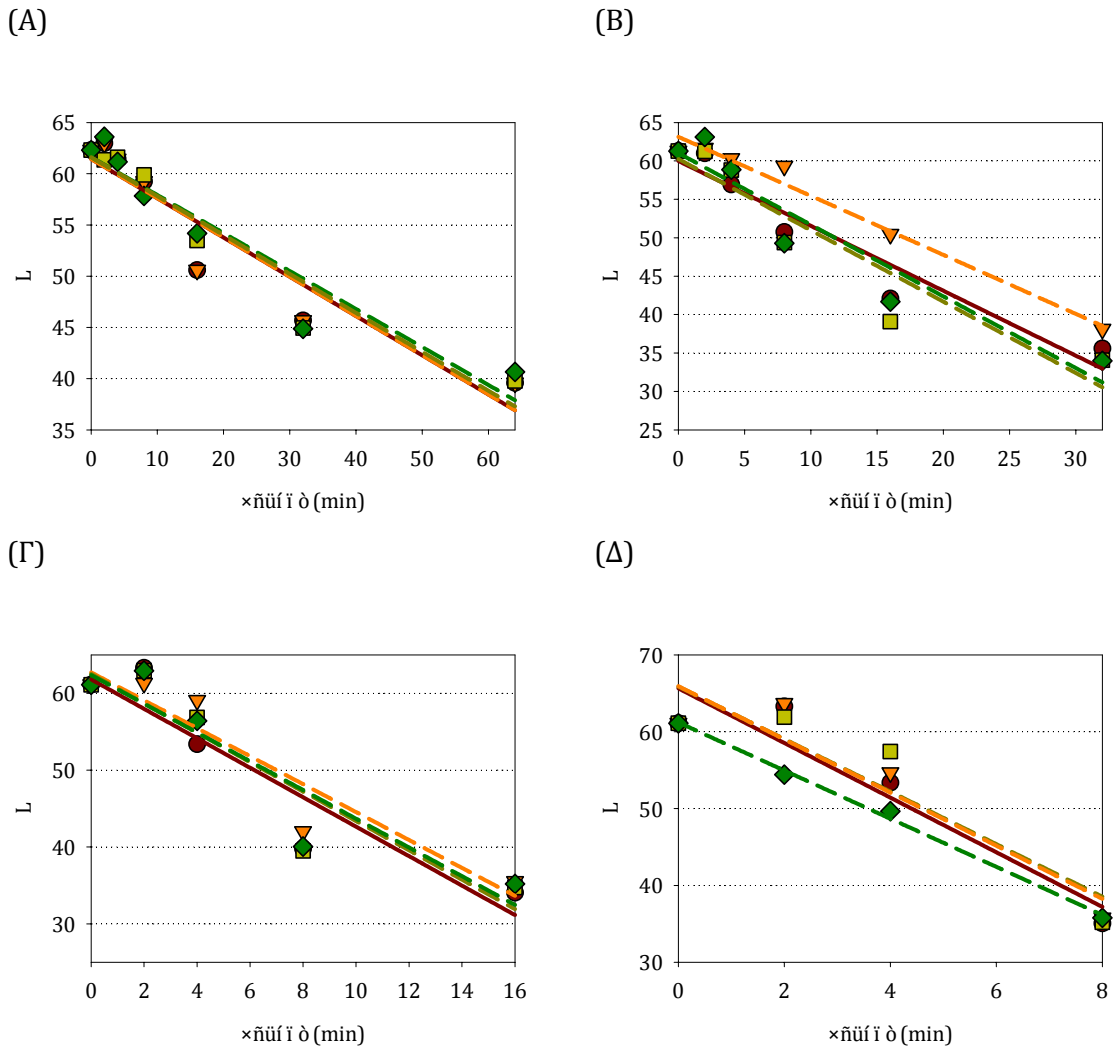
Εφαρμόζοντας την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.2) προκύπτουν οι ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (Πίνακας 3.9).

Πίνακας 3.9: Ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου, όπως αυτές προέκυψαν από την εξίσωση Arrhenius.

Συγκέντρωση ενζύμου (U/g)	$E_a (kJ \cdot mol^{-1})$	R^2
0	77,4	0,994
3	53,5	0,902
15	71,8	0,991
30	70,6	0,987

Οι τιμές των E_a είναι παρόμοιες για τις συγκεντρώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου. Η απόκλιση της τιμής της ενέργειας ενεργοποίησης των 3 U οφείλεται πιθανότατα σε πειραματικό σφάλμα.

3.2.3. Επίδραση του ενζύμου στο χρώμα



Εικόνα 3.19-3.22: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη μεταβολή της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g(▼), 15 U/g(■), 30 U/g(◆) ασπαραγινάσης.

Οι τιμές της φωτεινότητας είναι ίδιες για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με ένζυμο σε οποιαδήποτε συγκέντρωση. Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία, η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ρυθμό μεταβολής του χρώματος δεν είναι σημαντική ($F < F_{crit}$).

Για την εύρεση του ρυθμού μείωσης της φωτεινότητας προσαρμόστηκαν στα δεδομένα γραμμικές εξισώσεις (Εξίσωση 3.6, Πίνακας 3.) μέχρι το χρόνο εκείνο που ξεκινάει η δημιουργία πλατό.

Πίνακας 3.10: Παράγοντες της Εξ. 3.6 και R^2 για τη μεταβολή της φωτεινότητας σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C, προ-επεξεργασμένο με ασπαραγινάση.

Συγκέντρωση				
Θερμοκρασία (°C)	ενζύμου (U/g)	L_0	k_L (min⁻¹)	R^2
140	3	61,44	-0,383	0,902
	15	61,60	-0,380	0,929
	30	61,62	-0,371	0,910
160	3	63,13	-0,769	0,979
	15	60,24	-0,928	0,888
	30	61,01	-0,932	0,908
180	3	62,71	-1,817	0,895
	15	62,49	-1,912	0,864
	30	61,81	-1,916	0,876
200	3	65,92	-3,460	0,879
	15	65,87	-3,418	0,855
	30	61,20	-3,131	0,996

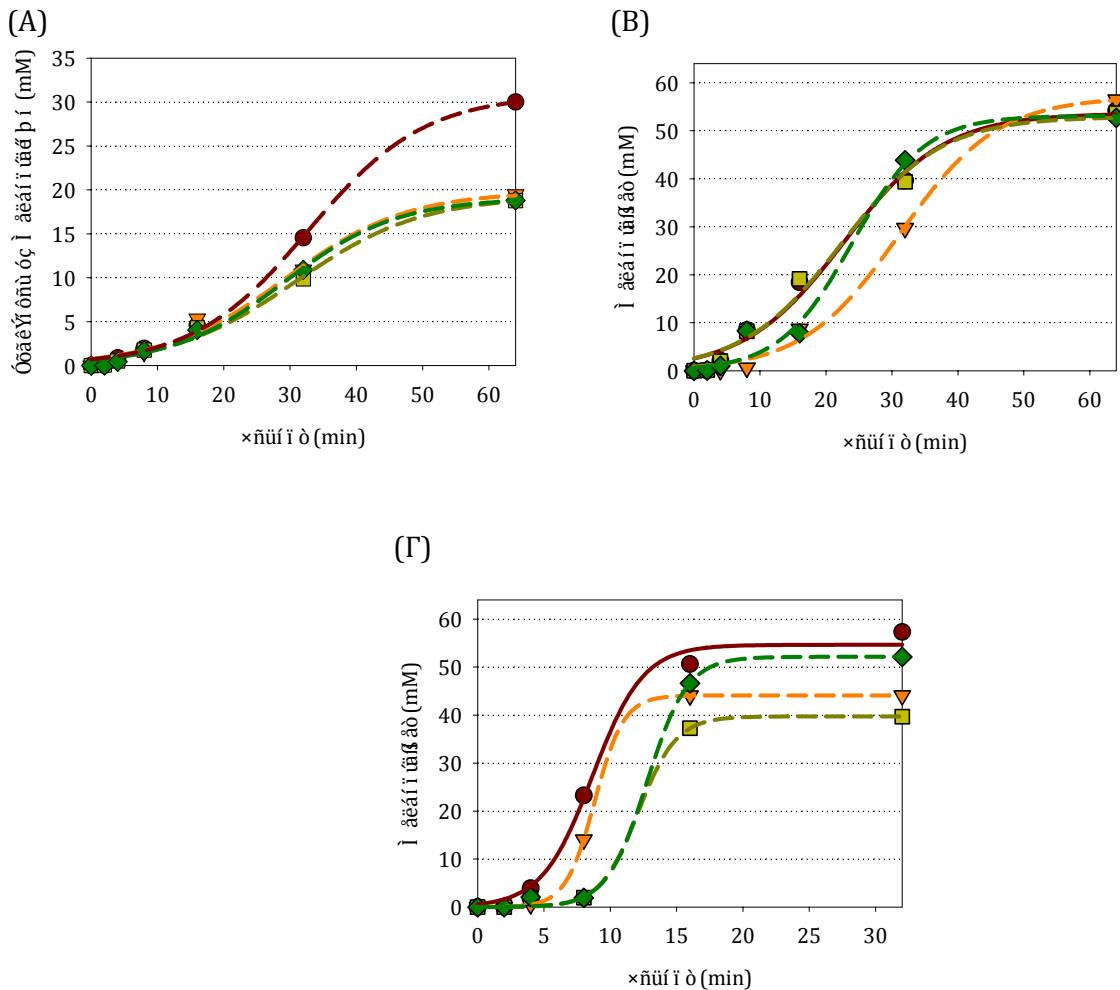
Εφαρμόζοντας την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.2) προκύπτουν οι ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11: Ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου, όπως αυτές προέκυψαν από την εξίσωση Arrhenius.

Συγκέντρωση ενζύμου (U/g)	E_a (kJ·mol ⁻¹)	R^2
0	62,75	0,999
3	60,55	0,997
15	59,53	0,997
30	58,06	0,991

Οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης δεν διαφέρουν μεταξύ τους για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου.

3.2.4. Επίδραση του ενζύμου στη συγκέντρωση των μελανοϊδινών



Σχήμα 3.23-3.25: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση των μελανοϊδινών συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β) και 180 °C (Γ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g (▼), 15 U/g (■), 30 U/g (◆) ασπαραγινάσης.

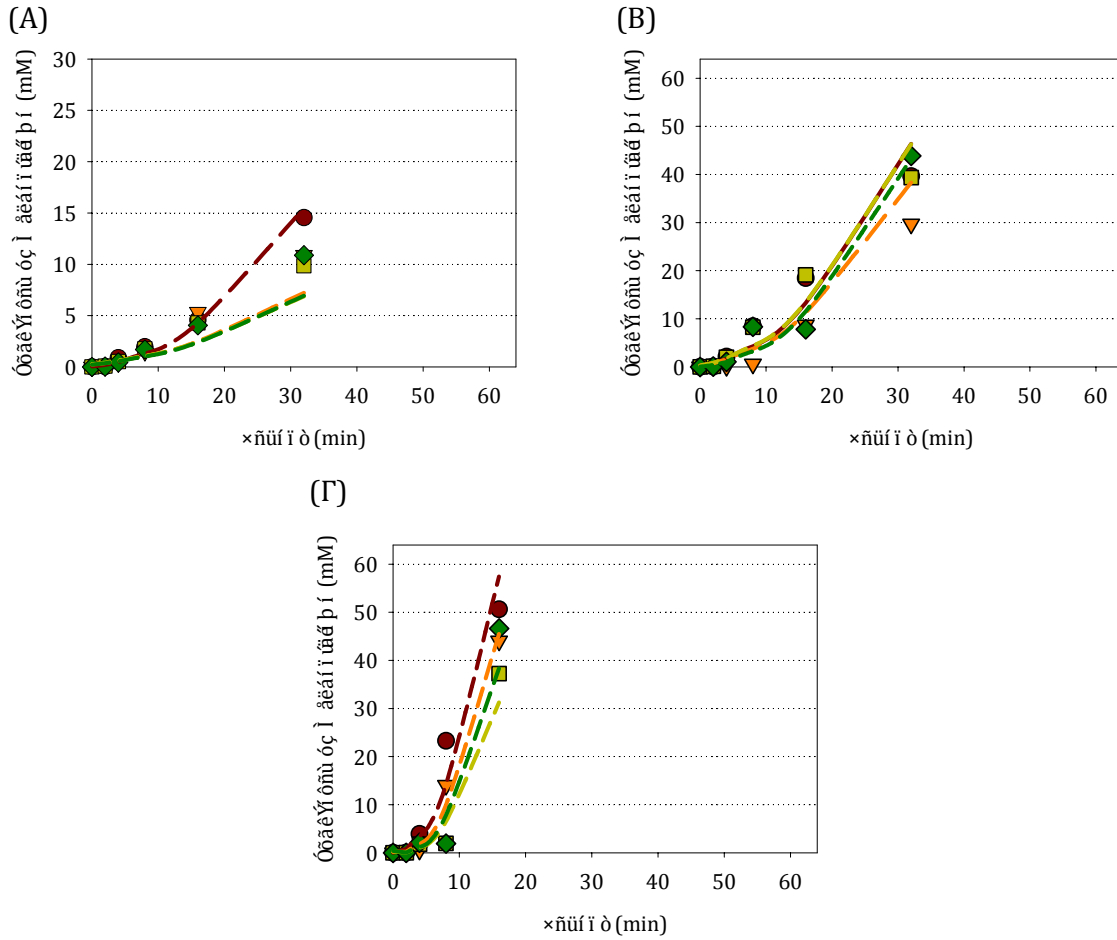
Η συγκέντρωση των μελανοϊδινών παραμένει σταθερή για τα δείγματα χωρίς ένζυμο και για τα επεξεργασμένα δείγματα στους 140 και 160 °C. Αντίθετα, στην περίπτωση των 180 °C η συγκέντρωση παρουσιάζει μία μείωση για τα επεξεργασμένα δείγματα, με την μεγαλύτερη ελάττωση να παρουσιάζεται στα δείγματα με συγκέντρωση ασπαραγινάσης 15 U/g.

Για την κινητική μελέτη της παραγωγής των μελανοϊδινών προσαρμόστηκαν σιγμοειδείς καμπύλες (Εξίσωση 3.7, Σχήματα 3.23 – 3.25) και οι καμπύλες για τάξη της αντίδρασης ίση με 0,5 (Εξίσωση 3.9, Διαγράμματα 3.26 – 3.28).

Οι σταθερές που προκύπτουν για τις σιγμοειδείς καμπύλες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.12:

Πίνακας 3.12: Παράγοντες της Εξ. 3.7 και R^2 για την παραγωγή των μελανοϊδινών σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C, προ-επεξεργασμένο με ασπαραγινάση.

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση				
	ενζύμου (U/g)	a_{Mel}	$1/b_{Mel}$	t_0	R^2
140	3	19,79	0,110	29,30	0,985
	15	19,27	0,106	30,99	0,991
	30	19,04	0,118	29,16	0,994
160	3	57,05	0,135	31,21	0,996
	15	52,92	0,133	22,35	0,986
	30	53,14	0,182	23,97	0,987
180	3	44,09	0,909	8,84	0,999
	15	39,72	0,694	12,12	0,998
	30	52,15	0,662	12,78	0,999



Σχήματα 3.26 - 3.28: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση των μελανοιδινών συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β) και 180 °C (Γ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g(▼), 15 U/g(■), 30 U/g(◆) ασπαραγινάσης.

Σύμφωνα με τις καμπύλες προσαρμογής αυτές, οι ρυθμοί παραγωγής των μελανοιδινών για την κάθε θερμοκρασία και την κάθε συγκέντρωση ενζύμου είναι αυτές που φαίνονται στον πίνακα 3.13.

Πίνακας 3.13: Παράγοντες της Εξ. 3.9 και R^2 για την παραγωγή των μελανοϊδίων σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C προ-επεξεργασμένο με ασπαραγινάση.

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση ενζύμου (U/g)	k_{MeI} ($mM^{0,5} \cdot min^{-1}$)	R^2
140	3	0,139	0,903
	15	0,132	0,923
	30	0,136	0,915
160	3	0,355	0,982
	15	0,393	0,934
	30	0,398	0,944
180	3	0,901	0,968
	15	0,762	0,922
	30	0,852	0,908

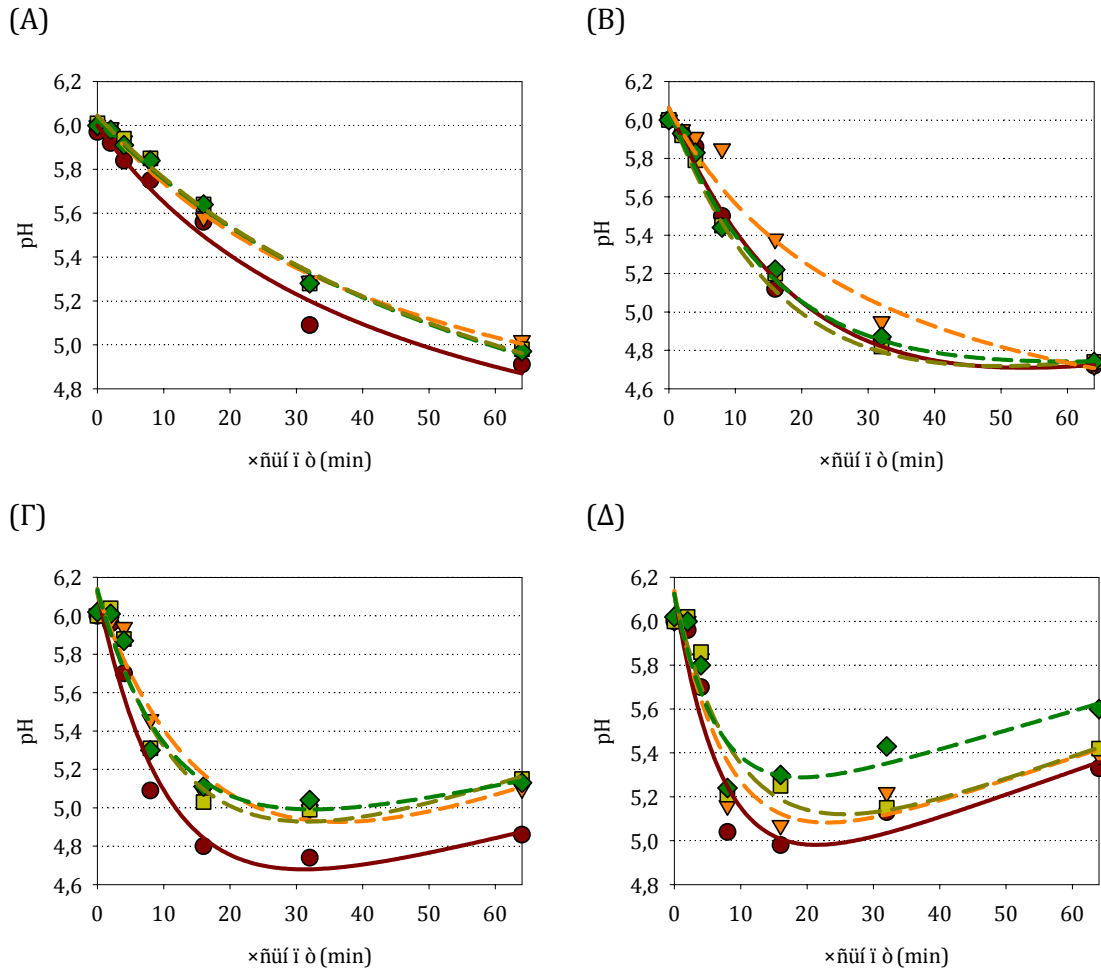
Εφαρμόζοντας την εξίσωση Arrhenius (Εξίσωση 3.2) προκύπτουν οι ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.14: Ενέργειες ενεργοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου, όπως αυτές προέκυψαν από την εξίσωση Arrhenius.

Συγκέντρωση ενζύμου (U/g)	E_a ($kJ \cdot mol^{-1}$)	R^2
0	54,8	0,987
3	72,6	0,999
15	68,4	0,987
30	71,5	0,995

Στην περίπτωση αυτή οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης αυξάνονται για τα δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με ένζυμο σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα.

3.2.5. Επίδραση του ενζύμου στο pH



Σχήμα 3.29 - 3.32: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στην τιμή του pH συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g(▼), 15 U/g(■), 30 U/g(◆) ασπαραγινάσης.

Οι τιμές του pH δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές στην περίπτωση των 140 και 160 °C. Αντίθετα, στις υψηλότερες θερμοκρασίες, το pH φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά με τα τυφλά δείγματα, με μείωση στους αρχικούς χρόνους και αύξηση μετά τα 32 και 16 min για τους 180 και 200 °C, αντίστοιχα, αλλά τα επεξεργασμένα με ένζυμο δείγματα εμφανίζουν υψηλότερο ελάχιστο. Παρόλα αυτά οι διαφορές παραμένουν μικρές.

Κεφάλαιο 4^ο

4.1 Γενικά συμπεράσματα

Η ασπαραγίνη αποτελεί το κυρίαρχο αμινοξύ σε πολλά τρόφιμα όπως τα δημητριακά και οι πατάτες. Έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το βασικό παράγοντα παραγωγής ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα που επεξεργάζονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100 °C, κυρίως μέσω της αντίδρασης Maillard. Η αντίδραση Maillard, περιγράφει την αντίδραση μεταξύ αμινοξέων και σακχάρων, μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος προς την παραγωγή προϊόντων, ανάμεσα στα οποία είναι και οι μελανοΐδινες.

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες με εναλλακτικούς τρόπους για τη μείωση του ακρυλαμιδίου, οι οποίοι περιλαμβάνουν από παρεμβάσεις στο αρχικό προϊόν τη στιγμή της παραγωγής του, μέχρι οδηγίες προς τους καταναλωτές για τον τρόπο επεξεργασίας των τροφίμων. Ανάμεσα στις μεθόδους αυτές είναι και η εφαρμογή της ασπαραγινάσης, η οποία υδρολύει την ασπαραγίνη σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία και εφαρμόζεται ήδη σε βιομηχανική κλίμακα σε προϊόντα όπως τα μπισκότα, το ψωμί και διάφορα σνακ δημητριακών.

Με αφορμή δύο μελέτες, μία των Knol et al. (2010), οι οποίοι μελέτησαν κινητικά ένα μοντέλο ασπαραγίνης – φρουκτόζης ως προς την παραγωγή του ακρυλαμιδίου αλλά και ως προς τις ιδιότητες του συστήματος (συγκεντρώσεις αντιδρώντων, pH, χρώμα, παραγωγή μελανοΐδινών και φορμικού οξέος) και μία δεύτερη των Ciesarova et al. (2006), οι οποίοι μελέτησαν τη δράση του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις είτε σε σύστημα μοντέλου είτε σε προϊόν πατάτας, σχεδιάστηκε η παρούσα διπλωματική εργασία. Στόχος λοιπόν της εργασίας αυτής ήταν σε πρώτη φάση η μελέτη της αντίδρασης Maillard μεταξύ της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης σε υψηλές θερμοκρασίες από 140 έως 200 °C και σε δεύτερη η μελέτη της αντίδρασης Maillard μετά από προκατεργασία των δειγμάτων με ασπαραγινάση ως μεθόδου ελέγχου του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν οι συγκεντρώσεις της ασπαραγίνης, της φρουκτόζης και των μελανοΐδινών, το pH και το χρώμα σε διάφορους χρόνους για τις θερμοκρασίες αυτές.

Προετοιμάστηκαν ισομοριακά διαλύματα φρουκτόζης – ασπαραγίνης συγκέντρωσης 0,1M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6. Τα διαλύματα αυτά θερμάνθηκαν στους 140, 160, 180 και 200 °C σε ελαιόλουτρο για 2, 4, 8, 16, 32 και 64 min. Για τη μελέτη του συστήματος αυτού, έγινε σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας έτσι ώστε να μειωθεί όσο το δυνατό περισσότερο ο χρόνος της μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας των δειγμάτων μέχρι να προσεγγίσουν την επιθυμητή. Αυτό επιτεύχθηκε με την προθέρμανση τους σε ένα δεύτερο ελαιόλουτρο, που λειτουργούσε σταθερά στους 220 °C.

Κατά τη θέρμανση του συστήματος ασπαραγίνης – φρουκτόζης μειώθηκε η συγκέντρωση και των δύο αντιδρώντων συναρτήσει του χρόνου. Όπως ήταν αναμενόμενο, με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξήθηκε ο ρυθμός μείωσης των αντιδρώντων k_{Asn} και k_{Fru} (Διαγράμματα 3.1 και 3.3). Η μείωση της ασπαραγίνης είναι αποτέλεσμα τουλάχιστον των εξής τριών παραγόντων: της αντίδρασης με τη φρουκτόζη στα αρχικά στάδια της αντίδρασης Maillard, της αναγέννησης της αμινομάδας στα ενδιάμεσα στάδια και της ενσωμάτωσης της αμινομάδας στις μελανοϊδίνες στο τελικό στάδιο. Από την άλλη πλευρά, η μείωση της φρουκτόζης οφείλεται στην αντίδραση με την ασπαραγίνη καθώς και στην ισορροπία της με τη γλυκόζη. Οι ενέργειες ενεργοποίησης υπολογίστηκαν για την ασπαραγίνη και τη φρουκτόζη σε 66,8 και 77,4 kJ·mol⁻¹, αντίστοιχα.

Η αντίδραση Maillard συνήθως μελετάται μέσω της πορείας της αμαύρωσης, που προέρχεται από τη δημιουργία των μελανοϊδινών στα τελευταία στάδια της αντίδρασης. Παρόλα αυτά, μέρος της αμαύρωσης οφείλεται και στην καραμελοποίηση, όταν η αντίδραση γίνεται μεταξύ σακχάρων και αμινοξέων. Η καραμελοποίηση οφείλεται στα προϊόντα υποβάθμισης των σακχάρων, τα οποία πολυμερίζονται χωρίς τη συμμετοχή των αμινοξέων. Κατά τη μέτρηση των μελανοϊδινών έγινε η παραδοχή ότι η αμαύρωση οφείλεται στην περιεκτικότητα σε μελανοϊδίνες και όχι στην καραμελοποίηση, θεωρώντας τη συμβολή της στην αμαύρωση αμελητέα. Παρόμοιες παραδοχές έχουν γίνει και από τους Knol et al. (2005) αλλά και από τους De Vleescheeschouwer et al (2008) που μελέτησαν σύστημα ασπαραγίνης – γλυκόζης. Στην παρούσα εργασία, ο σχηματισμός των μελανοϊδινών αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου (Διαγράμματα 3.7 - 3.8). Στην περίπτωση των 180 και των 200 °C όμως η συγκέντρωση φαίνεται να αρχίζει να μειώνεται από τα 32 και 8 λεπτά. Η μείωση

αυτή είναι πλασματική. Στην πραγματικότητα, οι μελανοΐδινες απλώς μετατρέπονται σε μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους, τα οποία είναι αδιάλυτα και εμποδίζουν την σωστή μέτρηση της απορρόφησης. Για τη μαθηματική περιγραφή της παραγωγής των μελανοΐδινών με το χρόνο επεξεργασίας, εφαρμόστηκαν δύο εναλλακτικά μοντέλα, η εξίσωση 3.7 που εκφράζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης των μελανοΐδινών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, και η εξίσωση 3.8 για αντίδραση τάξης $n=0,5$, μία προσέγγιση που χρησιμοποιείται για συστήματα αντίδρασης Maillard (Weissman et al., 1993).

$$c_{\text{Mel}} = \frac{a_{\text{Mel}}}{1 + \exp\left(-\frac{t - t_0}{b_{\text{Mel}}}\right)} \quad (\text{Εξίσωση 3.7})$$

$$\text{για } n = 0,5 \quad c_{\text{Mel}}^{1-n} - c_{\text{Mel}}^{1-n} = (1-n) \cdot k_{\text{Mel}} \cdot t \quad (\text{Εξίσωση 3.9})$$

Υπολογίστηκαν οι ρυθμοί $1/b_{\text{Mel}}$ και k_{Mel} με ενέργεια ενεργοποίησης ίση με $54,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

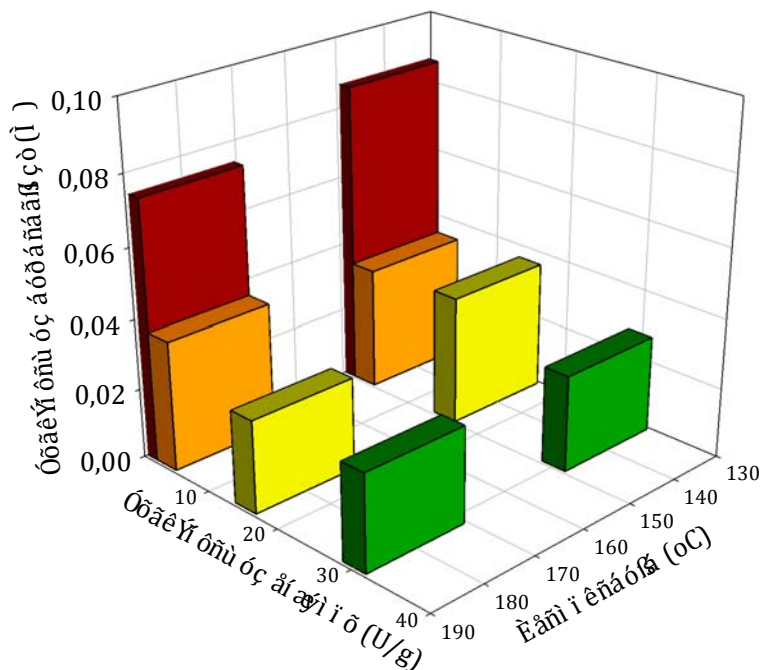
Όσον αφορά στο χρώμα, ο παράγοντας που ανταποκρίθηκε καλύτερα στα πειραματικά μας δεδομένα ήταν η φωτεινότητα. Παρατηρήθηκε μείωση της με το χρόνο και σταθεροποίηση της στην τιμή 35. Για την μαθηματική μοντελοποίηση της μεταβολής της φωτεινότητας χρησιμοποιήθηκαν γραμμικές εξισώσεις, ενώ η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε σε $62,73 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($R^2=0,999$).

Στη δεύτερη φάση της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε η ασπαραγινάση στο ίδιο σύστημα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (3, 15 και 30 U/g ασπαραγίνης). Η επίδραση της ασπαραγινάσης αμέσως μετά την επώαση (θερμοκρασία $40 \text{ }^\circ\text{C}$, χρόνος 20 min) ήταν πολύ σημαντική ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6:

Πίνακας 3.6 : Επίδραση της συγκέντρωσης της ασπαραγινάσης στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης μετά την επώαση στους $40 \text{ }^\circ\text{C}$ για 20 min.

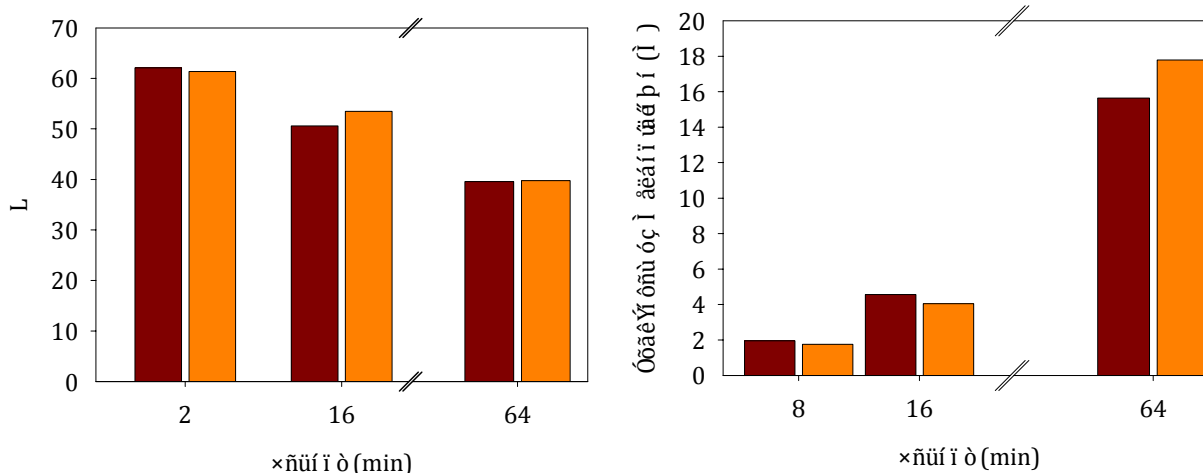
Συγκέντρωση ασπαραγινάσης (ASNU/g ασπαραγίνης)	Μείωση της Ασπαραγίνης (%)
3	72
15	87
30	90

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται ενδεικτικά η συγκέντρωση της ασπαραγίνης για το σύστημα ασπαραγίνης - φρουκτόζης με και χωρίς την προσθήκη του ενζύμου (0, 3, 15 και 30 U/g) μετά από επεξεργασία του σε θερμοκρασίες 140 και 180 °C και χρόνο 4 min. Επιβεβαιώθηκε ότι η συγκέντρωση της ασπαραγίνης στο σύστημα ασπαραγίνης - φρουκτόζης με την προσθήκη του ενζύμου παραμένει σημαντικά μειωμένη κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και ότι ο ρυθμός κατανάλωσης της ασπαραγίνης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και στα δύο συστήματα (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1: Επίδραση της συγκέντρωσης της ασπαραγινάσης (0, 3, 15 και 30 U) στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης για τις θερμοκρασίες των 140 και 180 °C μετά από 4 min.

Ενώ η επίδραση της ασπαραγινάσης ήταν σημαντική στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης, δεν φάνηκε να μεταβάλλει τις υπόλοιπες ιδιότητες του συστήματος. Χαρακτηριστικά, παρουσιάζεται η μεταβολή της φωτεινότητας και της συγκέντρωσης των μελανοϊδινών για τη συγκέντρωση των 15 U σε σχέση με το δείγμα χωρίς την επεξεργασία του ενζύμου στους 140 °C (Σχήμα 4.2-4.3).

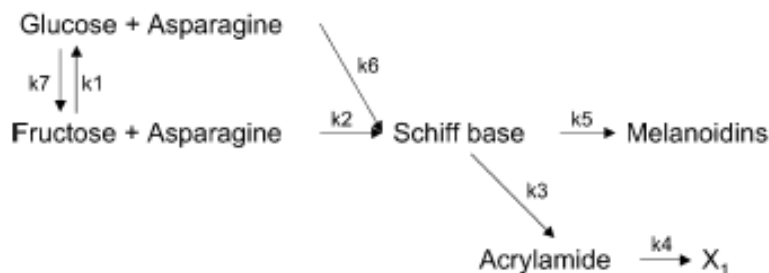


Σχήμα 4.2 - 4.3: Σύγκριση (Α) της φωτεινότητας και (Β) της συγκέντρωσης των μελανοϊδινών σε σύστημα ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M μετά από θέρμανση στους 140 °C χωρίς προεπεξεργασία με ασπαραγινάση (κόκκινες μπάρες) και με προεπεξεργασία με 15 U/g ασπαραγινάση (πορτοκαλί μπάρες).

Τα δύο δείγματα δεν διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά σε καμία από τις παραπάνω παραμέτρους. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι αναμένεται με τη χρήση του ενζύμου σε κάποιο τρόφιμο να μην επηρεάζονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Anese et al., 2011; Kukurova et al., 2009; Ciesarova & Kukurova, 2010).

4.2 Πρόβλεψη για τη μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου

Ένας από τους πιθανότερους μηχανισμούς παραγωγής του ακρυλαμιδίου είναι μέσω της αντίδρασης Maillard. Ο μηχανισμός αυτός είναι αρκετά πολύπλοκος. Με βάση άλλες μελέτες, οι Knol et al. (2010), κατέληξαν σε ένα πιο απλοποιημένο μηχανισμό παραγωγής του ακρυλαμιδίου (Εικόνα 4.1). Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται στην απαλοιφή των ενδιάμεσων σταδίων της αντίδρασης Maillard που είναι δύσκολο να μετρηθούν και χρησιμοποιεί τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων αλλά και των προϊόντων, δηλαδή της φρουκτόζης, της ασπαραγίνης, των μελανοϊδινών και του ακρυλαμιδίου. Επίσης, λαμβάνει υπόψη του και την ισορροπία μεταξύ φρουκτόζης και γλυκόζης, την αντίδραση της παραγόμενης γλυκόζης με την ασπαραγίνη και τη διάσπαση του ακρυλαμιδίου στις μεγάλες θερμοκρασίες.



Εικόνα 4.1: Απλοποιημένος μηχανισμός παραγωγής ακρυλαμιδίου (Knol et al., 2010)

Κατά την προσθήκη της ασπαραγινάσης μειώνεται η συγκέντρωση της ασπαραγίνης, αφού υδρολύεται σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Λαμβάνοντας υπόψη τις ισορροπίες του απλοποιημένου μηχανισμού, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι μειώνοντας τη συγκέντρωση της ασπαραγίνης, μειώνεται η συγκέντρωση του ενδιάμεσου προϊόντος (βάση Schiff) με αποτέλεσμα να ελαττώνεται και η συγκέντρωση των μελανοϊδινών και του ακρυλαμιδίου.

Κατά την πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε πτώση της συγκέντρωσης της ασπαραγίνης μετά τη χρήση του ενζύμου. Αυτό όμως δεν φάνηκε να επηρεάζει ούτε το ρυθμό αλλά ούτε και το ποσοστό μείωσης της φρουκτόζης. Παράλληλα, η συγκέντρωση των παραγόμενων μελανοϊδινών παρέμεινε σταθερή. Αναμένεται, λοιπόν η παραγωγή της βάσης Schiff να μειώνεται, αλλά το προϊόν αυτό να τείνει κυρίως προς την παραγωγή των μελανοϊδινών και όχι προς την παραγωγή του ακρυλαμιδίου, επιτυγχάνοντας έτσι σημαντική μείωση του.

Η χρήση του ενζύμου στο σύστημα ασπαραγίνης – φρουκτόζης προκάλεσε μείωση της περιεχόμενης ασπαραγίνης έως 90%. Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα αυτό με παρόμοιες μελέτες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μείωση του ακρυλαμιδίου θα είναι σημαντική. Από τις πιο χαρακτηριστικές περιπτώσεις τέτοιων εργασιών είναι αυτή των Ciesarova et al. (2006). Στην εργασία αυτή, η χρήση παρόμοιων συγκεντρώσεων ασπαραγινάσης σε μοντέλο πατάτας (μίγμα φρουκτόζης, γλυκόζης, σουκρόζης, ασπαραγίνης και αμύλου), προκάλεσαν μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου μέχρι και 90 % μετά από τη θέρμανση των δειγμάτων στους 180 °C για 20 min. Αντίστοιχα, στη μελέτη των Kukurova et al. (2009), η επίδραση των 15 U/g ασπαραγίνης σε μήτρα δημητριακών προκάλεσε μείωση του ακρυλαμιδίου κατά 25 % σε σχέση με το δείγμα που δεν

περιείχε το ένζυμο, μετά από θέρμανση στους 190 °C για 15 min, ενώ η δεκαπλάσια συγκέντρωση ενζύμου προκάλεσε μείωση έως 96 % για τις ίδιες συνθήκες.

Η παραπάνω υπόθεση μείωσης του ακρυλαμιδίου μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση και του ακρυλαμιδίου με μέθοδο LC-MS. Οι μετρήσεις αυτές δεν πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, αλλά μπορούν να αποτελέσουν αφετηρία για τη συνέχιση της μελέτης.

Σε επόμενη μελέτη, θα ήταν χρήσιμο να μετρηθούν εκτός από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των μελανοϊδινών, οι συγκεντρώσεις του ασπαρτικού οξέος, της αμμωνίας, της γλυκόζης και του ακρυλαμιδίου. Με τον τρόπο αυτό θα μπορέσει να γίνει ένα πιο συγκεκριμένο μοντέλο παραγωγής του ακρυλαμιδίου. Ακόμη, ενδιαφέροντα αποτελέσματα θα παρουσίαζε η εφαρμογή της μεθόδου σε μία μήτρα τροφίμου, όπως μήτρα πατάτας, μπισκότων ή δημητριακών.

Βιβλιογραφία

- Ames, J , Bailey, RJ, Mann, J 1998. Recent advances in the analysis of coloured Maillard reaction products. In *The Maillard reaction in foods and medicine* (eds: J O'Brien, H:E Nursten, M James, C Crabbe, J. Ames), The Royal Society Chemistry, 76-82.
- Amrein T.M., Andres L., Escher F., Amado R. 2007. Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options, *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 24 (S1), 13-25.
- Anese M., Bortolomeazzi R., Manzocco L., Manzano M., Giusto C. and Nicoli M. C. 2009. Effect of chemical and biological dipping on acrylamide formation and sensory properties in deep-fried potatoes. *Food Research International*, 42, 142–147.
- Anese M., Quarta B., Frias J. 2011. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits, *Food Chemistry* 126, 435-440.
- Baisier W. M. and Labuza T. P. 1992. Maillard Browning Kinetics in a Liquid Model System, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(5), 707-713.
- Biedermann M., Biedermann-Brem S., Noti A. and Grob K. Two GC-MS Methods for the Analysis of Acrylamide in Foodstuffs, Official Food Control Authority of the Canton of Zürich, Zurich.
- Blank I. 2005. Current Status of Acrylamide Research in Food: Measurement, Safety Assessment and Formation, *New York Academy of Sciences* 1043, 30-40.
- Blank I., Robert F., Goldmann T., Pollien P., Varga N., Devaud S., Saucy F., Huynh-Ba T. and Stadler R. H. 2005. Mechanisms Of Acrylamide Formation, Maillard induced transformation of asparagine, *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, edited by Friedman and Mottram, Springer Science + Business Media, Inc., 171-189.
- Brathen E. and Knutsen S. H. 2005. Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread, *Food Chemistry* 92, 693–700.

- Capuano E., Ferrigno A., Acampa I., Serpen A., Acar O. C., Gokmen V. and Fogliano V. 2009. Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies, *Food Research International* 42, 1295–1302.
- CIAA (Confederation of the Food and Drink Industries of EU) 2009. *The CIAA Acrylamide Toolbox*
- Ciesarova Z., Kiss E. and Boegl P. 2006. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products, *Journal of Food and Nutrition Research* 45(4), 141-146.
- Ciesarova Z., Kukurova K. and Benesova C. 2010. Enzymatic elimination of acrylamide in potato-based thermally treated foods, *Nutrition & Food Science* 40 (1), 55- 63.
- Ciesarova Z., Kukurova K., Bednarikova A., Markova L. and Baxa S. 2009. Improvement of Cereal Product Safety by Enzymatic Way of Acrylamide Mitigation, *Czech Journal of Food Science* 27, Special Issue, S96-S98.
- Claeys W.L., Vleeschouwer K., Hendrickx M.E. 2005. Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an Asparagine – Sugar model system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9999-10005.
- Claus A., Carle E. and Schieber A. 2008. Acrylamide in cereal products: A review, *Journal of Cereal Science* 47, 118–133.
- Dean J. A. 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill, 15th Edition.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2011. Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment, *EFSA Journal* 9(4):2133.
- Eichner K. and Karel M. 1972. The influence of water content and water activity on the sugar – amino browning reaction in model systems under various conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20(2), 218.
- Friedman M. 2003. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4504-4526.
- Gerrard J. A. 2006. The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead -Conference Report from the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction, *Trends in Food Science & Technology* 17, pp. 324–330.

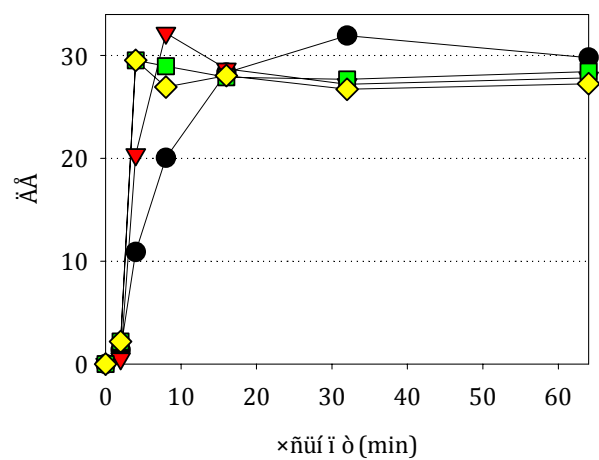
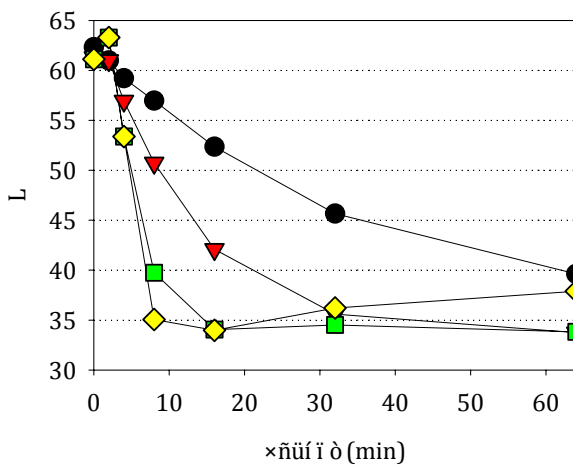
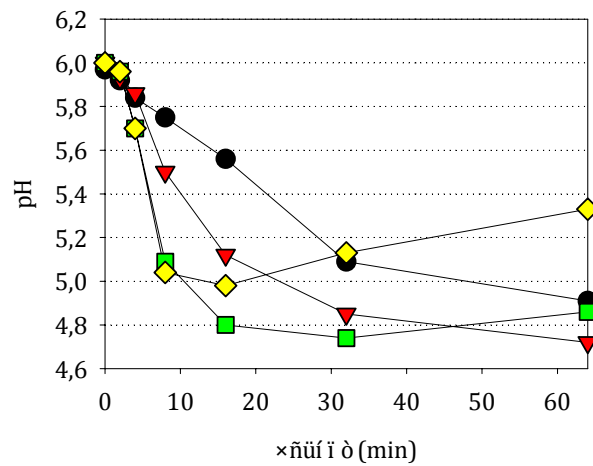
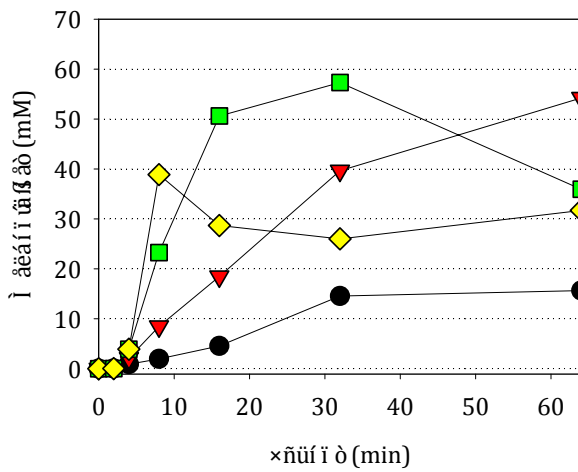
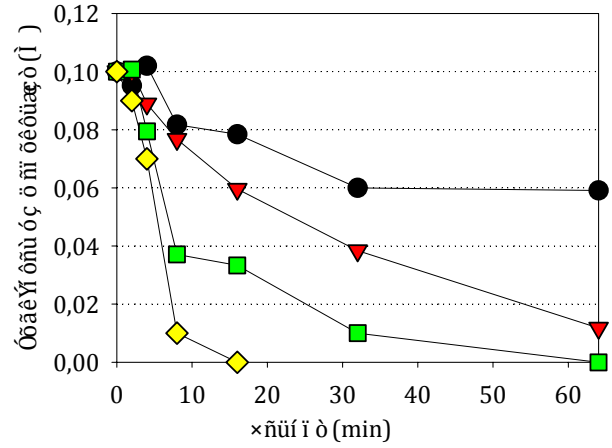
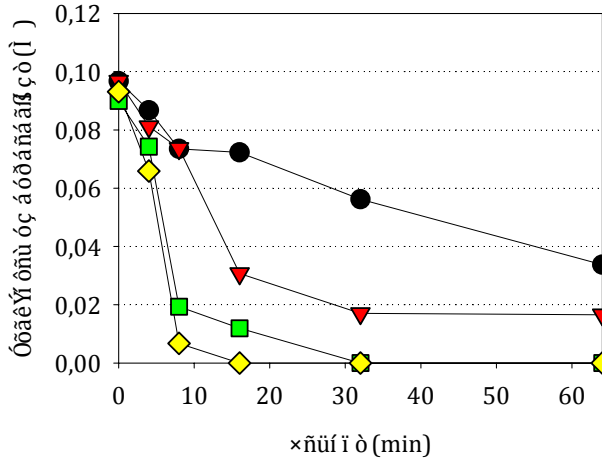
-
- Grivas S., Jägerstad M., Lingnert H., Skog K., Törnqvist M. and Åman P. 2002. Acrylamide in food - Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods, *Report from Swedish Scientific Expert Committee*.
- Hayase,F, HirashimaG, Okamoto,G and Kato 1989. Scavenging of active oxygens by melanoidines, *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 3383-3385.
- Hendrickx M. E., De Vleeschouwer K. and Claeys W. L. 2005. Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide, *Trends in Food Science & Technology* 16, 181–193.
- Hendriksen H. V., Kornbrust B. A., Østergaard P. R. and Stringer M. A. 2009. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4168–4176.
- Knol J. J., Linssen J. P. H. and Van Boekel M. A. J. S. 2010. Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modeling, *Food Chemistry* 120, 1047–1057.
- Konings E. J. M., Ashby P., Hamlet C. G. and Thompson G. A. K. 2007. Acrylamide in cereal and cereal products : A review on progress in level reduction, *Food Additives & Contaminants : Part A* 24:1, 47-59.
- Kukurova K., Morales F. J., Bednarikova A. and Ciesarova Z. 2009. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model, *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 1532-1539.
- Levine R. A. and Smith R. E. 2005. Sources of Variability of Acrylamide Levels in a Cracker Model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4410-4416.
- Lingnert, H 1990. Development of the Maillard reaction during food processing. In The Maillard reaction, *Advances in Life Sciences, Birkhauser Verlag, Basel*, 171-184.
- M. Friedman 2003. Chemistry, Biochemistry and Safety of acrylamide. A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4504-4526.
- Martins S. I. F. S., Jongen W. M. F. and Van Boekel M. A. J. S. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling, *Trends in Food Science & Technology* 11, 364–373.
- McMurry J., *Οργανική χημεία*, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 5^η, 2005, Τόμ.Ι, σσ.273-310
-

- McMurry J., *Οργανική Χημεία*, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 5^η, 2006, Τόμ.ΙΙ, σσ.1012-1020
- Mustafa A. 2008. Acrylamide in Bread, Precursors, Formation and Reduction, *Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala*.
- Mustafa A., Fink M., Kamal-Eldin A., Rosen J., Andersson R., Aman P. 2009. Interaction effect of fermentation time and added asparagine and glycine on acrylamide content in yeast-leavened bread, *Food Chemistry* 112, 767-774.
- Pedreschi F., Kaack K., Granby K. 2008. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries, *Food Chemistry* 109, 386-392.
- Rydberg P., Eriksson S., Tareke E., Karlsson P., Ehrenberg L. and Tornqvist M. 2005. Factors That Influence The Acrylamide Content Of Heated Foods, *Chemistry and Safety of Acrylamid in Food*.
- Sadd P. A., Hamlet C. G. and Liang L. 2008. Effectiveness of Methods for Reducing Acrylamide in Bakery Products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6154–6161.
- Singh P., Singh P. and Raja R. B. 2010. Determination of acrylamide concentration in processed food products using normal phase high performance liquid chromatography (HPLC), *African Journal of Biotechnology* 9(47), 8085-8091.
- Taeymans D., Wood J., Ashby P., Blank I., Studer A., Stadler R.H., Gondé P., Eijck V.P., Lallji S., Lingnert H., Lindblom M., Matissek R., Müller D., Tallmadge D., O'Brien J., Thompson S., Silvani D. and Whitmore T. 2004. A review of acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation and Control, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 323-347.
- Tezer N., Ozkan R. 2001. Mechanisms and transition structures for conjugate and carbonyl addition of ammonia to three small alpha, beta-unsaturated compounds; As ab initio molecular orbital study, *Journal of molecular structure theochemistry*, 546, 79-88.
- Vleeschouwer K., Plancken I., Loey A. And Hendrickx M. E. 2006. Impact of pH on the Kinetics of Acrylamide Formation/Elimination Reactions in Model Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7847-7855.
- Vleeschouwer K., Van der Plancken I., Loey A. Hendrickx M.E. 2008. Investigation of different moisture levels on Acrylamide Formation/Elimination reactions

-
- using multiresponce analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6460-6470.
- Vleeschouwer K., Van der Plancken I., Van Loey A. and Hendrickx M.E. 2008. The kinetics of acrylamide formation/elimination in asparagine–glucose systems at different initial reactant concentrations and ratios, *Food Chemistry* 111, 719–729.
- Weissman I., Ramon O., Kopelman I.J. and Mizrahi S. 1993. A kinetic model for accelerated tests of Maillard browning in a liquid model system, *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 455-470.
- Williams J.S.E. 2005. Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps, *Food Chemistry* 90, 875-881.
- Yaylayan V. A., Wnorowski A. and Perez Locas C. 2003. Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1753-1757.
- Yuan Y., Zhao G., Chen F., Liu J., Wu J. and Hu X. 2008. Correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in fructose/asparagine Maillard reaction model system, *Food Chemistry* 108, 885–890.
- Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Tallmadge D. H., Loye Eberhart B., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P., and Villagran M. D. 2003. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4782-4787.

Παράρτημα

Μελέτη της αντίδρασης Maillard σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C.



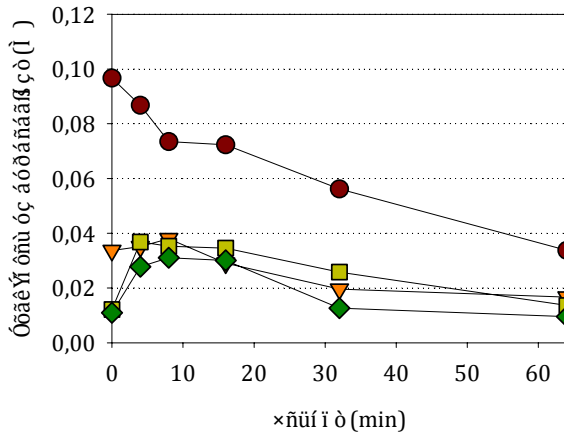
Σχήματα Π.1: Τα σημεία αντιστοιχούν σε θερμοκρασία 140(●), 160(▼), 180(■) και 200 °C(◆).

Πίνακας Π.1.: Μελέτη του χρώματος συναρτήσει του χρόνου σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C

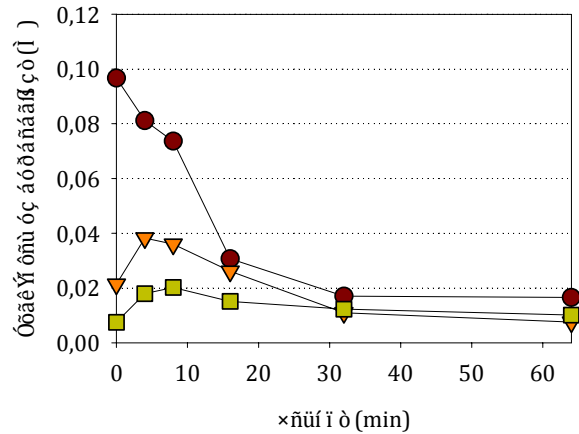
t (min)	L				a				b			
	140	160	180	200	140	160	180	200	140	160	180	200
0	62,31	61,29	61,11	61,11	0,63	0,66	0,60	0,60	-6,86	-6,88	-6,71	-6,71
2	60,99	60,99	63,29	63,29	0,68	0,68	0,54	0,54	-6,46	-6,46	-6,64	-6,64
4	59,20	56,93	53,37	53,37	-0,99	-0,50	3,22	3,22	3,45	12,98	21,67	21,67
8	56,95	50,73	39,74	35,05	-1,09	7,28	13,40	5,15	12,39	22,79	8,08	-1,68
16	52,34	42,09	34,05	33,97	2,07	13,28	4,56	5,34	19,62	10,32	-1,29	-1,48
32	45,65	35,59	34,51	36,21	11,29	7,03	5,66	7,33	18,21	-0,70	-0,96	0,25
64	39,61	33,73	33,82	37,89	12,35	1,50	5,91	9,93	8,48	-3,15	-0,71	4,07

Μελέτη της αντίδρασης Maillard σε σύστημα ισομοριακού διαλύματος ασπαραγίνης - φρουκτόζης 0,1M στους 140-200 °C μετά την προεπεξεργασία με ασπαραγινάση.

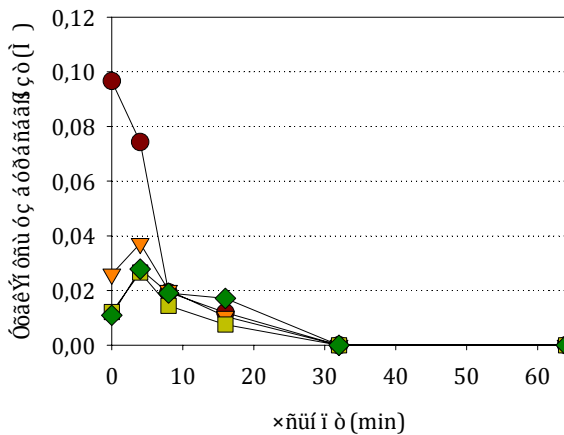
(Α)



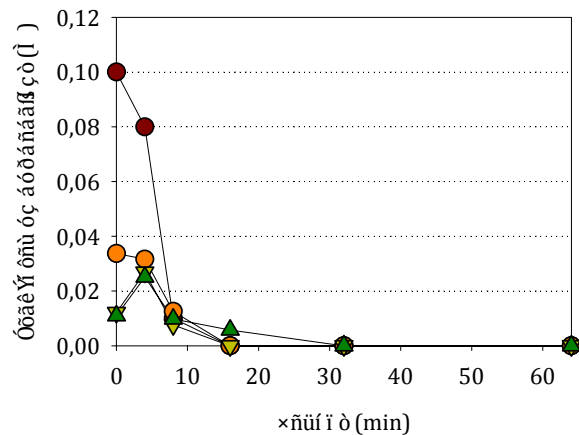
(Β)



(Γ)

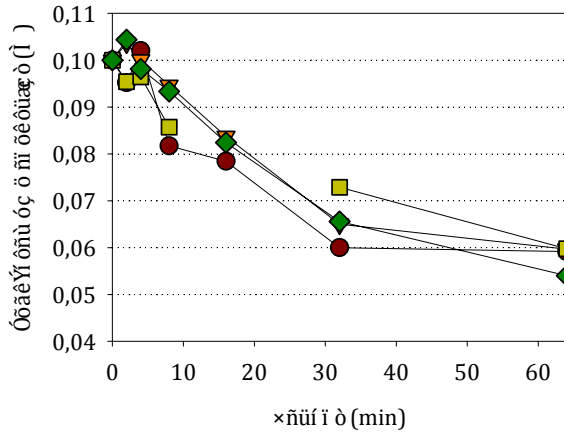


(Δ)

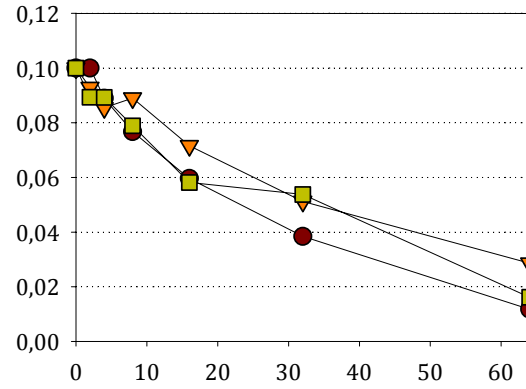


Σχήματα Π.2: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της ασπαραγίνης συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g (▼), 15 U/g (■), 30 U/g (◆) ασπαραγινάσης.

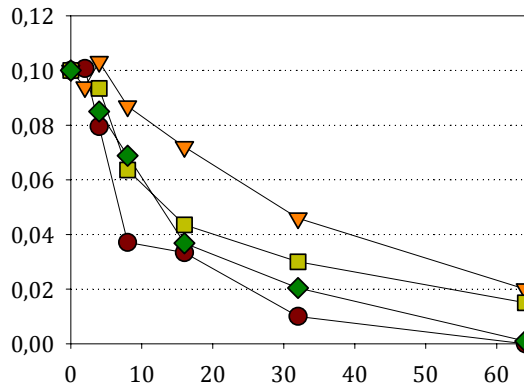
(Α)



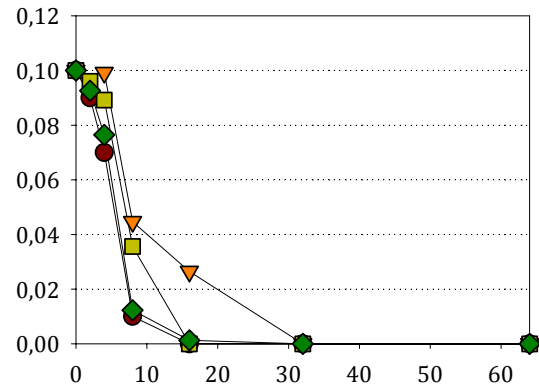
(Β)



(Γ)

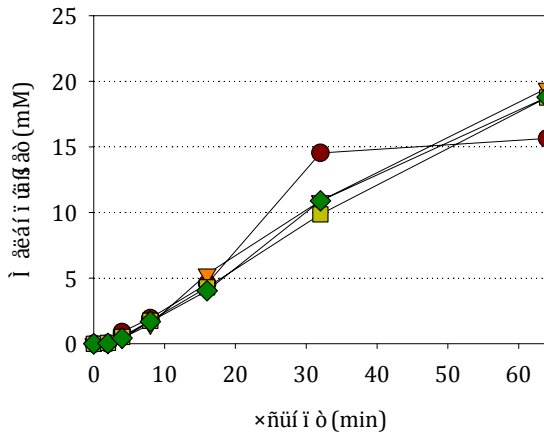


(Δ)

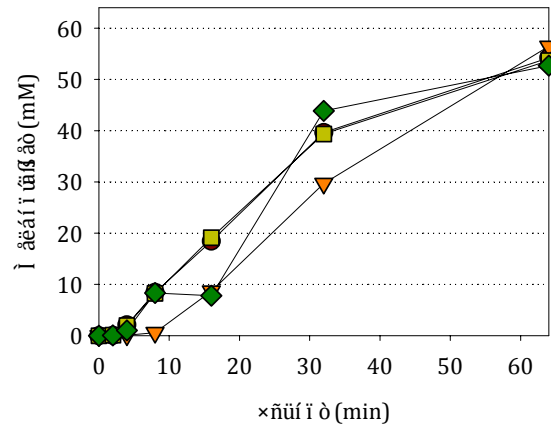


Σχήμα Π.3: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση της φρουκτόζης συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (•), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g (▼), 15 U/g(■), 30 U/g(♦) ασπαραγινάσης.

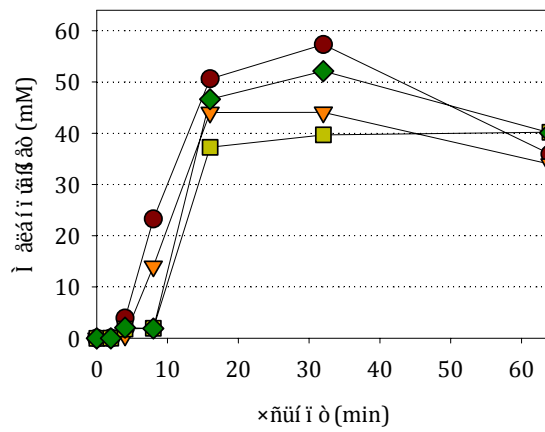
(A)



(B)

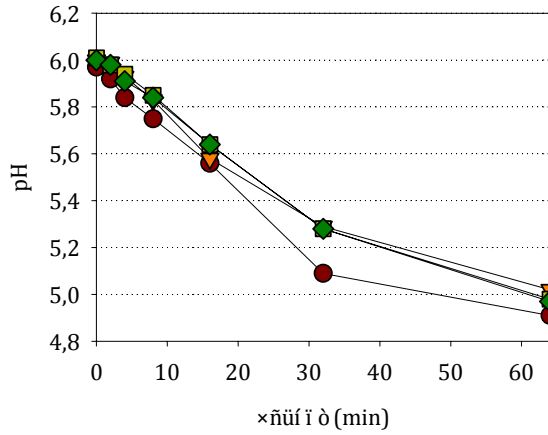


(Γ)

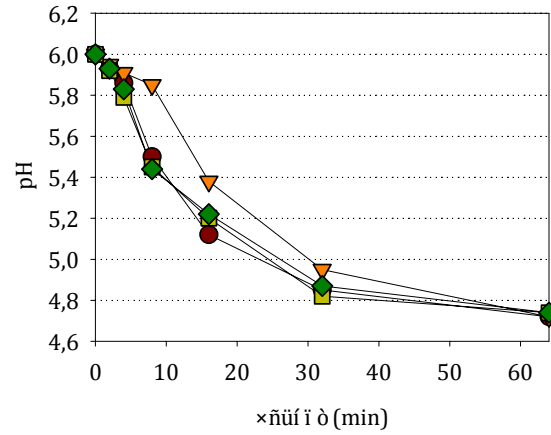


Σχήμα Π.4: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στη συγκέντρωση των μελανοϊδινών συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (A), 160 (B) και 180 °C (Γ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g(▼), 15 U/g(■), 30 U/g(◆) ασπαραγινάσης.

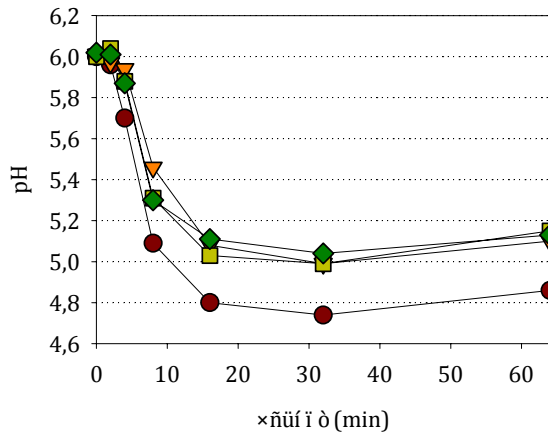
(Α)



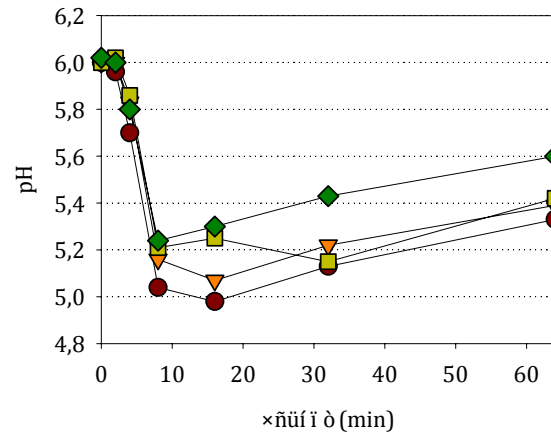
(Β)



(Γ)



(Δ)



Σχήμα Π.5: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στην τιμή του pH συναρτήσει του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C (Δ). Δείγμα χωρίς επεξεργασία (●), δείγμα με επεξεργασία 3 U/g(▼), 15 U/g(■), 30 U/g(◆) ασπαραγινάσης.

Πίνακας Π.2: Επίδραση της προ-επεξεργασίας με ασπαραγινάση στο χρώμα συναρτήσεων του χρόνου για τη θερμοκρασία των 140 (Α), 160 (Β), 180 (Γ) και 200 °C(Δ).

(A) t (min)	L				a				b			
	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U
0	62,31	62,31	62,31	62,31	0,63	0,63	0,63	0,63	-6,86	-6,86	-6,86	-6,86
2	62,97	62,97	61,35	63,60	0,42	0,42	0,32	0,41	-2,60	-2,60	-2,00	-2,69
4	61,43	61,43	61,61	61,16	-0,58	-0,58	-0,56	-0,51	2,85	2,85	4,09	2,51
8	59,24	59,24	59,88	57,84	-0,58	-0,58	-0,52	-0,56	15,64	15,64	15,51	10,45
16	50,59	50,59	53,49	54,18	5,91	5,91	3,75	3,17	23,62	23,62	24,28	21,72
32	45,67	45,67	44,94	44,86	11,17	11,17	11,33	11,51	17,96	17,96	18,35	16,88
64	39,57	39,57	39,77	40,65	12,13	12,13	12,52	12,07	8,92	8,92	9,77	11,23

(B) t (min)	L				a				b			
	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U
0	61,29	61,29	61,29	61,29	0,66	0,66	0,66	0,66	-6,88	-6,88	-6,88	-6,88
2	60,99	61,66	61,25	63,10	0,68	0,34	0,34	0,53	-6,46	-2,16	-1,97	-2,59
4	56,93	60,30	58,82	58,87	-0,50	0,37	-0,33	-0,80	12,98	-2,02	15,92	8,70
8	50,73	59,34	49,37	49,28	7,28	-0,51	9,43	9,30	22,79	3,97	23,50	23,43
16	42,09	50,46	39,10	41,69	13,28	8,83	13,28	12,77	10,32	20,98	9,43	11,64
32	35,59	38,10	34,07	33,98	7,03	11,82	5,78	4,49	-0,70	5,67	0,94	0,27
64	33,73	33,86	32,98	33,83	1,50	3,59	2,93	3,57	-3,15	-0,08	-0,72	-0,27

(Γ) t (min)	L				a				b			
	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U
0	61,11	61,11	61,11	61,11	0,60	0,60	0,60	0,60	-6,71	-6,71	-6,71	-6,71
2	63,29	61,30	62,94	62,94	0,54	0,04	-0,03	-0,03	-6,64	-1,89	-2,38	-2,38
4	53,37	59,07	56,86	56,41	3,22	-0,88	-0,30	0,05	21,67	6,01	15,98	17,15
8	39,74	42,01	39,48	40,05	13,40	13,18	12,90	13,13	8,08	14,06	8,63	10,60
16	34,05	35,53	34,73	35,21	4,56	4,88	4,49	2,08	-1,29	0,31	0,43	-0,94
32	34,51	34,80	33,47	34,28	5,66	3,49	0,77	0,80	-0,96	-0,57	-0,59	-1,36
64	33,82	34,46	34,14	33,92	5,91	1,74	3,15	0,98	-0,71	-1,36	0,11	-1,07

(Δ) t (min)	L				a				b			
	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U	0	3U	15U	30U
0	61,11	61,11	61,11	61,11	0,60	0,60	0,60	0,60	-6,71	-6,71	-6,71	-6,71
2	63,29	63,68	61,90	54,42	0,54	-0,29	-0,16	-0,26	-6,64	-0,02	-0,80	0,24
4	53,37	54,67	57,42	49,66	3,22	2,60	2,71	5,99	21,67	21,00	24,79	15,26
8	35,05	35,77	35,20	35,80	5,15	5,08	5,28	2,95	-1,68	0,27	0,42	-1,08
16	33,97	34,13	34,58	34,47	5,34	0,89	2,67	4,44	-1,48	-0,96	-0,44	0,25
32	36,21	35,11	34,03	34,98	7,33	0,94	1,23	1,08	0,25	-1,21	-0,50	-1,14
64	37,89	34,79	34,62	34,93	9,93	1,10	1,98	4,37	4,07	-0,54	0,05	0,91