



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΥΚΛΙΚΑ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ: ΣΥΝΘΕΣΗ,
ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

ΜΠΡΑΤΑΚΟΣ Μ. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ M.Sc.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΥΚΛΙΚΑ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ: ΣΥΝΘΕΣΗ,
ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

ΜΠΡΑΤΑΚΟΣ Μ. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ M.Sc.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 817^Α/ 10-6-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κυριάκος Ρηγανάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

Μέλη:

Βασίλειος Ντουρτόγλου, Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Οίνου και Ποτών, ΤΕΙ Αθήνας

Βασιλεία Σινάνογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθήνας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-11-2011

Θέμα: «ΚΥΚΛΙΚΑ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΠΟΤΑ: ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

948^Α/12-5-2017

1. **Κυριάκος Ρηγανάκος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

2. **Μιχάλης Σίσκος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

3. **Βασίλειος Σακκάς**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

4. **Βασίλειος Ντουρτόγλου**, Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Οίνου και Ποτών, ΤΕΙ Αθήνας

5. **Βάϊος Καραθάνος**, Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

6. **Βασιλεία Σινάνογλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθήνας

7. **Παναγιώτης Ζουμπουλάκης**, Ερευνητής Β', Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-6-2017

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λέκκα Μαρία -Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ζωή-Βαλεντίνα Βαμβέτσου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες (DKPs) είναι κυκλικά διπεπτίδια τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε μία ποικιλία φυτικών προϊόντων, ιδίως σε θερμικώς επεξεργασμένα ή ζυμωμένα τρόφιμα και ποτά, παρέχοντας μια μεταλλική πικρή γεύση. Οι DKPS επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, που πιθανόν οφείλονται στη μοριακή τους δομή, όπως αντιμικροβιακή, αντιαρκτική, αντιοξειδωτική, αντιυπεργλυκαιμική και αντιμεταλλαξιγόνο. Οι μέχρι τώρα μελέτες που αφορούν στην ανίχνευση DKPS σε τρόφιμα και ποτά είναι ελάχιστες. Ως εκ τούτου είναι σημαντικό να αναπτυχθεί μια μεθοδολογία για τον προσδιορισμό τους. Ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μεθοδολογία εκχύλισης των 2,5-δικετοπιπεραζινών από επεξεργασμένα τρόφιμα (ελιές, οίνος) όπως και να αναπτυχθούν μέθοδοι υγρής και αέριας χρωματογραφίας συγκριτικά, για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των DKPS σε τρόφιμα και ποτά. Επίσης να αναπτυχθεί μέθοδος φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης η οποία μέσω του μηχανισμού θραυσμάτωσης των 2,5-δικετοπιπεραζινών να ταυτοποιεί τον χημικό τύπο τους. Από τα αποτελέσματα της μελέτης τα οποία επιβεβαιώθηκαν με *in silico* υπολογισμούς ενέργειας DFT, εξηγήθηκε ο μηχανισμός θραυσμάτωσης των προτύπων DKPs από τη μελέτη των θραυσμάτων και της σχετικής αφθονίας τους όπως προέκυψαν από τα φάσματα μάζας MSn. Από την καταγραφή των χαρακτηριστικών ιόντων που αναμένονται για τις επιμέρους DKPs σε σχέση με τη δομή τους (αρωματική ή αλειφατική αλυσίδα, ύπαρξη συμμετρίας), δημιουργήθηκε ένα διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευσή τους σε οποιοδήποτε υπόστρωμα.

Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν οκτώ διαφορετικές DKPs σε επτά ελληνικές ποικιλίες επεξεργασμένων ελιών χρησιμοποιώντας HR-LC-MSn. Από τη συγκριτική μελέτη των χρωματογραφημάτων δειγμάτων ελιάς και προτύπων εντοπίστηκαν συγκεκριμένες μοριακές πιθανές δομές DKPs στις ποικιλίες των ελιών. Οι δομές αυτές επαληθεύθηκαν από την ανάγνωση των φασμάτων μάζας MSn των ενώσεων αυτών. Οι πιο σημαντικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν σε όλα σχεδόν τα μελετούμενα δείγματα ήταν η *cyclo*(Phe-Phe) και η *cyclo*(Phe-Pro), οπότε θα μπορούσαν να θεωρηθούν χαρακτηριστικά μοριακά είδη των επεξεργασμένων ελιών. Οι δύο πιο πλούσιες ποικιλίες ελιών σε DKPs ήταν οι Κοθρέϊκες μεσαίου μεγέθους

από την Άμφισσα (Δείγμα 2) και οι Χονδροελιές μεγάλου μεγέθους από την Άμφισσα (Δείγμα 6), όπου ανιχνεύθηκαν συνολικά επτά μοριακά είδη.

Επίσης τέσσερις 2,5-δικετοπιπεραζίνες ανιχνεύτηκαν σε δεκαπέντε εμφιαλωμένους οίνους που παράγονται από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών. Η ταυτοποίησή τους επιτεύχθηκε μέσω της σύγκρισης της χρωματογραφικής τους συμπεριφοράς και της δομής τους με συνθετικές ενώσεις. Η χημική σύνθεση των DKPs έγινε με κυκλοποίηση των αντίστοιχων συνθετικών διπεπτιδίων. Η ταυτοποίηση δομής των συνθετικών DKPs επιβεβαιώθηκε με την χρήση $^1\text{H-NMR}$ και φασματοσκοπίας μάζας. Οι cyclo(Leu-Pro) και cyclo(Phe-Pro) ανιχνεύτηκαν σε όλους τους μελετούμενους οίνους, ενώ οι cyclo(Val-Phe) και cyclo(Ala-Phe) ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε αρκετά δείγματα οίνων στην παρούσα ερευνητική μελέτη. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η χρονολογία του οίνου(χρόνος παραμονής και ωρίμανσης) πιθανόν να επηρεάζει το είδος και τη συγκέντρωση των δικετοπιπεραζινών. Αντιθέτως η ποικιλία του σταφυλιού δε φαίνεται να επηρεάζει το είδος και τη συγκέντρωσή τους.

Θεματική περιοχή: Ανάλυση Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: 2,5-δικετοπιπεραζίνες, ελιές, οίνοι, GC-MS ανάλυση, HPLC-ESI-MSn ανάλυση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ

Diketopiperazines (DKPs) are cyclic dipeptides which have been detected in a variety of natural products, especially in thermally treated or fermented foods and beverages, providing a metallic bitter taste. DKPs, mainly due to their characteristic heterocyclic system, have been reported to exhibit a broad spectrum of biological activities including antimicrobial, antiviral, antitumor, antihyperglycaemic and antimutagenic. DKPs are formed from unprotected linear dipeptides under basic conditions especially if the necessary head-to-tail folding not prevented by steric constraints. A methodology to identify DKPs in complex matrices is of high importance. Up to now, only a few studies have reported the MS fragmentation patterns on a certain number of DKPs. The purpose of this study was to develop a liquid chromatography method for separation and identification of DKPs in complex matrices (i.e. food and beverages) as well as a high resolution mass spectrometry method providing accurate full scan MS and MS_n data in order to investigate the fragmentation pattern and confirm the chemical formula and structure of DKPs containing aromatic amino acids. Our results which were supported by *in silico* DFT energy calculations, revealed different and common fragmentation pathways as well as a series of characteristic fragment ions which are representative of the amino acid residues. The role of MS_n was signified by the results since it provided a clear picture of the fragmentation cascades. The obtained fragments are diagnostic and could be used to distinguish cyclic dipeptides in different matrices.

In the present study, several DKPs were identified in seven different Greek varieties of processed olives using HR-LC-MS_n. The identification of DKPs in olive samples was achieved by comparison of their retention time and fragmentation pattern with reference DKP standards. The MS_n spectra were identical to confirm the presence of specific compounds because their results associate both fragmentation pattern and fragments' intensity. Nine compounds were found out of a total of 19 standard DKPs. The most prominent diketopiperazine was the cyclo(Phe-Phe) followed by and cyclo(Phe-Pro). Varieties where most DKPs were identified were Kothreiki, Kalamon, Throumpoelies and Helidoni.

Furthermore, four cyclic dipeptides, 2,5-diketopiperazines (DKPs) were found in fifteen bottled wines produced from different grape varieties. They are cyclo (Leu-Pro), cyclo (Ala-Phe), cyclo (Val-Phe), and cyclo (Phe-Pro). These compounds were detected for the first time in wine, and their chemical identification was achieved through comparison of their physical and chemical data with that obtained through chemical synthesis. The chemical synthesis of natural identical DKPs was achieved by cyclisation of the corresponding synthetic dipeptides. The structure of DKPs produced synthetically was confirmed using ¹H-NMR and mass spectroscopy. The DKPs obtained through chemical synthesis had the same mass spectra and the same retention time in gas chromatography as those detected in wine.

Subject area: Food Instrumental Analysis

Keywords: 2,5-diketopiperazines (DKPs), Olives, Wines, GC-MS analysis, HPLC–ESI–MSⁿ analysis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το μεγαλύτερο μέρος της προκατεργασίας και επεξεργασίας των δειγμάτων των οίνων και των ελιών, όπως και η ανάλυση GC–MS πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης και Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων και στο Εργαστήριο Βιοχημικής Ανάλυσης και Βιοχημείας οίνου του Τμήματος Τεχνολογίας και Ποιότητας Ποτών της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Τ.Ε.Ι. Αθήνας, ενώ η LC–ESI–MSn ανάλυση έγινε στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.).

Επιβλέπων της εν λόγω ερευνητικής εργασίας είναι ο κ. Κυριάκος Ρηγανάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον οποίον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια της εκπόνησης της Διατριβής και της εκτέλεσης των πειραματικών εργασιών.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Βασίλειο Ντουρτόγλου, Καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας και Ποιότητας Ποτών, του Τ.Ε.Ι. Αθήνας, για την άριστη συνεργασία και για τη βοήθειά του στη διαδικασία της εκπόνησης των διαφόρων σταδίων της Διατριβής μου.

Θεωρώ ιδιαίτερα σημαντικό να ευχαριστήσω την κα Βασιλεία Σινάνογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, του Τ.Ε.Ι. Αθήνας, για την άριστη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή της καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Β' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια των πειραμάτων, την άμεση βοήθεια και τη σημαντική συμβολή του στην εκπόνηση της εν λόγω Διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κα Ελένη Σιάπη για την αμέριστη βοήθειά της στην ανάλυση του δειγμάτων.

Επίσης ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Βελτσίστα, Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις πολύτιμες συμβουλές του στην διαμόρφωση του θεωρητικού μέρους της Διατριβής.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες μου στο Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης και Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων, του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, του Τ.Ε.Ι. Αθήνας, όπως και το προσωπικό στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Ε.Ι.Ε.. για το άψογο κλίμα συνεργασίας και τη συνεισφορά τους στην αποτίμηση των αποτελεσμάτων, των διαφόρων πειραματικών εργασιών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
----------------	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 — ΑΜΙΝΟΞΕΑ	3
-----------------------------	---

1.1. ΠΡΩΤΕΙΝΟΓΕΝΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ή ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ή ΒΑΣΙΚΑ ή ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ή ΟΥΣΙΩΔΗ ΑΜΙΝΟΞΕΑ.....	3
---	---

1.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
---------------------	---

1.1.2 Σχηματισμός των Αμινοξέων	6
---------------------------------------	---

1.1.3 Βιολογική αποστολή των Αμινοξέων.	7
--	---

1.1.4 Κατάταξη των αμινοξέων	8
------------------------------------	---

1.1.5 Απαραίτητα αμινοξέα.....	10
--------------------------------	----

1.1.6 Διακλαδισμένα αμινοξέα (branched-chain amino acid, bcaa's).....	11
---	----

1.2 ΜΗ ΠΡΩΤΕΙΝΟ-ΓΕΝΙΚΑ Η ΜΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ.....	12
--	----

1.2.1 Εισαγωγή.....	12
---------------------	----

1.3 ΦΥΣΙΚΕΣ, ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ. ..	15
--	----

1.3.1 Αντιδράσεις καρβοξυλομάδας.....	15
---------------------------------------	----

1.3.2 Αντιδράσεις αμινομάδας	15
------------------------------------	----

1.3.3 Αντιδράσεις πλευρικής αλυσίδας	16
--	----

1.3.4 Ισοηλεκτρικό σημείο	17
---------------------------------	----

1.4 Διαχωρισμός των αμινοξέων.....	19
------------------------------------	----

1.5 Ονοματολογία κατά IUPAC.....	19
----------------------------------	----

1.6 ΦΥΣΙΚΑ ΜΗ L-α-ΑΜΙΝΟΞΕΑ	20
----------------------------------	----

1.6.1 β-ALANINE, beta-ALANINE.	21
-------------------------------------	----

1.6.2	22
-------------	----

γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ, (GABA).....	22
-----------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΠΤΙΔΙΑ	25
----------------------------	----

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	25
------------------------------	----

2.2 Ο ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ.....	26
------------------------------	----

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	31
2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.	31
2.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ	34
2.5.1 Μέθοδος Καρβοβενζοξυ-ομάδας [Cbo-].....	35
2.5.2 Τεχνική Στερεάς Φάσεως	38
2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.	41
2.7 ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	46
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	46
3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	48
3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	51
3.3.1 Πρωτοταγής δομή	53
3.3.2 Δευτεροταγής δομή.....	55
3.3.3 Τριτοταγής δομή.....	58
3.3.4 Τεταρτοταγής δομή	61
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	62
3.5 Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	62
3.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.	64
3.7 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ	66
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	66
4.2 ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ	69
4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ.....	70
4.4 ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ	70
4.5 ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ	72
4.5.1 Συμμετρική Cyclo (L-Pro-L-Pro)	72
4.5.2 Αλειφατικά παράγωγα της προλίνης	73

4.5.3 Αρωματικά παράγωγα της προλίνης	75
4.5.4 Συμμετρικά αλειφατικά παράγωγα	77
4.6 ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ	78
4.7 ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	80
4.8 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	81
4.9 ΩΦΕΛΙΜΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΕΛΙΑ.....	86
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	86
5.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	86
5.3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΜΑ	87
5.4 ΔΟΜΗ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΟΥ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ.....	88
5.4.1 Ελαιόδεντρο	88
5.4.2 Ελαιόκαρπος	89
5.4.3 Ποικιλίες για ελαιοποίηση.....	89
5.4.4 Επιτραπέζιες ποικιλίες.....	90
5.4.5 Μεικτές ποικιλίες	90
5.4.6 Επιθυμητά χαρακτηριστικά	91
5.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗ ΜΑΥΡΩΝ ΕΛΑΙΩΝ.....	92
5.6 ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΣΤΙΣ ΕΛΙΕΣ	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΟΙΝΟΣ.....	95
6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΙΝΟ.....	95
6.2. ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣ	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	98
8.1 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ.....	98
8.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	98
8.2.1 Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες.....	98

8.2.2 Συσκευές και επιστημονικά όργανα	99
8.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΧΩΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	100
8.4 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ	102
8.4.1 Εκχύλιση των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των οίνων	102
8.4.2 Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού–υγρού των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των ελιών.....	105
8.5 ΣΥΝΘΕΣΗ 2,6-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ	106
8.5.1 Σύνθεση των Διπεπτιδίων	106
8.5.2 Κυκλοποίηση των Διπεπτιδίων.....	107
8.5.3 Καθαρισμός και απομόνωση των δικετοπιπεραζινών.....	107
8.5.4 Σύστημα TLC και OCC	108
8.5.5 Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης	112
8.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GAS CHROMATOGRAPHY, GC) ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ	114
8.6.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα για την ταυτοποίηση των γραμμικών και κυκλικών διπεπτιδίων που προέκυψαν από τη χημική σύνθεση.....	115
8.6.2 Πρότυπη καμπύλη cyclo-Leu-Pro.....	116
8.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HIGHERPERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC) ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ	117
8.8 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΘΕΙΜΕΝΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΩΝ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹ H NMR	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΕΣ ΕΛΙΕΣ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	121

9.1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	121
9.2. ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ.....	122
9.3. ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	144
9.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΕΣ ΕΛΙΕΣ	157
9.4.1 Ταυτοποίηση αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών.....	169
9.4.2 Ταυτοποίηση αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών	171
9.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	172
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟΥΣ ΕΓΧΩΡΙΟΥΣ ΚΑΙ ΜΗ ΕΓΧΩΡΙΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	174
10.1 ΣΥΝΘΕΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ	174
10.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ.....	176
10.3 ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΩΝ ΟΙΝΩΝ	178
10.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΩΝ ΟΙΝΩΝ	185
10.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	186
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Συμπεράσματα από την παρούσα μελέτη	188
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	192
Παράρτημα Ι. Χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας αρωματικών 2,5 δικετοπιπεραζινών	209
Παράρτημα ΙΙ. Χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας αλειφατικών 2,5 δικετοπιπεραζινών	220
Παράρτημα ΙΙΙ. Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διατριβή σε επίσημα περιοδικά αναγνωρισμένου κύρους με κριτές	233
Παράρτημα ΙV. Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διατριβή σε πρακτικά Διεθνών Συνεδρίων αναγνωρισμένου κύρους με κριτές.....	234

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPs) είναι κυκλικά διπεπτίδια μικρού ΜΒ. Δημιουργούνται από την συμπύκνωση δύο α-αμινοξέων, ως προϊόντα διάσπασης πολυπεπτιδίων μεταποιημένων τροφίμων και ποτών ή μέσω της δράσης μικροοργανισμών. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά ως φυσικά προϊόντα στις αρχές του 20ου αιώνα. Η πρώτη δικετοπιπεραζίνη που συντέθηκε ήταν η cyclo-Gly-Gly από τους Curtius και Goebel το 1888 (Borthwick, 2012). Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες έχουν ανιχνευτεί σε αρκετά είδη τροφίμων και ποτών σε μικρές συγκεντρώσεις, συνεισφέρουν σημαντικά στη γεύση αυτών και επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως αντιμικροβιακή, αντιική, αντιοξειδωτική, αντιυπεργλυκαιμική και αντιμεταλλαξιγόνο. Έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται από πλήθος πρωτεϊνικών υποδοχέων με αποτέλεσμα να αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις με δυνητική φαρμακευτική δράση. Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία των δικετοπιπεραζινών σε πολλά φυσικά προϊόντα, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που τις καθιστά δύσκολα ανιχνεύσιμες και τις εφαρμογές τους στην ιατρική, μέσω των βιολογικών τους δράσεων, η ανίχνευσή τους σε προϊόντα διατροφής καθίσταται ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μεθοδολογία απομόνωσης και ανίχνευσης των 2,5-δικετοπιπεραζινών σε ποικιλίες επεξεργασμένων ελιών και σε ποικιλίες εγχώριων και μη εμφιαλωμένων οίνων. Επιλέχθηκε να μελετηθούν οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες σε επεξεργασμένες ελιές και σε εμφιαλωμένους οίνους, δεδομένου ότι τα εν λόγω προϊόντα παρουσιάζουν μεγάλο διατροφικό, εμπορικό και οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα.

Στα πρώτα 4 Κεφάλαια της διατριβής γίνεται μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση που περιλαμβάνει τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, τις πρωτεΐνες και τις δικετοπιπεραζίνες.

Στο Κεφάλαιο 5 γίνεται ανασκόπηση για το ελαιόδεντρο και την ελιά, τις ποικιλίες της ελιάς και την επεξεργασία του ελαιοκάρπου και στο Κεφάλαιο 6 ανάλογη ανασκόπηση για τον οίνο.

Στο Κεφάλαιο 7 περιγράφεται το αντικείμενο μελέτης της παρούσης εργασίας.

Στο Κεφάλαιο 8 περιγράφεται όλη η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκε μεθοδολογία εκχύλισης των 2,5-δικετοπιπεραζινών από επεξεργασμένα τρόφιμα (ελιές, οίνος), μεθόδου προσδιορισμού των ενώσεων αυτών με αέρια και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή μάζας με στόχο την ταυτοποίηση και το χημικό χαρακτηρισμό των ενώσεων αυτών.

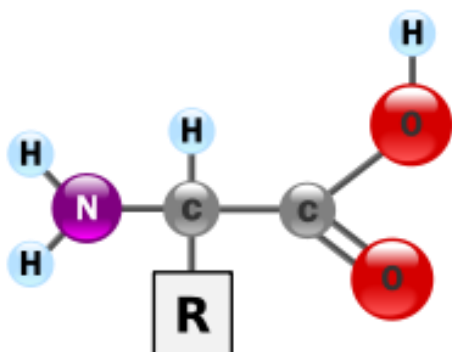
Στα Κεφάλαια 9 και 10 καταγράφονται όλα τα αποτελέσματα και τα ευρήματα της έρευνας και γίνεται συγκριτική μελέτη του προφίλ των 2,5-δικετοπιπεραζινών σε επεξεργασμένες ελιές και οίνους διαφορετικών ποικιλιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 — ΑΜΙΝΟΞΕΑ

1.1. ΠΡΩΤΕΪΝΟΓΕΝΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ή ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ή ΒΑΣΙΚΑ ή ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ή ΟΥΣΙΩΔΗ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

1.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

α-Αμινοξέα ονομάζονται οι οργανικές χημικές ενώσεις, που περιέχουν στο μόριο τους μία τουλάχιστον καρβονική ομάδα (καρβοξυλική ομάδα ή καρβοξυλομάδα, από τα καρβονικά οξέα $R-COOH$) και μία τουλάχιστον αμινική ομάδα (αμινομάδα $-NH_2$), ενωμένες στο ίδιο άτομο άνθρακα. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το αμινοξύ προλίνη το οποίο έχει ιμινομάδα αντί για αμινομάδα. Τα αμινοξέα αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά των πρωτεϊνών, που καθορίζουν και τις χαρακτηριστικές ιδιότητες αυτών και έχουν τον γενικό τύπο:



Σχήμα 1.1.1.1. Γενικός συντακτικός τύπος δομής των α-αμινοξέων

Το $-R$ αποτελεί γενικό συμβολισμό για οποιαδήποτε πλευρική χημική δομική μονάδα, που μπορεί να περιέχει πολλά και διαφορετικά άτομα. Η πλευρική ομάδα συμβολίζεται συνήθως με το γράμμα $-R$ και αναφέρεται μονολεκτικά ως **υπόλειμμα (residue)**. Η πλευρική ομάδα είναι διαφορετική για κάθε αμινοξύ και του προσδίδει μοναδικές χημικές ιδιότητες. Συνεπώς, τα αμινοξέα κατατάσσονται σε κατηγορίες σύμφωνα με το είδος της πλευρικής ομάδας, η οποία τα κάνει να συμπεριφέρονται ως

ασθενή οξέα, ως ασθενείς βάσεις, ως υδρόφιλα, αν είναι πολικά, ή ως αερόφοβα, αν είναι μη πολικά. Συγκεκριμένα:

- Μη πολικά αμινοξέα, όπως η λευκίνη, συχνά έχουν πλευρικές ομάδες οι οποίες περιέχουν $-\text{CH}_2$ ή $-\text{CH}_3$.
- Πολικά μη φορτισμένα αμινοξέα, όπως η θρεονίνη, έχουν πλευρικές ομάδες οι οποίες περιέχουν οξυγόνο (ή μόνο $-\text{H}$).
- Φορτισμένα αμινοξέα, όπως το γλουταμικό οξύ, έχουν πλευρικές ομάδες οι οποίες περιέχουν οξέα ή βάσεις.
- Αρωματικά αμινοξέα, όπως η φαινυλαλανίνη, έχουν πλευρικές ομάδες που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο με εναλλασσόμενους απλούς και διπλούς δεσμούς.
- Αμινοξέα που επιτελούν ειδικές λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η μεθειονίνη, η οποία έχει την τάση να καταλαμβάνει την πρώτη θέση σε μία αλληλουχία αμινοξέων [Πίνακας 1.1.1.1].

Πίνακας 1.1.1.1 Τα είκοσι τρία (23) κυριότερα **πρωτεϊνογενικά** αμινοξέα, που συνθέτουν τις πρωτεΐνες όλων των ζωντανών οργανισμών. Τα φερόμενα με αστερίσκο (*) είναι τα εννέα (9) **βασικά** αμινοξέα. Δίδονται γενικές πληροφορίες και οι φυσικές ιδιότητες και οι χημικές ιδιότητες αυτών.

Ονομασία Αμινοξέων	Παγκόσμιος Κωδικός	Χημικός Τύπος	Μοριακή Μάζα	Πόλωση	Οξύτητα στο Νερό	Ισοηλεκτρικό Σημείο	pK _{ac}	pK _{an}
Αλανίνη	Ala / A	C ₃ H ₇ NO ₂	89,09	μη πολική	Ουδέτερο	6,01	2,35	9,87
Αργινίνη	Arg / R	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,20	πολική	Βασικό (ισχυρό)	10,76	1,82	8,99
Ασπαραγίνη	Asn / N	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,11	πολική	Ουδέτερο	5,41	2,14	8,72

Ασπαρτικό οξύ	Asp / D	C ₄ H ₇ NO ₄	133,10	πολική	Όξινο	2,85	1,99	9,90
Κυστεΐνη	Cys / C	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,15	πολική	Ουδέτερο	5,05	1,92	10,70
Γλουταμικό οξύ	Glu / E	C ₅ H ₉ NO ₄	147,13	πολική	Όξινο	3,15	2,10	9,47
Γλουταμίνη	Gln / Q	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,15	πολική	Ουδέτερο	5,65	2,17	9,13
Γλυκίνη	Gly / G	C ₂ H ₅ NO ₂	75,06	μη πολική	Ουδέτερο	6,06	2,35	9,78
Ιστιδίνη*	His / H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,15	πολική	Βασικό (αδύναμο)	7,60	1,80	9,33
Υδροξυπρολίνη	Hpr	C ₅ H ₉ NO ₃	131,13					
Ισολευκίνη*	Ile / I	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	μη πολική	Ουδέτερο	6,05	2,32	9,76
Λευκίνη*	Leu / L	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	μη πολική r	Ουδέτερο	6,01	2,33	9,74
Λυσίνη*	Lys / K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,18	πολική	Βασικό	9,60	2,16	9,06
Μεθειονίνη*	Met / M	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,20	μη πολική	Ουδέτερο	5,74	2,13	9,28
Φαινυλαλανίνη*	Phe / F	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,19	μη πολική	Ουδέτερο	5,49	2,20	9,31
Προλίνη	Pro / P	C ₅ H ₉ NO ₂	115,13	μη πολική	Ουδέτερο	6,30	1,95	10,64
Πυρρολυσίνη	Pyl	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₃	255,31	πολική	Βασικό			
Σεληνοκυστεΐνη	Sec	C ₃ H ₇ NO ₂ Se	168,07				5,47	
Σερίνη	Ser / S	C ₃ H ₇ NO ₃	105,09	πολική	Ουδέτερο	5,68	2,19	9,21

Θρεονίνη*	Thr / T	C ₄ H ₉ NO ₃	119,12	πολική	Ουδέτερο	5,60	2,09	9,10
Τρυπτοφάνη*	Trp / W	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,22	μη πολική	Ουδέτερο	5,89	2,46	9,41
Τυροσίνη	Tyr / Y	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,19	πολική	Ουδέτερο	5,64	2,20	9,21
Βαλίνη*	Val / V	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,14	μη πολική	Ουδέτερο	6,00	2,39	9,74

Τα αμινοξέα είναι σταθερές ενώσεις, μη αποστάξιμες, ευδιάλυτες σε νερό, δυσδιάλυτες σε αλκοόλη και αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες.

1.1.2 Σχηματισμός των Αμινοξέων

Τα αμινοξέα αποτελούν τους βασικούς δομικούς λίθους των πρωτεϊνών και σε αντίθεση με τις δυο άλλες βασικές κατηγορίες θρεπτικών συστατικών (υδατάνθρακες, λίπη) περιλαμβάνουν άζωτο σε ποσοστό 16%. Οι πρωτεΐνες θεωρούνται απαραίτητες για οποιοδήποτε ζωντανό οργανισμό, και μετά το νερό, συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος του βάρους του σώματος. Περίπου 28 αμινοξέα σχετίζονται με την διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου. Το ήπαρ παρασκευάζει το 80% αυτών των αμινοξέων, αλλά το υπολειπόμενο 20% πρέπει ο οργανισμός απαραιτήτως να το προμηθευτεί από τις τροφές και τα αμινοξέα αυτά ονομάζονται απαραίτητα.

Ανθρακικός Σκελετός. Ο σχηματισμός του ανθρακικού σκελετού όλων των αμινοξέων προέρχεται από **α)**- Διάφορα ενδιάμεσα της γλυκόλυσης, **β)**- Τον κύκλο του κιτρικού οξέος και **γ)**- Την οδό των φωσφορικών πεντοζών.

Σχηματισμός και Εισαγωγή αμινικής ομάδος. Το άζωτο εισέρχεται στις βιοχημικές αυτές οδούς μέσω της γλουταμίνης και του γλουταμινικού οξέος, ως δότες αμινομάδων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται **α)**- Η καθήλωση του αζώτου με την αναγωγή του [N₂] προς [NH₃] από τα αναγωγικά βακτήρια, **β)**-η ενσωμάτωση του [NH₄⁺] στα αμινοξέα και ακολουθεί **3)**- Ο καθορισμός της στεreoχημείας των αμινοξέων.

1.1.3 Βιολογική αποστολή των Αμινοξέων.

Από βιολογικής άποψης, τα είκοσι τρία πρωτεϊνογενικά L-α-αμινοξέα καθώς και τα παράγωγά τους είναι ενώσεις, με τεράστια σπουδαιότητα στη βιοχημεία και εξέχουσα αποστολή, στην λειτουργία του κυττάρου, αφού:

α)-Παρέχουν τους απαραίτητους μονομερείς δομικούς λίθους, από τους οποίους συντίθενται οι μακρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών,

β)-Συμμετέχουν, ως ενδιάμεσοι παράγοντες, στις κυτταρικές λειτουργίες και στα διάφορα στάδια του μεταβολισμού, με τόσο διαφορετικές και ποικίλλες αποστολές, όπως οι νευρικές διαβιβάσεις, η βιοσύνθεση των πορφυρινών, η βιοσύνθεση των πουρινών, η βιοσύνθεση των πυριμιδινών και η βιοσύνθεση της ουρίας.

γ)-Μικρά πολυμερή των αμινοξέων, τα πεπτίδια και πολυπεπίδια εκτελούν εξέχοντες ρόλους στο ενδοκρινικό και νευρικό σύστημα, όπως των ορμονών, των παραγόντων απελευθέρωσης ορμονών, των νευρο-τροποποιητών και των νευροδιαβιβαστών.

Τα φυσικά αυτά αμινοξέα, που ανοικοδομούν και διατάσσονται εντός των πρωτεϊνών, μεταφέρουν μια τεράστια σειρά ευέλικτων διατάξεων των διαφόρων χημικών ουσιών. Όλα τους είναι L-α- αμινοξέα. Υπάρχουν βέβαια και άλλες χημικές ενώσεις, που σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό είναι αμινοξέα, πλην όμως δεν εμφανίζονται στις φυσικές πρωτεΐνες, όπως η ορνιθίνη.

Από τα είκοσι τρία, ως βασικά θεωρούνται τα εννέα (9) αμινοξέα: η Λευκίνη, η Λυσίνη, η Μεθειονίνη, η Τρυπτοφάνη, η Φαινυλαλανίνη, η Θρεονίνη, η Ιστιδίνη, η Ισολευκίνη και η Βαλίνη.

Δεκατέσσερα χαρακτηρίζονται ως μη-βασικά και κατά συνέπεια αναγκαία - απαραίτητα ή και ημι-απαραίτητα και αυτά είναι: η Αλανίνη, η Αργινίνη, η Ασπαραγίνη, το Ασπαραγινικό οξύ, η Γλουταμίνη, το Γλουταμινικό οξύ, η Γλυκίνη, η Κυστεΐνη, η Προλίνη, η Πυρρολυσίνη, η Σεληνοκυστεΐνη, η Σερίνη, η Τυροσίνη και η Υδροξυπρολίνη. Τα αμινοξέα αυτά ο οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει και θα πρέπει οπωσδήποτε να τα προσλάβει μέσω της διατροφικής οδού.

Υπόψη ότι τα πρωτεϊνικά μόρια αποτελούνται από πολλά αμινοξέα, που σχηματίζουν μακρές και ατέρμονες αλυσίδες. Στις **πρωτεΐνες** απαντώνται αποκλειστικώς και μόνο

τα **α -αμινοξέα**, (είτε **βασικά**, είτε **απαραίτητα**), τα οποία λόγω της φύσης τους, περιέχοντας όξινη ($-\text{COOH}$) και βασική ($-\text{NH}_2$) ομάδα στο μόριό τους, παρουσιάζουν τόσο όξινο όσο και βασικό χαρακτήρα. Τα α -αμινοξέα $\text{R}-(\text{NH}_2)\text{C}(\text{H})-\text{COOH}$ είναι οπτικώς ενεργά μόρια και εμφανίζουν την απεικόνιση -L.

1.1.4 Κατάταξη των αμινοξέων

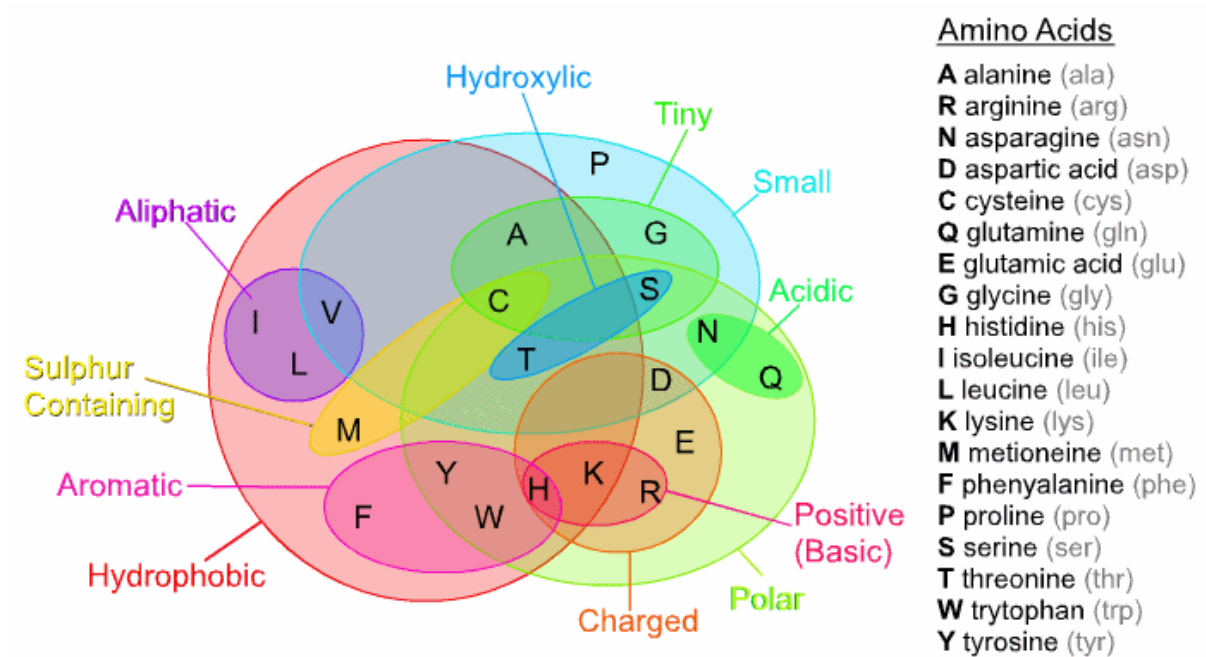
Τα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους. Ένας τρόπος ταξινόμησης είναι π.χ. σε όξινα, βασικά και ουδέτερα, ανάλογα με το πόσες καρβοξυλικές και πόσες αμινικές ομάδες έχει στο μόριό του το κάθε αμινοξύ. Τα αμινοξέα, που συναντώνται στις διάφορες πρωτεΐνες μπορούν να καταταχθούν σε ουδέτερα, όξινα, βασικά, αρωματικά, αλειφατικά, θειούχα κλπ. Μια άλλη διάκριση γίνεται ανάλογα με τη φύση της πλευρικής ομάδας. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή τα αμινοξέα μπορούν να διακριθούν σε αρωματικά, αλειφατικά, θειούχα κλπ. καθώς επίσης και σε πολικά ή μη πολικά. Ανάλογα με το είδος της πλευρικής ομάδας $-\text{R}$, τα αμινοξέα διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες: άκυκλα και κυκλικά, και καθεμία από αυτές σε υποομάδες, όπως:

I) Άκυκλα αμινοξέα:

- α)- Μονοαμινοκαρβοξυλικά οξέα: αλανίνη, βαλίνη, γλυκίνη, λευκίνη.
- β)- Μονοαμινοδικαρβοξυλικά οξέα: ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ.
- γ)- Διααμινοκαρβοξυλικά οξέα: ορνιθίνη, αργινίνη, λυσίνη.
- δ)- Υδροξυοξέα: σερίνη, θρεονίνη.
- ε)- Θειούχα αμινοξέα: κυστεΐνη, κυστίνη, μεθειονίνη.

II) Κυκλικά αμινοξέα:

- α) αμινοξέα αρωματικής σειράς: φαινυλαλανίνη, τυροσίνη.
- β) αμινοξέα ετεροκυκλικής σειράς: ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, προλίνη.



Σχήμα 1.1.4.1 Διάγραμμα Venn των εγχρώμων περιοχών, κατάταξης όλων των αμινοξέων. Το διάγραμμα κωδικοποιείται με βάση τις κυριότερες φυσικο-χημικές ιδιότητες των αμινοξέων. Τα είκοσι βασικά-απαραίτητα αμινοξέα έχουν τοποθετηθεί, με το χαρακτηριστικό κεφαλαίο γράμμα του αλφαβήτου, (Livingstone & Geoffrey, 1993).

Ένας τρόπος διάκρισης των αμινοξέων καθαρά λειτουργικός είναι η ταξινόμησή τους σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Με τον όρο απαραίτητα χαρακτηρίζουμε τα αμινοξέα εκείνα τα οποία δεν είναι δυνατόν να συντεθούν από τον οργανισμό και πρέπει να χορηγούνται έτοιμα από τις τροφές (Jensen, 2007).

Αντίθετα, μη απαραίτητα λέγονται τα αμινοξέα εκείνα που μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό με διάφορους μεταβολικούς δρόμους. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι τα απαραίτητα αμινοξέα ποικίλουν για κάθε οργανισμό. Για τον άνθρωπο π.χ. τα απαραίτητα αμινοξέα είναι οκτώ (βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, λυσίνη, μεθειονίνη και θρεονίνη). Για τον επίμυα ένα επιπλέον απαραίτητο αμινοξύ είναι η ιστιδίνη (Friedman, 1999 ; Friedman, 2010).

1.1.5 Απαραίτητα αμινοξέα

Πολλά από τα αμινοξέα που παραλαμβάνει ο άνθρωπος με τη διατροφή, μέσω των πρωτεϊνών των τροφίμων, μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό για τις θρεπτικές του ανάγκες. Ορισμένα όμως αμινοξέα δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός και για αυτό πρέπει υποχρεωτικά να τα παραλαμβάνει από τις τροφές. Ακριβώς για αυτό το ρόλο τους τα αμινοξέα αυτά χαρακτηρίζονται ως «**απαραίτητα**» ή «**ουσιώδη**», καθώς η δράση τους δεν μπορεί να αντικατασταθεί από άλλα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων και επομένως πρέπει να λαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες μέσω των τροφίμων. Ως απαραίτητα αμινοξέα χαρακτηρίζονται: βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, θρεονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη. Η αργινίνη και η ιστιδίνη θεωρούνται απαραίτητα μόνο για τους αναπτυσσόμενους οργανισμούς (Weber, et al., 1981).

Οι ποσότητες που χρειάζεται ο οργανισμός να λαμβάνει καθημερινά από κάθε αμινοξύ έχουν υπολογιστεί και οι αναλογίες των απαραίτητων αμινοξέων περιλαμβάνονται σε σχετικό πρότυπο (profile) αμινοξέων του FAO (Food Agriculture Organisation). Όταν στη διατροφή του ανθρώπου υπάρχει ανεπαρκής ποσότητα ή έλλειψη κάποιου αμινοξέος, προκαλούνται προβλήματα στην υγεία όπως διαταραχές στην ανάπτυξη, μεταβολές στο δέρμα και γενικές διαταραχές του πρωτεϊνικού και γενικού μεταβολισμού. Με βάση το πρότυπο των αμινοξέων μπορεί να εκτιμηθεί η βιολογική αξία (ή ποιότητα) μίας πρωτεΐνης ή ενός πρωτεϊνούχου τροφίμου που ουσιαστικά δηλώνει το κατά πόσον ο οργανισμός μπορεί να χρησιμοποιήσει τις πρωτεΐνες της διατροφής. Περαιτέρω η βιολογική αξία μίας πρωτεΐνης ή ενός τροφίμου περιορίζεται από τα αμινοξέα εκείνα τα οποία περιέχονται σε ποσότητες μικρότερες από τα αντίστοιχα ελάχιστα απαιτούμενα όρια. Τα αμινοξέα αυτά ονομάζονται **ελλείποντα ή περιοριστικά** ουσιώδη αμινοξέα.

Αξιολογώντας τις διάφορες πηγές τροφίμων από πρωτεϊνική άποψη, προκύπτει ότι οι ζωικές πρωτεΐνες έχουν καλές αναλογίες απαραίτητων αμινοξέων και συνεπώς υψηλή βιολογική αξία. Από την άλλη πλευρά οι φυτικές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιολογική αξία λόγω ανεπάρκειας απαραίτητων αμινοξέων. Η βιολογική τους αξία όμως μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη των αντίστοιχων αμινοξέων που λείπουν μέσω συνδυασμού πρωτεϊνών ή τροφίμων. Παρατίθεται μία σύντομη

ανάπτυξη των θεμελιωδών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, καθενός από τα κυριότερα αμινοξέα, κατ' αλφαβητική σειρά. Παρακάτω εμφανίζονται τα κυριότερα αμινοξέα-δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών, μαζί με τις χρησιμότερες φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

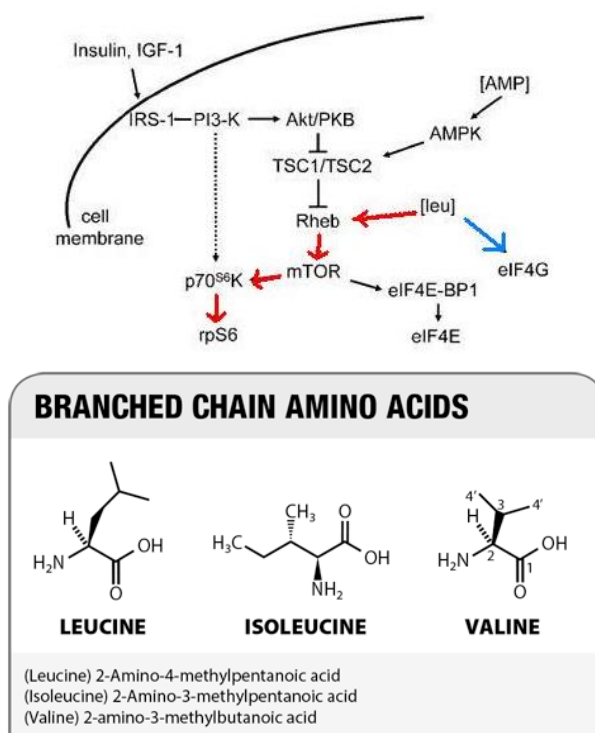
1.1.6 Διακλαδισμένα αμινοξέα (branched-chain amino acid, bcaa's)

Ένα αμινοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA's) περιέχει αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες με μια διακλάδωση, δηλαδή ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, συνδεδεμένο με τρία ή περισσότερα άτομα άνθρακα. Μεταξύ των πρωτεϊνογενετικών αμινοξέων, υπάρχουν τρία BCAA's: η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη. Στα μη-πρωτεϊνογονικά BCAA's περιλαμβάνονται: η νορβαλίνη και το 2-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ. Τα τρία πρωτεϊνογόνα BCAA's, είναι μεταξύ των εννέα απαραίτητων αμινοξέων για τον άνθρωπο, αντιπροσωπεύοντας το 35% των βασικών αμινοξέων στις πρωτεΐνες των μυών και το 40% των προσχηματισμένων αμινοξέων, που απαιτούνται από τα θηλαστικά (Rosenthal, 1982).

Τα BCAA's ανευρίσκονται σε τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Μεγάλο ενδιαφέρον για τα BCAA's εκδηλώνεται από τους αθλητές, αφού αποτελούν τα μοναδικά αμινοξέα που μεταβολίζονται στους μύες, αποτελώντας το 33% της πρωτεΐνης του μυϊκού ιστού. Για τον λόγο αυτό αποτελούν δημοφιλές συμπλήρωμα διατροφής για άτομα που ακολουθούν έντονο πρόγραμμα εκγύμνασης. Τα BCAA's αμινοξέα είναι απαραίτητα διότι ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να τα συνθέσει από μόνος του, που σημαίνει ότι πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της τροφής ή συμπληρωμάτων. Τα BCAA's αμινοξέα αποτελούν το 40% των ημερήσιων αναγκών από όλα τα δέκα τέσσερα απαραίτητα αμινοξέα.

Η αποικοδόμηση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας εμπλέκει το διακλαδισμένης αλυσίδας σύμπλοκο α-κετο οξέος- αφυδρογονάσης (BCKDH). Μια ανεπάρκεια αυτού του συμπλόκου οδηγεί σε μια συσσώρευση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) και των τοξικών παρα-

προϊόντων τους, όπως τα α-κετο-οξέα, στο αίμα και στα ούρα, δημιουργώντας προϋποθέσεις για την ονομαζόμενη ασθένεια των ούρων, σιρόπι σφενδάμου.



Σχήμα 1.1.6.1 Η βιοχημική οδός της αποικοδόμησης των BCAA's αμινοξέων.

Το συγκρότημα BCKDH μετατρέπει τα διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέα, σε παράγωγα του ακυλο-συνένζυμου A, τα οποία μετά τις επόμενες αντιδράσεις μετατρέπονται, είτε σε ακετυλο-CoA, είτε σε ηλεκτρυλο-CoA, που εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Τα ένζυμα που εμπλέκονται είναι η αμινοτρανσφεράση-διακλαδισμένης αλυσίδας και η αφυδρογονάση-3-μεθυλο-2-οξοβουτανοϊκών (Lelaisetal., 2004).

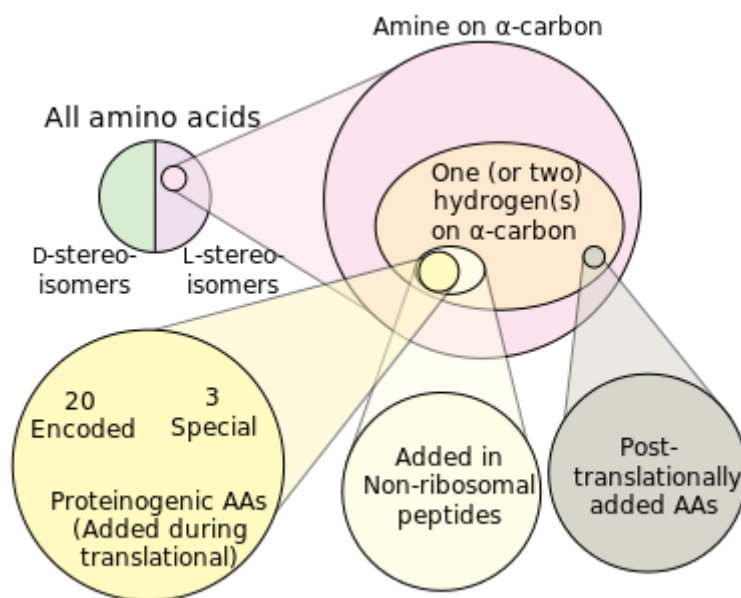
1.2 ΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΟ-ΓΕΝΙΚΑ Η ΜΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

1.2.1 Εισαγωγή

Από βιοτεχνολογικής και επιστημονικής άποψης, κάθε οργανική ένωση, που περιέχει μία αμινομάδα (-NH₂) και ένα καρβοξυλικό οξύ (-COOH), ως λειτουργικές ομάδες

είναι ένα αμινοξύ. Τα πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα είναι μικρό υποσύνολο αυτής της ομάδας, που διαθέτουν ένα κεντρικό άτομο άνθρακα (α - ή 2-) φέρουν μια αμινομάδα, μια καρβοξυλομάδα, μια πλευρική αλυσίδα και ένα άτομο α -υδρογόνου, με λεβο-διαμόρφωση, με εξαίρεση την γλυκίνη, η οποία είναι ένα μη-χειραλικό αμινοξύ και την προλίνη, της οποίας η αμινική ομάδα είναι μία δευτεροταγής αμίνη και συνεπώς συχνά αναφέρεται ως ένα ιμινο- οξύ.

Στην Βιοχημεία τα αμινοξέα που δεν είναι φυσικώς κωδικοποιημένα (naturally coded) ή δεν ανευρίσκονται στο γενετικό κώδικα (genetic code) οποιονδήποτε οργανισμών είναι τα μη-πρωτεϊνογόνα (non-proteinogenic), τα αφύσικα αμινοξέα (unnatural) και τα μη-κωδικοποιημένα (non-coded). Παρά τη χρήση μόνο εικοσιτριών (23) αμινοξέων, που είναι γνωστά από τον μεταφραστικό μηχανισμό (translational mechanism), στην συναρμολόγηση των πρωτεϊνών (τα πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα) και εικοσιένα (21) που ανευρίσκονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, πάνω από εκατόν σαράντα (140) φυσικά αμινοξέα είναι γνωστά, ενώ χιλιάδες περισσότεροι συνδυασμοί δύνανται να προκύψουν εξ' αυτών. Αρκετά μη πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα είναι σημαντικά, επειδή συμμετέχουν:



Σχήμα 1.2.1.1 Η σχετική κατανομή των μέχρι σήμερα γνωστών αμινοξέων σε συστηματικές ομάδες ανάλογα με την φυσικοχημική τους ταυτότητα και την λειτουργία τους στον έμβιο και μη έμβιο κόσμο.

1)- ως ενδιάμεσα στην βιοχημική διαδικασία της βιοσύνθεσης, 2)- ως υστερο-μεταφραστικά(post-translational), ενσωματωμένα σε πρωτεΐνες, 3)- στην εξυπηρέτηση φυσιολογικών ρόλων, όπως: συστατικά βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων, νευροδιαβιβαστές και τοξίνες, 4)- σε φυσικές και τεχνητές φαρμακολογικές ενώσεις, 5)- σε μετεωρίτες και 6)- σε πρεβιοτικά πειράματα, όπως το πείραμα Miller-Urey, (Ambrogelly et al., 2007).

Τα πρωτεϊνογόνα αμινοξέα (Proteinogenicaminoacids) είναι ένα μικρό κλάσμα της μεγάλης οικογενείας όλων των αμινοξέων. Διακρίνονται οι παρακάτω κατηγορίες ταξινόμησης των γνωστών μέχρι σήμερα αμινοξέων:

- Είκοσι (20) **ΑπαραίτητακαιΒασικά** αμινοξέα.
- Είκοσι τρία (23) **Πρωτεϊνογόνα** αμινοξέα.
- Ογδόντα (80) περίπου αμινοξέα που δημιουργούνται **Αβιοτικά**.
- Εννιακόσια (900) παράγονται μέσω **Φυσικών Οδών**(naturalpathways).
- Εκατόν δέκα οκτώ (118) αμινοξέα έχουν **Εισαχθεί σε Πρωτεΐνες**.

Αυτές οι κατηγορίες συνήθως αλληλο-επικαλύπτονται, αλλά δεν είναι ταυτοτικές. Όλα και τα 23 πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα βιο- συντίθενται από οργανισμούς, αλλά δεν είναι όλα τους αβιοτικά (που βρίσκονται στα προβιοτικά πειράματα και στους μετεωρίτες), όπως η ιστιδίνη. Πολλά αμινοξέα, όπως η ορνιθίνη είναι μεταβολικά ενδιάμεσα, παράγονται βιοτικά, αλλά δεν είναι κωδικοποιημένα. Άλλα ευρίσκονται αποκλειστικά και μόνο σε μεταβολικά ενδιάμεσα, όπως η κιτρουλίνη. Άλλα ανευρίσκονται αποκλειστικά στα μείγματα αβιοτικών, όπως α-μεθυλο-νορβαλίνη. Πάνω από τριάντα (30) μη φυσικά αμινοξέα έχουν μεταφραστικά εισαχθεί σε διάφορα συστήματα πρωτεϊνών, αλλά ακόμη δεν είναι βιο-συνθετικά,(Weberetal., 1981).

Ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί μόνο είκοσι (20) τυπικά αμινοξέα, (Weber & Miller, 1981). Ωστόσο, υπάρχουν τρία επιπλέον πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα: η **σελενο-κυστεΐνη**, η **πυρρολυσίνη** και η **N-φορμυλ-μεθειονίνη**. Τα δύο πρώτα δεν έχουν ένα ειδικό κωδικόνιο (codon), αλλά προστίθενται στη θέση ενός τερματικού (στοπ)

κωδικονίου, όταν υπάρχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία, UGA κωδικόνιο, ένα στοιχείο Secis για την σεληνοκυστεΐνη και μία Uag Pylis καταβολική (downstream) ακολουθία, για την πυρρολυσίνη (Rotheretal., 2010). Η φορμυλμεθειονίνη αποτελεί αμινοξύ, που κωδικοποιείται από την έναρξη του κωδικονίου AUG στα βακτήρια, στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες, αλλά συχνά απομακρύνεται υστερο-μεταφραστικά (post translationally), (Ambrogelly et al., 2007).

1.3 ΦΥΣΙΚΕΣ, ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.

Οι κύριες ιδιότητες των αμινοξέων οφείλονται στο γεγονός ότι τα αμινοξέα είναι αμφολύτες, μπορούν δηλαδή να συμπεριφέρονται άλλοτε ως οξέα και άλλοτε ως βάσεις. Στο σημείο αυτό θα αναφερθούν οι κυριότερες αντιδράσεις των αμινοξέων, πολλές από τις οποίες χρησιμεύουν για την αναγνώριση τους σε μίγματα ή για τη σύνθεση πεπτιδίων.

1.3.1 Αντιδράσεις καρβοξυλομάδας

Μέσω της καρβοξυλομάδας το αμινοξύ μπορεί να σχηματίσει: • [αμίδια], • [αλογονίδια], • [εστέρες] και • [άλατα]

Μία σημαντική αντίδραση της καρβοξυλομάδας που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του καρβοξυ-τελικού άκρου των πρωτεϊνών είναι η αναγωγή με βοριουδρίδιο του λιθίου (LiBH_4) και παραγωγή του αντίστοιχου αλογονούχου παραγώγου του αμινοξέος.

1.3.2 Αντιδράσεις αμινομάδας

Εκτός από τις γνωστές αντιδράσεις των αμινοξέων, η α-αμινομάδα των αμινοξέων αντιδρά:

- Με γλωφρανθρακικό βενζόλιο και σχηματίζει το αντίστοιχο καρβοβενζόξυ-παράγωγο. Η αντίδραση χρησιμοποιείται για την προστασία της α-αμινομάδας κατά τη σύνθεση πεπτιδίων.
- Με φθορο-δίνιτρο-βενζόλιο και σχηματίζει το αντίστοιχο δινιτροφαινυλ- παράγωγο το οποίο έχει κίτρινο χρώμα. Η αντίδραση χρησιμοποιείται για την αναγνώριση του αμινο-τελικού άκρου των πρωτεϊνών.
- Με ισοθειοκυανικό φαινύλιο. Η αντίδραση χρησιμοποιείται για την αναγνώριση του αμινο-τελικού άκρου των πρωτεϊνών.
- Με αλδεΐδες και σχηματίζει ασθενείς βάσεις (βάσεις Schiff). Οι βάσεις Schiff συναντώνται ως ενδιάμεσα προϊόντα σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων.
- Με νινυδρίνη σχηματίζοντας ένα έγχρωμο παράγωγο. Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων.

1.3.3 Αντιδράσεις πλευρικής αλυσίδας

Τα αμινοξέα, μέσω των πλευρικών ομάδων R δίνουν χαρακτηριστικές αντιδράσεις με έγχρωμα συνήθως προϊόντα.

- Το αρωματικό αμινοξύ τυροσίνη μέσω της φαινολικής ομάδας αντιδρά με νιτρικό υδράργυρο παρουσία νιτρικού οξέος και ιχνών νιτρώδους οξέος (αντίδραση Millon) και προκύπτει κόκκινο χρώμα.
- Τα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνη και ιστιδίνη δίνουν κόκκινο χρώμα όταν αντιδράσουν σε αλκαλικό περιβάλλον με σουλφανυλικό οξύ που έχει διαζωτωθεί (αντίδραση Pauly).
- Η τρυπτοφάνη δίνει ερυθροιώδες χρώμα όταν αντιδράσει με π-διμεθυλ-αμινοβενζαλδεΐδη (αντίδραση Ehrlich).
- Το θειούχο αμινοξύ κυστεΐνη, λόγω της σουλφυδρυλομάδας της, δίνει κόκκινο παράγωγο όταν αντιδράσει με νιτροπρωσσικό νάτριο σε αραιή αμμωνία (αντίδραση Arnold).

- Το βασικό αμινοξύ αργινίνη, λόγω της παρουσίας της γουανιδίνης που περιέχει στη πλευρική της αλυσίδα δίνει ένα κόκκινο παράγωγο όταν αντιδράσει με 9 ναφθόλη και υποχλωριώδες νάτριο σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση Sakaguchi). Από βιολογική άποψη, η σημαντικότερη αντίδραση των αμινοξέων είναι η αντίδραση της αμινομάδας ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος με δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού και σχηματισμό ενός διπεπτιδίου.

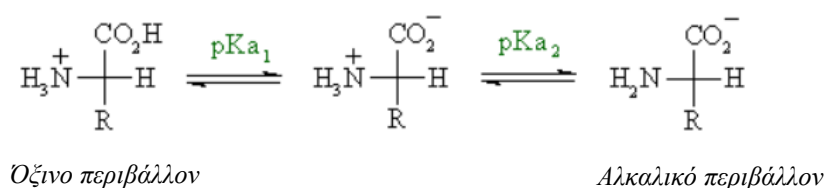
1.3.4 Ισοηλεκτρικό σημείο

Τα αμινοξέα σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται σε μορφή διπολικών ιόντων (εσωτερικά άλατα, αμφολύτες, Zwitterions) και όχι στη μορφή αδιάστατων μορίων, δηλαδή έχουν ιοντισμένες τόσο τις αμινο- όσο και τις καρβοξυλο- ομάδες (το καρβοξύλιο χάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά αρνητικό φορτίο, ενώ η αμινομάδα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά θετικό φορτίο).



Σχήμα 1.3.4.1 Η αμφιπολικότητα (διπολικότητα) των μορίων αμινοξέων

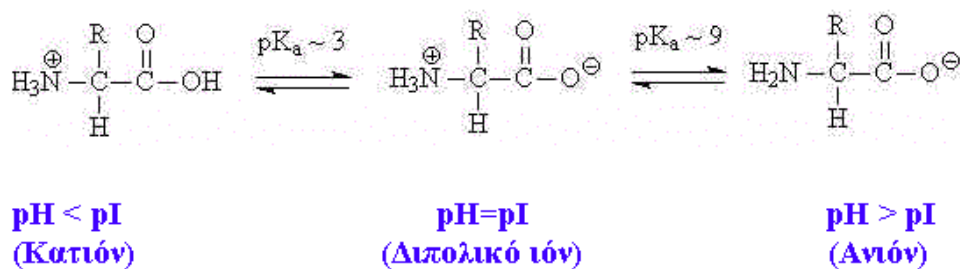
Τα αμινοξέα ως αποτέλεσμα του επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα τους συμπεριφέρονται ανάλογα με το pH του διαλύματος, άλλοτε ως οξέα σε αλκαλικό περιβάλλον (υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ως ανιόντα οδεύουν στην άνοδο), ή ως βάσεις σε όξινο περιβάλλον (υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ως κατιόντα οδεύουν στην κάθοδο):



Η θέση της ισορροπίας για κάθε αμινοξύ εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Σε συγκεκριμένη τιμή pH, σαφώς καθορισμένη, τα αμινοξέα εμφανίζονται ηλεκτρικά ουδέτερα και δεν μεταναστεύουν υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Σε αυτήν την τιμή pH οι συγκεντρώσεις του συζυγούς οξέος και της συζυγούς βάσης εξισώνονται και εκεί ακριβώς αντιστοιχεί η μέγιστη συγκέντρωση του διπολικού ιόντος. Το σημείο αυτό είναι γνωστό ως **ισοηλεκτρικό σημείο (pI)**, είναι σαφώς καθορισμένο για κάθε αμινοξύ και έχει ιδιαίτερη σημασία για αυτό. Το ισοηλεκτρικό σημείο ενός αμινοξέος μπορεί να υπολογιστεί από τις τιμές pK_a αυτού:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

Τα αμινοξέα σε υδατικό διάλυμα, συνεπώς, ανάλογα με την τιμή του pH έχουν όξινη ή βασική συμπεριφορά.



pI = Ισοηλεκτρικό σημείο

Σχήμα 1.3.4.2 Οι τρεις ιοντισμένες μορφές των μορίων των αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι ηλεκτρολύτες και εμφανίζουν όξινες και βασικές ιδιότητες. Το φορτίο του αμινοξέος εξαρτάται από το **pH**. Ισοηλεκτρικό σημείο (**pI**) αμινοξέος είναι η τιμή του pH όπου υπάρχει κυρίως ως διπολικό ιόν, δηλαδή είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Τα μονοαμινο-δικαρβοξυλικά οξέα, όπως το γλουταμινικό οξύ, είναι ισχυρά οξέα, ενώ τα διααμινο-καρβοξυλικά οξέα, όπως η λυσίνη είναι ισχυρές βάσεις.

1.4 Διαχωρισμός των αμινοξέων

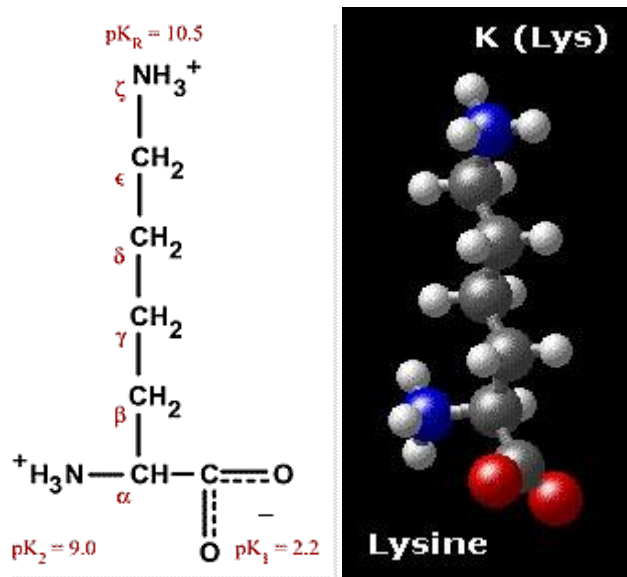
Ο διαχωρισμός των διαφόρων αμινοξέων γίνεται συνήθως με χρωματογραφικές ή ηλεκτροφορητικές μεθόδους. Η χρωματογραφία κατανομής σε χαρτί στηρίζεται στην αρχή ότι τα διάφορα αμινοξέα προχωρούν με διαφορετική ταχύτητα στο χαρτί, υπό την επήρεια τριχοειδών φαινομένων, όταν κάποιος διαλύτης παρασύρει το δείγμα είτε κάθετα προς τα πάνω, είτε κάθετα προς τα κάτω. Στην ίδια αρχή στηρίζεται και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Και στις δυο μεθόδους, μετά το τέλος της χρωματογραφίας, τα αμινοξέα ανιχνεύονται με ψεκασμό του χαρτιού ή της πλάκας με νινυδρίνη και αναγνωρίζονται με βάση το R_f . R_f ορίζεται το πηλίκο της απόστασης που έχει διατρέξει το αμινοξύ προς την απόσταση που έχει διατρέξει το μέτωπο του διαλύτη στο χρωματογράφημα και είναι ένας απλός αριθμός. Οι τιμές R_f είναι χαρακτηριστικές για κάθε αμινοξύ σε δεδομένο σύστημα χρωματογραφίας.

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, τα διαφορετικά αμινοξέα δεσμεύονται όλα στο υλικό της στήλης σε συγκεκριμένο pH και στη συνέχεια, με μεταβολή του pH και αλλαγή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος, εκκλύονται σταδιακά από την στήλη, ανάλογα με το pK_a του καθενός. Τέλος, τα αμινοξέα διαχωρίζονται και με ηλεκτροφόρηση, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κινητικότητα των αμινοξέων ανάλογα με το φορτίο τους σε διαφορετικό pH, όταν υποβάλλονται σε ηλεκτρικό φορτίο.

1.5 Ονοματολογία κατά IUPAC

Σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης IUPAC, για την διαφοροποίηση των διαφόρων ατόμων άνθρακα, σε ένα οργανικό μόριο, γίνεται διαδοχική εκχώρηση ενός αριθμού σε κάθε άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που συμμετέχουν σε μία καρβοξυλική ομάδα. Πέραν τούτου οι άνθρακες κατά μήκος της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων μπορούν επίσης να σημανθούν με ελληνικά γράμματα, όπου ο **α -άνθρακας** είναι ο κεντρικός **χειρόμορφος άνθρακας**, που διαθέτει μια καρβοξυλομάδα, μία πλευρική αλυσίδα και στα α -αμινοξέα, μια αμινο- ομάδα. Ο άνθρακας των καρβοξυλικών ομάδων δεν υπολογίζεται και συνεπώς, τα ονόματα

πολλών μη-πρωτεϊνογόνων α-αμινοξέων ξεκινούν με 2-αμινο- και καταλήγουν σε -ικό οξύ.



Σχήμα 1.5.1 Αριστερά η αρίθμηση των ανθράκων στο μόριο της λυσίνης και δεξιά η στερεοχημική αναπαράσταση της δομής της. Δίνονται επίσης και οι τρεις σταθερές ιοντισμού της Λυσίνης.

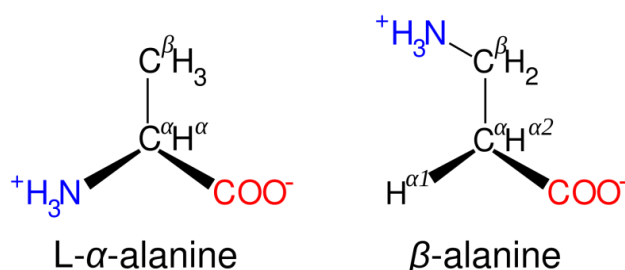
1.6 ΦΥΣΙΚΑ ΜΗΛ-α-ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Τα περισσότερα φυσικά αμινοξέα είναι α-αμινοξέα στην L- στερεοχημική διαμόρφωση, αλλά υπάρχουν και ορισμένες εξαιρέσεις, μη α-αμινοξέων σε διάφορους οργανισμούς. Σε αυτές τις δομές, η αμινομάδα μετατοπίζεται περαιτέρω από το όξινο άκρο της καρβοξυλικής ομάδος του μορίου του αμινοξέος. Έτσι ένα β-αμινοξύ έχει την αμινομάδα συνδεδεμένη με τον δεύτερο άνθρακα στη σειρά και ένα γ-αμινοξύ με τον τρίτο άνθρακα. Η συχνότητα χρήσεως των α-αμινοξέων στην ανοικοδόμηση των πρωτεϊνών έχει συνδεθεί και με την παρουσία τους, τόσο στους μετεωρίτες, όσο και στα προβιοτικά πειράματα, ενώ η θεώρηση ότι οι δηλητηριώδεις ιδιότητες των β-αμινοξέων αποδίδονται στην δευτεροταγή δομή τους, αποδείχθηκε

λανθασμένη. Παραδείγματα τέτοιων αμινοξέων περιλαμβάνουν: την **β-αλανίνη**, την **GABA** και το **δ-αμινολεβουλινικό οξύ**.

1.6.1 β-ALANINE, beta-ALANINE.

Η β-αλανίνη ή 3-αμινοπροπανικό οξύ (IUPAC name: **3-aminopropanoic acid**) είναι ένα άοσμο β-αμινοξύ, που υπάρχει στη φύση και στο οποίο η αμινομάδα είναι στη **β-θέση**, από την καρβοξυλική ομάδα, δηλαδή δύο άτομα μακριά. Σε αντίθεση με τον ομόλογό της α-αλανίνη, η β-αλανίνη δεν διαθέτει στερεογωνικό κέντρο. Χημικός Τύπος: $C_3H_7NO_2$, Σημείο τήξης: $207^{\circ}C$ (υπό διάσπαση), $d: 1,44 \text{ g/cm}^3$, M.B.= $89,09 \text{ g/mol}$, $\log P = -3,05$ και $pK_a = 3,63$. Διαλυτότητα στο ύδωρ: $54,5 \text{ g/100mL}$, διαλυτή στην μεθανόλη, αδιάλυτη σε αιθέρα και ακετόνη. LD_{50} (Μέση δόση, peroz σε αρουραίους) = 1000 mg/kg . Δεν χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση οιονδήποτε σημαντικών πρωτεϊνών ή ενζύμων. Σχηματίζεται πλάγια με την αποικοδόμηση της **διϋδροουρακίλης** και της **καρνοσίνης**.



Σχήμα 1.6.1.1 Σύγκριση της στερεοχημικής διαμόρφωσης L-α-αλανίνης (Αριστερά), με την β-αλανίνη (Δεξιά).

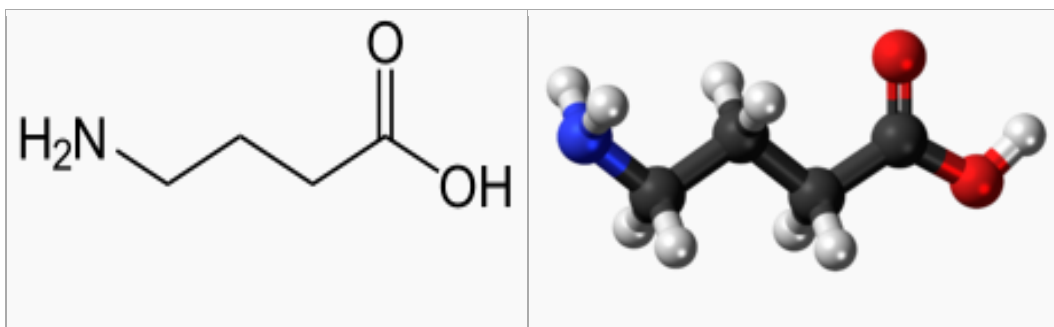
Είναι συστατικό των φυσικώς απαντώμενων πεπτιδίων **καρνοσίνης** και **ανσερίνης**, καθώς και του **παντοθενικού οξέος** (βιταμίνη B5), η οποία αφ' εαυτής είναι ένα συστατικό του συνένζυμου A. Υπό κανονικές συνθήκες, η β-αλανίνη μεταβολίζεται σε οξικό οξύ. Το αμινοξύ αυτό παράγεται από την ασπαρτική 1-αποκαρβοξυλάση και είναι μία πρόδρομη ένωση για το συνένζυμο-A. Η βήτα-αλανίνη έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την μυϊκή αντοχή. Τα συμπληρώματα της Βήτα-αλανίνης μπορούν επίσης να βελτιώσουν τις αποδόσεις των αθλητών, σε ασκήσεις κωπηλασίας ή σπριντ και σε επίπεδα μέτριας έως υψηλής καρδιαγγειακής έντασης.

Όταν λαμβάνονται συμπληρώματα διατροφής βήτα-αλανίνης, τότε αυτή μετατρέπεται σε μόριο καρνοσίνης, το οποίο δρα ως ένα οξέο-βασικό ρυθμιστικό του οργανισμού. Η καρνοσίνη αποθηκεύεται στα κύτταρα και απελευθερώνεται σε καταστάσεις επαγόμενης μείωσης του pH, πράγμα που συμβαίνει σε κατάσταση κέτωσης, λόγω παραγωγής κετόνης. Αυξημένα αποθέματα καρνοσίνης παρέχουν προστασία από επαγόμενη πτώση του pH, καθώς από την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος, στην έντονη μυική καταπόνηση. Τυπική ημερήσια δόση: 2-5g. Μεγάλες δόσεις βήτα-αλανίνης μπορεί να οδηγήσουν σε παραισθησία.

1.6.2γ-AMINOBOYTYPIKO OΞY, (GABA)

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (**IUPACname: 4-aminobutanoicacid**) συντέθηκε και αναγνωρίστηκε ως προϊόν του μεταβολισμού των φυτών και μικροβίων, για πρώτη φορά το 1883. Το 1950 ανακαλύφθηκε ότι το GABA είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος των θηλαστικών. CASNumber: 56-12-2, Χημικός Τύπος: $C_4H_9NO_2$, M.B.= 103,12 g/mol, Εμφάνιση: Κονιώδες λευκό μικροκρυσταλλικό, d=1,11 g/mL, M.P.=203,7 °C, B.P.=247,9°C, Διαλυτότητα στο νερό= 130g/100 mL, logP=-3,17, Οξύτητα (pK_a)=4,23 (καρβοξυλική ομάδα), 10,43 (αμινο-ομάς). Κύριοι κίνδυνοι: Ερεθιστικό, Επιβλαβές, LD₅₀ (μέση δόση) = 12,680 mg/ kg (peroz, επίμυες).

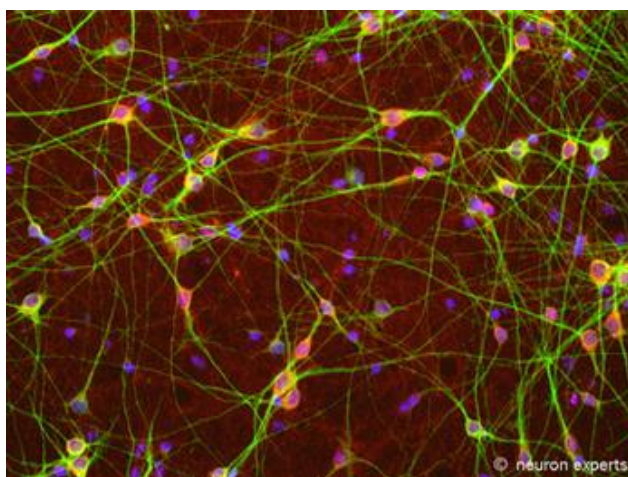
Είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Παίζει τον κυριότερο ρόλο στη μείωση της νευρωνικής διεγερσιμότητας, σε όλο το νευρικό σύστημα. Στον άνθρωπο το GABA είναι επίσης άμεσα υπεύθυνο, για τη ρύθμιση του μυϊκού τόνου. Παρόλο που από χημική άποψη είναι ένα αμινοξύ, το GABA σπάνια αναφέρονται ως τέτοιο στις επιστημονικές ή ιατρικές κοινότητες, επειδή ο όρος αναφέρεται κατά σύμβαση στα άλφα- αμινοξέα, στα οποία το GABA δεν ανήκει. Δεν θεωρείται επίσης ότι ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες.



Σχήμα 1.6.2.1 Συντακτικοί μοριακοί τύποι της στεreoχημικής διαμόρφωσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

Στα αναπτυξιακά στάδια που προηγούνται του σχηματισμού των συναπτικών επαφών, το GABA συντίθεται από τους νευρώνες και δρα αυτοκρινώς (στο ίδιο κύτταρο) και παρακρινώς (σε γειτονικά κύτταρα) ως διαμεσολαβητής σηματοδότησης. Οι γαγγλιονικές προεξοχές (eminences) συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην ανοικοδόμηση του κυτταρικού GABA-εργικού πληθυσμού του φλοιού.

Το GABA ρυθμίζει επίσης τον πολλαπλασιασμό των νευρικών προγονικών κυττάρων, το σχηματισμό των συνάψεων, την μετανάστευση, την διαφοροποίηση και την επιμήκυνση των νευριτών. GABA ρυθμίζει επίσης την ανάπτυξη των εμβρυϊκών και νευρικών βλαστικών κυττάρων.



Σχήμα 1.6.2.2 Απεικόνιση των Gaba-εργικών νευρώνων, τα οποία παράγουν το αμινοξύ GABA

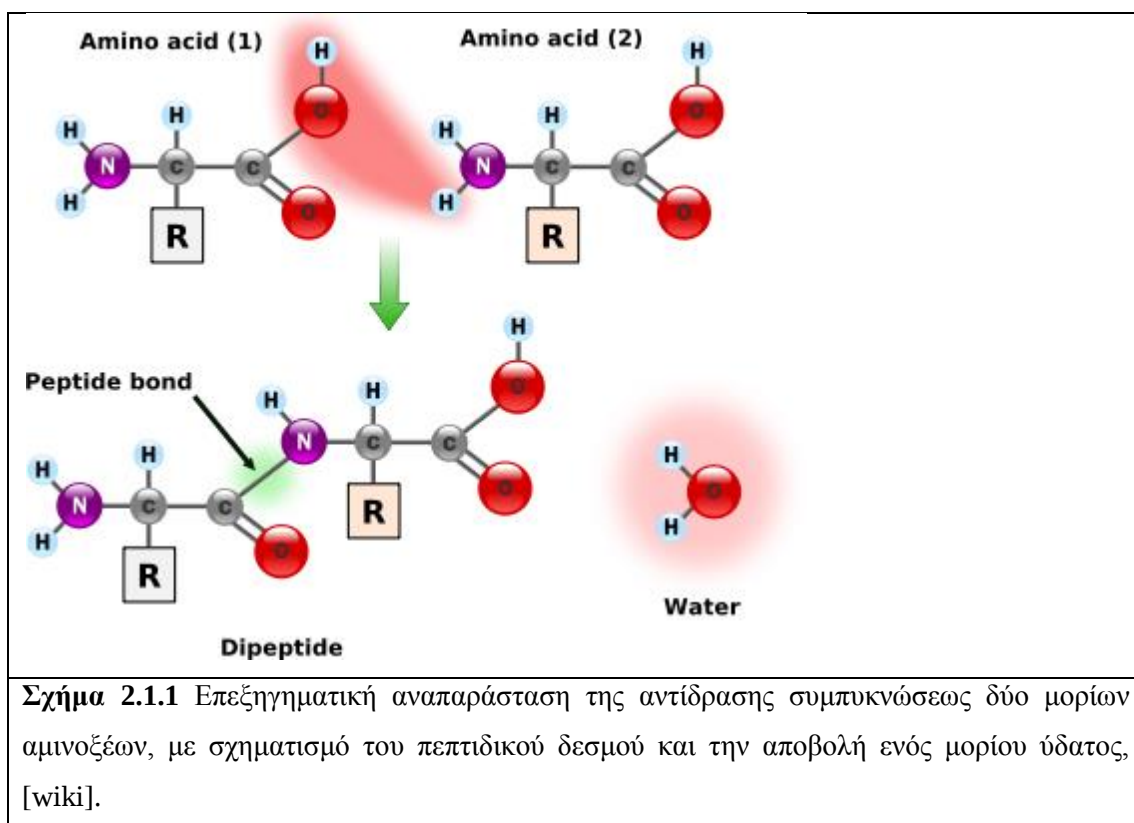
Το GABA μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των προγονικών νευρικών κυττάρων, μέσω της έκφρασης του νευροτροφικού παράγοντα (BDNF), που παράγεται στον εγκέφαλο. Το GABA ενεργοποιεί εξ' άλλου τον υποδοχέα GABA_A, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση- S και περιορίζοντας την ανάπτυξη. Η GABA ενισχύει τον καταβολισμό της σεροτονίνης σε N-Acetylserotonin (πρόδρομη της μελατονίνης) σε αρουραίους. Πιστεύεται ότι το GABA εμπλέκεται στη σύνθεση της μελατονίνης και επομένως μπορεί να ασκήσει ρυθμιστικά αποτελέσματα, στον ύπνο και στις αναπαραγωγικές λειτουργίες.

Καταβολισμός. Το ένζυμο GABA τρανσαμινάση καταλύει τη μετατροπή του 4-αμινο-βουτυρικού (GABA) και του 2-οξογλουταρικού οξέος (α-κετογλουταρικό) σε ηλεκτρική ημιαλδεύδη και γλουταμικά, αντίστοιχα. Η ηλεκτρική ημιαλδεύδη στη συνέχεια οξειδώνεται σε ηλεκτρικό οξύ, με την αφυδρογονάση της ηλεκτρικής ημιαλδεύδης και ως τέτοια εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος, ως αξιοποιήσιμη πηγή ενέργειας, (Bown&Shelp, 1997; Foster&Kemp, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΠΤΙΔΙΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.

Με τον όρο πεπτίδια (**peptides**), ολιγοπεπτίδια και πολυπεπτίδια χαρακτηρίζονται στην Βιολογία και στην Βιοχημεία οποιεσδήποτε οργανικές ενώσεις, που ανοικοδομούνται από δύο ή περισσότερους δομικούς λίθους αμινοξέων. Οι λίθοι αυτοί είναι αποκλειστικώς και μόνον τα αμινοξέα, τα οποία συνδέονται με χημικούς δεσμούς, που ονομάζονται εν προκειμένω **πεπτιδικοί δεσμοί** ή **δεσμοί πεπτιδίων** ή **δεσμοί συμπίκνωσης**. Τα πεπτίδια είναι ενώσεις [**n**] αμινοξέων, που ενώνονται μεταξύ τους, με τον λεγόμενο πεπτιδικό-αμιδικό δεσμό, κατά τον σχηματισμό του οποίου παράγονται και αποβάλλονται ταυτόχρονα [**n-1**] μόρια ύδατος (Palmore et al., 2000 ; Bodanszky, 1993).

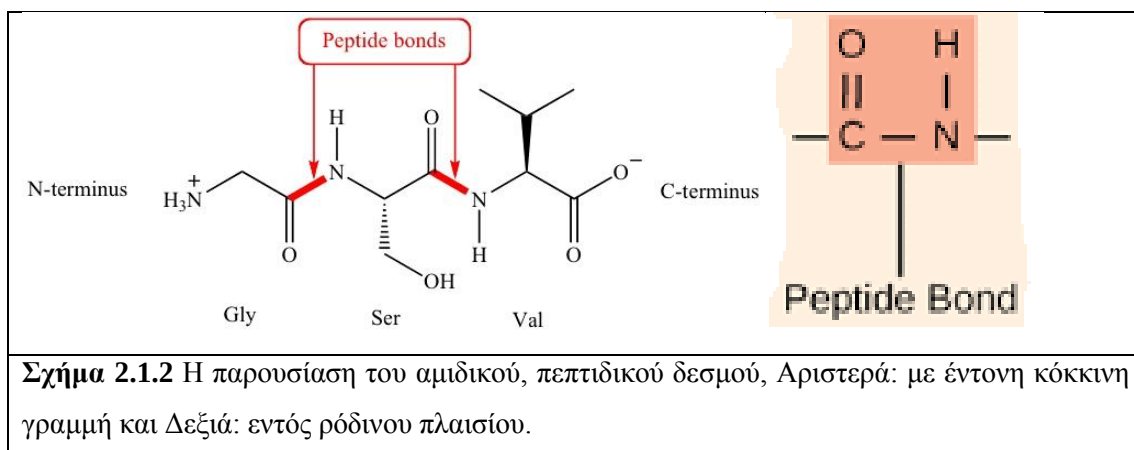


Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες, τόσο των πεπτιδίων, όσο και των πρωτεϊνών, που με την σειρά τους είναι οι πρόδρομες δομικές μονάδες των κυττάρων. Έχουν

ανιχνευτεί μέχρι σήμερα τουλάχιστον είκοσι τέσσερα διαφορετικά φυσικά αμινοξέα, τα οποία συνθέτουν και συμμετέχουν στην ανοικοδόμηση του τεράστιου αριθμού των πεπτιδίων και κατ' επέκταση του τεράστιου αριθμού των πρωτεϊνών, πάντοτε μέσω των πεπτιδικών και μόνον, ομοιοπολικών δεσμών. Όλα τα αμινοξέα πρωτεϊνογενικά και μή, περιέχουν άνθρακα, άζωτο, υδρογόνο, οξυγόνο και μερικά εξ' αυτών θείο(Krchnaketal., 1996) .

2.2 Ο ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

Η βιολογικώς θεμελιώδης ιδιότητα την οποία κέκτηνται τα αμινοξέα -βιογενικά και μη- είναι η δυνατότητα φυσικής επιλογής να αντιδρούν μεταξύ τους σε ατέρμονες, γραμμικές κατά κανόνα ακολουθίες, παρέχοντας πολυμερή πολυαμιδικά-πολυπεπτιδικά παράγωγα, τα οποία εισέρχονται και συμμετέχουν ενεργά στους βιοχημικούς κύκλους, της ίδιας της ζωής. Πιο συγκεκριμένα, η αμινομάδα ενός αμινοξέος μπορεί να αντιδράσει με την καρβοξυλομάδα του ιδίου, ή άλλου αμινοξέος, σχηματίζοντας ένα **διπεπτίδιο**, με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Ο δεσμός αυτός καλείται **πεπτιδικός δεσμός**(Bodanszky, 1994).



Το σχηματιζόμενο διπεπτίδιο εξακολουθεί να διαθέτει μία ελεύθερη αμινομάδα και μία ελεύθερη καρβοξυλομάδα, πράγμα που σημαίνει ότι η παραπάνω αντίδραση μπορεί να συνεχιστεί επ' αόριστον, με την αντίδραση της αμινομάδας ή της καρβοξυλομάδας του διπεπτιδίου, με την καρβοξυλομάδα ή την αμινομάδα,

αντίστοιχα, του ιδίου ή ενός άλλου αμινοξέος προς σχηματισμό **τριπεπτιδίου**, **τετραπεπτιδίου** και γενικότερα ενός **πολυπεπτιδίου**. Αν το προκύπτουν πολυμερές αποτελείται από 500 και πλέον αμινοξέα συνδεδεμένα με πεπτιδικό δεσμό, τότε χαρακτηρίζεται ως πολυπεπτίδιο και για περισσότερα αμινοξέα καλείται **πρωτεΐνη**. Ας σημειωθεί ότι οι αριθμοί 50 ή 500 δεν αποτελούν σήμερα απαραβίαστα, αλλά προσεγγιστικά όρια διάκρισης των **ολιγοπεπτιδίων (≤ 50)**, των **πολυπεπτιδίων (≤ 500)** και των **πρωτεϊνών (> 500)**. Συνηθίζουμε να λέμε ότι ένα πεπτίδιο αποτελείται από τόσα αμινοξέα. Κάτι τέτοιο δεν είναι απόλυτα ορθό, αφού κατά την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού ένα άτομο $-H$ και μία ομάδα $-OH$ απομακρύνονται υπό την μορφή ενός μορίου H_2O . Η ορθή έκφραση είναι ότι το πεπτίδιο αποτελείται από τόσα **αμινοξικά κατάλοιπα**, (amino acid residues) (Dowetal., 1996).

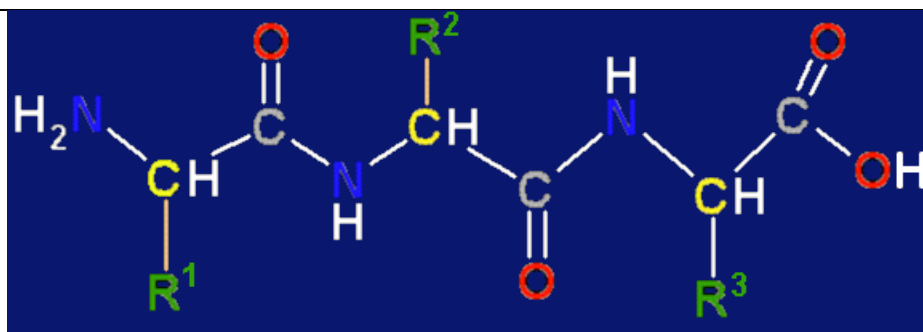
Την συγκεκριμένη συντακτική διάταξη-ακολουθία των αμινοξέων, ενός συγκεκριμένου πολυπεπτιδικού ικρίωματος, εκ του οποίου απαρτίζεται κάθε πρωτεΐνη, την εξασφαλίζει ένα γονίδιο, του γενετικού κώδικα DNA. Γενικά τα πεπτίδια είναι αζωτούχες οργανικές ενώσεις που αποτελούν πρόδρομο δομικό λίθο των πρωτεϊνών. Στα πεπτίδια ανήκουν και πολλές ορμόνες και αντιβιοτικά. Ο αριθμός των αμινοξέων σε ένα πεπτίδιο υποδηλώνεται με αριθμητικό πρόθεμα π.χ. διπεπτίδιο (2 αμινοξέα), οκταπεπτίδιο (με 8), ή ακόμα ολιγοπεπτίδιο, ή πολυπεπτίδιο (άνω των 50). Η διάκριση μεταξύ πολυπεπτιδίου και μιας πρωτεΐνης είναι μάλλον ασαφής, χωρίς ίσως καμία πρακτική σημασία.

Το πρώτο αμινοξύ στην αλληλουχία ενός πεπτιδίου (συνήθως αριστερά) έχει ελεύθερη την αμινομάδα ($-NH_2$), ενώ το τελευταίο προς τα δεξιά, κάθε φορά αμινοξύ έχει ελεύθερη την καρβοξυλομάδα ($-COOH$). Μερικοί ερευνητές έχουν υιοθετήσει ως ανώτατο όριο μοριακού βάρους ενός πολυπεπτιδίου το 10.000Da(Daltons), πράγμα που ανταποκρίνεται σε πεπτίδιο, αποτελούμενο περίπου από 1000 αμινοξέα, (Sammes, 1975) και (Rajappaetal., 1993). Τα πεπτίδια αποτελούνται από αμινοξέα, αλλά είναι μικρότερα από τις πρωτεΐνες. Μερικοί ερευνητές ταξινομούν και θέτουν ως σημείο αναφοράς, για τα μεν ολιγοπεπτίδια μέχρι και τα 50 αμινοξέα, για τα δε πολυπεπτίδια από 50 μέχρι και τα 100 αμινοξέα. Τα μεμονωμένα δομικά στοιχεία ενώνονται με σχετικά άκαμπτους πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας μια αλυσίδα αμινοξέων.

Πεπτίδια	Αριθμός αμινοξέων
Διπεπτίδια	2
Τριπεπτίδια	3
Τετραπεπτίδια	4
Πενταπεπτίδια	5
Ολιγοπεπτίδια	2 - 10
Πολυπεπτίδια	10 - 100
Μακροπεπτίδια	> 100
Πρωτεΐνες	> 50
Κυκλοπεπτίδια	≥2, χωρίς N τελικό και C τελικό

Αυτοί οι δεσμοί σχηματίζονται όταν η καρβοξυλομάδα (COO^-) ενός αμινοξέος αντιδρά με το αμινο (NH_3^+) ομάδα του άλλου, απελευθερώνοντας έτσι ένα μόριο νερού. Εκτός από τους πεπτιδικούς δεσμούς, εντός και μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να υπάρχουν **δισουλφιδικοί, λακτονικοί, θειο-αιθερικοί και θειο-εστερικοί δεσμοί**.

Συχνά οι χημικές ενώσεις των αμινοξέων υφίστανται αλλαγές κατά την μεταγραφική τροποποίηση, προτού η πρωτεΐνη να λειτουργήσει στο κύτταρο, ή στον μηχανισμό ελέγχου της διαίρεσης του κυττάρου. Αυτές οι αλλοιώσεις οφείλονται σε διαφορους παράγοντες, όπως οι ελεύθερες ρίζες, οι ιοί, βακτηριακές μολύνσεις, ακτινοβολίες και το οξειδωτικό στρες. Τα τριπεπτίδια είναι ενώσεις τριών αμινοξέων, που παρασκευάζονται στο εργαστήριο, δεδομένου ότι ο οργανισμός συνθέτει έως και διπεπτίδια, για την συμπλήρωση της μεγάλης πεπτιδικής αλυσίδας.



Σχήμα 2.1.3 Συντακτικός τύπος του τριπεπτιδίου **Lys-Ala-Ile**. Οι άλφα άνθρακες κάθε αμινοξέος (κίτρινοι) εναλλάσσονται με τους πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας την "ραχοκοκαλιά" του πολυπεπτιδίου. Η αλληλουχία καταγράφεται πάντοτε, ξεκινώντας από το πρώτο αμινοξύ αριστερά, του οποίου η αμινομάδα είναι ελεύθερη (Lys), με την ονομασία N-τερματικό αμινοξύ.

Η Tanja Weil από το Πανεπιστήμιο του Ulm αναφέρει ότι τα περισσότερα πεπτίδια είναι γραμμικές αλυσίδες αμινοξέων, αλλά ότι υπάρχουν επίσης κυκλικά και διακλαδισμένα πεπτίδια(Weiletal., 2011).

Τα πεπτίδια είναι αλυσίδες αμινοξέων, που είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών του δέρματος και απάντων σχεδόν των ιστών του σώματος. Όταν τα πεπτίδια σχηματίζουν μια μακρά αλυσίδα αμινοξέων, γίνονται πρωτεΐνες. Το πεπτίδιο είναι ένα άλλο όνομα για την πρωτεΐνη, αλλά συνήθως χρησιμοποιείται για βραχύτερες αλυσίδες αμινοξέων. Τα πεπτίδια αναγράφονται και ονομάζονται ως: Όταν είναι γνωστή η ταυτότητα των αμινοξέων, αλλά όχι η σειρά της αλληλουχίας τους, τότε αναφέρονται οι συντμήσεις των αμινοξέων παρεμβάλλοντας μεταξύ τους ένα κόμμα, όπως το παρακάτω επταπεπτίδιο: **[Gly, His, Cys, Val, Ser, Ala, Glu]**. Εάν είναι γνωστή και η αλληλουχία των αμινοξέων, τότε μεταξύ των συντμήσεων των αμινοξέων παρεμβάλλονται παύλες. Για παράδειγμα, εάν το προηγούμενο πεταπεπτίδιο αναφερθεί ως: **[Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys]**σημαίνει ότι:

α)- η βαλίνη είναι το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου. Δηλαδή έχει ελεύθερη την αμινομάδα του και η καρβοξυλομάδα του είναι συνδεδεμένη (με πεπτιδικο-αμιδικό δεσμό) με την αμινομάδα του δεύτερου αμινοξέος που είναι η αλανίνη. **β)-** Τα υπόλοιπα αμινοξέα αναφέρονται με τη σειρά που υπάρχουν στο πεπτίδιο. Για

παράδειγμα, η γλυκίνη είναι το 4ο στη σειρά αμινοξύ, άρα η αμινομάδα της έχει πεπτιδικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα της ιστιδίνης (3ο αμινοξύ), η δε καρβοξυλομάδα της έχει δεσμό με την αμινομάδα της σερίνης (5ο αμινοξύ).

γ)- Το τελευταίο στη σειρά αμινοξύ, δηλαδή η κυστεΐνη είναι το C-τελικό αμινοξύ, δηλαδή έχει συνδεδεμένη με πεπτιδικό δεσμό μόνο την αμινομάδα της, ενώ η καρβοξυλομάδα της είναι ελεύθερη.

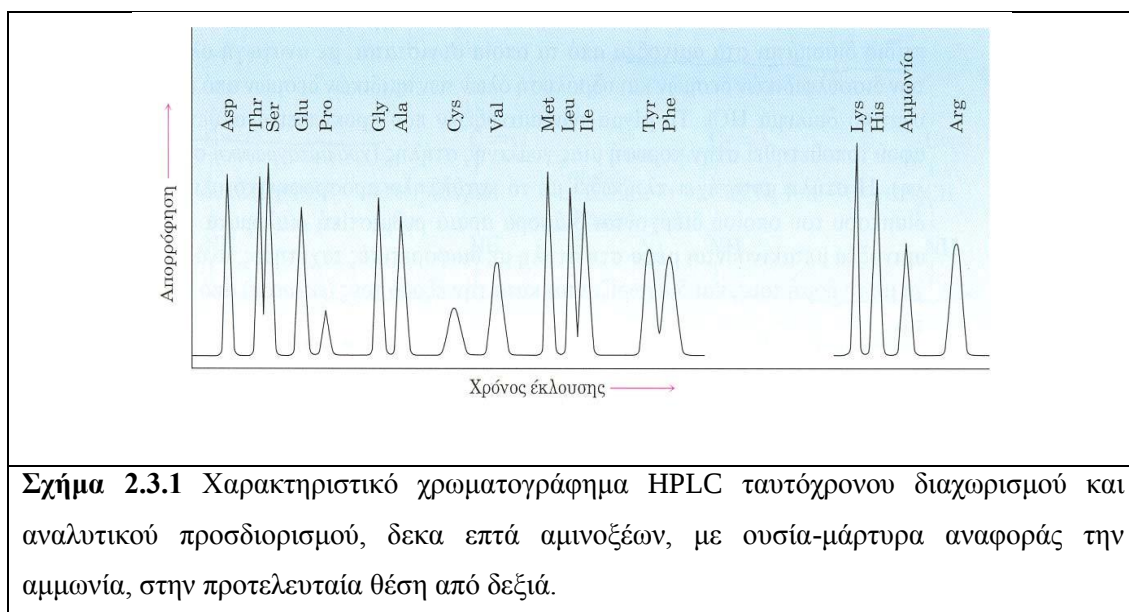
Ένας εναλλακτικός τρόπος αναγραφής του ιδίου επταπεπτιδίου είναι ο ακόλουθος: **[H-Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys-OH]**. Τέλος, όσον αφορά την ονομασία των πεπτιδίων, αυτή περιλαμβάνει την αναφορά των αμινοξέων με την αλληλουχία που υπάρχουν στο μόριο του πεπτιδίου χρησιμοποιώντας την κατάληξη "-υλιο", εκτός από το C-τελικό αμινοξύ που αναφέρεται απλώς με το όνομά του. Για παράδειγμα, το επταπεπτίδιο **[Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys]** θα πρέπει να ονομαστεί ως: **[Βαλινυλο-αλανυλο-ιστιδινυλο-γυκινυλο- σερινυλο-γλουταμινυλο-κυστεΐνη]**. Τα πεπτίδια γράφονται πάντα με το N-τελικό αμινοξύ της ελεύθερης αμινομάδας, στα αριστερά και το C-τελικό αμινοξύ της ελεύθερης καρβοξυλομάδας, στα δεξιά.

Η σταθεροποίηση συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού τον καθιστά σχετικά μη-δραστικό υπό φυσιολογικές συνθήκες, ακόμη λιγότερο δραστικό από παρόμοιες ενώσεις, όπως οι εστέρες. Παρ' όλα αυτά οι πεπτιδικοί δεσμοί συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις, συνήθως μέσω μιας προσβολής πάνω του άνθρακα του καρβονυλίου, από ένα ηλεκτροαρνητικό άτομο, σπάζοντας τον καρβονυλικό διπλό δεσμό και σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Αυτή είναι η οδός που ακολουθείται κατά την πρωτεόλυση και γενικότερα, κατά τις αντιδράσεις ανταλλαγής [N-O ακυλο-], όπως αυτές των **ιντεϊνών** (inteins). Όταν η λειτουργική ομάδα, που προσβάλλει τον πεπτιδικό δεσμό είναιθειόλη, υδροξύλιο ή αμίνη, τότε το προκύπτον μόριο μπορεί είναι μία **κυκλόλη** (cyclol), ή πιο συγκεκριμένα, μία **θεια-κυκλόλη** (thiacyclol), μία **οξα-κυκλόλη** (oxacyclol), ή μία **αζα-κυκλόλη** (azacyclol), αντίστοιχα.

Πολυετείς ερευνητικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι εκεί που συντελείται η αρχή της βλάβης πεπτιδίων, πρωτεϊνών, κυττάρων, ιστών και σωματικών οργάνων, τα τριπεπτίδια έρχονται να την αποκαταστήσουν.

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Κατ' αρχήν επιχειρείται η μέτρηση και εξακρίβωση των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων αυτού του ιδίου του πεπτιδίου, ως έχει στην αυτούσια μορφή του. Μετά την υδρολυτική διάσπαση των πεπτιδίων προς τους δομικούς λίθους- αμινοξέα ακολουθεί η ποιοτική, η ποσοτική και η δομική ανάλυση των αμινοξέων, που συνιστούν το πολυπεπτίδιο. Η ανάλυση των αμινοξέων που ακολουθεί έχει σκοπό να οδηγήσει στην διαπίστωση:



- α)-** Ποιά είναι η ταυτότητα των αμινοξέων που συνιστούν το πεπτίδιο (Ποιοτική),
- β)-** Σε ποιά ποσότητα υπάρχει το κάθε ένα αμινοξύ (Ποσοτική) και
- γ)-** Με ποιά σειρά εμφανίζονται τα αμινοξέα στην πεπτιδική αλυσίδα, δηλαδή η αλληλουχία αμινοξέων (Δομική).

2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.

Τα πειραματικά δεδομένα των εργαστηριακών αναλύσεων των διαφόρων δειγμάτων, που εμπεριέχουν μίγματα αμινοξέων συστηματοποιούνται και αξιοποιούνται ως εξής:

- 1)- Ο χρόνος έκλυσης του κάθε αμινοξέος καταγράφεται σχολαστικά, μέχρις ότου να επιτευχθούν επαναλήψιμες τιμές του.
- 2)- Ο προσδιορισμός των αμινοξέων επιχειρείται σε πεπτίδιο άγνωστης σύστασης, με βάση τον χρόνο έκλυσης αυτών.
- 3)- Ο προσδιορισμός της ποσότητας του κάθε αμινοξέος, γίνεται με βάση την ένταση του ιώδους χρώματος, δηλαδή την απορρόφηση στο υπεριώδες (Schwarzetal., 2005).

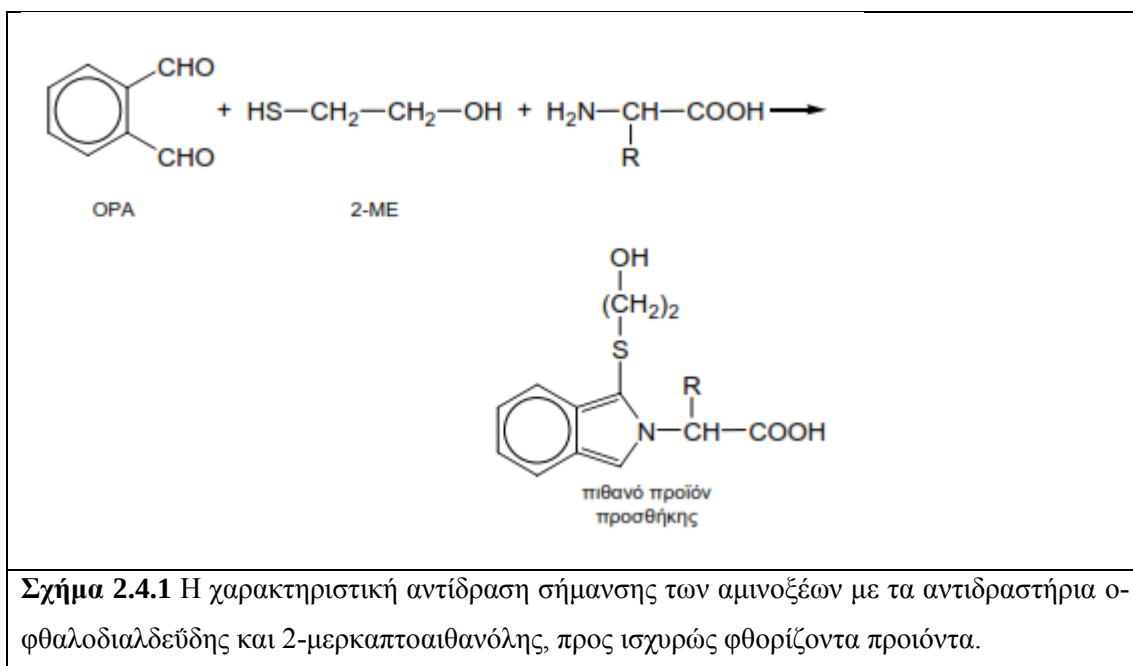
Αναλυτής Αμινοξέων. Με την χρήση ενός τέτοιου σύγχρονου και αυτοματοποιημένου οργάνου επιτυγχάνονται συγκεντρωτικά οι παρακάτω απολαβές:

- 1)- Αρχικά επιτελείται η διάσπαση του πεπτιδίου στα συστατικά αμινοξέα του, με αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και υδρόλυση των αμιδικών δεσμών.
- 2)- Επιτυγχάνεται η ανάλυση του μίγματος, μέσω κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης, αφού διέλθουν διάφορα υγρά και αραιά ρυθμιστικά διαλύματα.
- 3)- Ακολουθεί το στάδιο της έκλυσης, δηλαδή της μετακίνησης και του διαχωρισμού των αμινοξέων, με βάση την δομή τους και με την χρήση διαφόρων εκλυστικών υγρών.
- 4)- Στη συνέχεια γίνεται ανάμιξη των εκλούμενων αμινοξέων, με το αντιδραστήριο νινυδρίνη, προς σχηματισμό σύνθετων ενώσεων με ιώδεις χρωματισμούς.
- 5)- Τελικά πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης, με την χρήση φασματοφωτομέτρου υπεριώδους (UV), ή ορατού (Vis), ή υπερύθρου (IR), για την καταγραφή του διαγράμματος απορρόφησης, συναρτήσει του χρόνου έκλυσης (Daviesetal., 1992 ; Csapoetal., 2008).

Διαχωρισμός και Ανάλυση Αμινοξέων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων σε υδρολύματα πρωτεϊνών ή πεπτιδίων είναι μία από τις βασικότερες διαδικασίες της πρωτεϊνικής χημείας. Για να γίνει ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων σε ένα υδρόλυμα πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο διαχωρισμός των διαφόρων αμινοξέων, πράγμα που επιτυγχάνεται με χρωματογραφικές μεθόδους.

Είναι προφανές λοιπόν ότι μία ανάλυση αμινοξέων περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: τον **διαχωρισμό** και την **ανίχνευση**. Η κλασική μέθοδος διαχωρισμού αμινοξέων είναι αυτή που χρησιμοποιεί χρωματογραφία στήλης με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (ion exchange chromatography). Η όλη διαδικασία διαχωρισμού και ταυτοποίησης γίνεται με αυτόματα συστήματα, τους γνωστούς αναλυτές αμινοξέων (amino acid analyzers). Το υδρόλυμα - μίγμα των αμινοξέων τοποθετείται στην κατάλληλη κατιοντική ρητίνη του αναλυτή και η έκλυση των αμινοξέων προγραμματίζεται με κατάλληλα βήματα, μεταβολής της ιοντικής ισχύος και του pH της κινητής φάσεως (mobile phase). Τα εκλούόμενα αμινοξέα για να ανιχνευτούν πρέπει πρώτα να επισημανθούν, με μία από της γνωστές μεθόδους σήμανσης της αμινομάδος (Iwasakietal., 2012).

Η κλασική μέθοδος επισημάνσης στους αυτόματους αναλυτές είναι η αντίδραση με την νινυδρίνη. Στη συνέχεια, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός των αμινοξέων στα 570nm και 440nm και η καταγραφή του χρωματογραφήματος με καταγραφέα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η ποιοτική ανάλυση του δείγματος. Ο ποσοτικός τώρα προσδιορισμός των αμινοξέων γίνεται συγκριτικά, προς ένα μίγμα αμινοξέων γνωστής περιεκτικότητας και συγκέντρωσης, που έχει περάσει προηγουμένως από την ίδια διαδικασία. Οι αυξανόμενες απαιτήσεις για μεγαλύτερη ευαισθησία και ταχύτητα στην ανάλυση των αμινοξέων έκαναν αναγκαία την εξεύρεση νέων μεθόδων ανάλυσης. Νεότερα συστήματα αυτόματης ανάλυσης αμινοξέων χρησιμοποιούν όργανα υγράς χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με φθορισμομετρικούς ανιχνευτές. Μία τέτοια μέθοδος χρησιμοποιεί την αντίδραση της **ο-φθαλοδιαλδεΰδης** (OPA), σε συνδυασμό με την **2-μερκαπτοαιθανόλη** (2-ME), για τη σήμανση των αμινοξέων(Qiaoetal., 2009) (Σχήμα 2.4.1):



Η μέθοδος αυτή παράγει φθορίζοντα προϊόντα προσθήκης με τις πρωτοταγείς αμίνες, εξαιρουμένης της προλίνης, η οποία δεν αντιδρά. Είναι μέχρι 100 φορές πιο ευαίσθητη από την αντίδραση της νινυδρίνης. Επίσης σε εφαρμογή είναι σήμερα και μία νέα μέθοδος ανάλυσης αμινοξέων, που βασίζεται στη γνωστή αντίδραση Edman. Τα φαινυλθειοκαρβαμύλο-αμινοξέα (PTC-αμινοξέα), που προέρχονται από την αντίδραση αυτή, μετά τον διαχωρισμό τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανιχνεύονται φασματοσκοπικά στα 254nm του UV φάσματος.

2.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Με τους τρόπους που αναφέραμε στις προηγούμενες παραγράφους είναι δυνατή η ανίχνευση της πρωτοταγούς δομής των πεπτιδίων. Οι αλληλουχίες των μικρότερων πεπτιδίων που διασπάστηκαν με ειδική πρωτεόλυση συνδυάζονται κατάλληλα, για να δώσουν την ολική αλληλουχία του πολυπεπτιδίου. Ωστόσο στην πράξη οι τεχνικές αυτές, αν και σε μεγάλο βαθμό αυτοματοποιημένες, δεν είναι και τόσο απλές. Σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις, αλλά και όταν ακόμη η διαθέσιμη για ανάλυση ποσότητα του πεπτιδίου είναι πολύ μικρή, μπορούν να προκύψουν αβεβαιότητες, ως προς ορισμένες αλληλουχίες αμινοξέων. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να βρει μία ικανοποιητική λύση πολλές φορές με την χημική σύνθεση του πεπτιδίου και στη

συνέχεια τη σύγκριση των χημικών αλλά κυρίως των βιολογικών ιδιοτήτων του συνθετικού, έναντι του φυσικού πεπτιδίου.

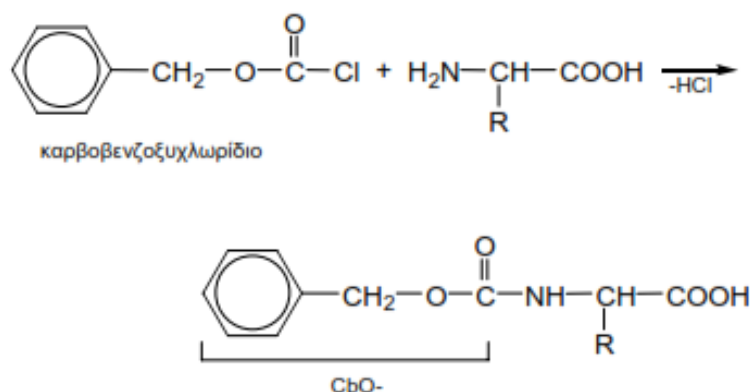
Εκτός όμως από την περίπτωση αυτή της επιβεβαίωσης της πρωτοταγούς δομής, η εργαστηριακή σύνθεση μπορεί να μας προσφέρει ένα πεπτίδιο σε ποσότητες, που δεν είναι δυνατόν να καλυφθούν με την απομόνωσή του από βιολογικές πρώτες ύλες. Η σύνθεση πολυπεπτιδίων αποτελεί ένα ειδικό κλάδο της συνθετικής χημείας. Λεπτομερής ανάλυση των εργαστηριακών τεχνικών στον τομέα αυτό δεν είναι αντικείμενο της διατριβής αυτής. Μπορούμε όμως να περιγράψουμε σε γενικές γραμμές την διαδικασία σύνθεσης ενός πεπτιδίου. Τα βασικά προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπισθούν σε μία τέτοια περίπτωση είναι δύο: **1)-** η σύζευξη των αμινοξέων σε μια προκαθορισμένη αλληλουχία και **2)-** η υψηλή απόδοση των χημικών αντιδράσεων που απαιτούνται. Για παράδειγμα, για να σχηματισθεί το διπεπτίδιο H-Ala-Glu-OH με τη συγκεκριμένη αυτή αλληλουχία πρέπει να αντιδράσει η καρβοξυλομάδα της αλανίνης, με την α-αμινομάδα του γλουταμικού. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όμως οι άλλες δραστικές ομάδες να αποκλεισθούν από την αντίδραση.

Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια καταλλήλων προστατευτικών ομάδων (στην α-αμινομάδα της αλανίνης και στην γ-καρβοξυλομάδα του γλουταμικού). Οι προστατευτικές αυτές ομάδες πρέπει να αντιδράσουν εύκολα και ποσοτικά (απόδοση 100%), κάτω από ήπιες συνθήκες, που δεν προκαλούν χημικές ή στερεοχημικές μεταβολές στα αμινοξέα και επιπλέον να μπορούν να αφαιρεθούν εκλεκτικά, μετά τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Βλέπουμε λοιπόν ότι ένα από τα βασικά προβλήματα στην εργαστηριακή σύνθεση των πεπτιδίων είναι η κατάλληλη επιλογή των προστατευτικών ομάδων.

2.5.1 Μέθοδος καρβοβενζοξυ-ομάδας [Cbo-].

Το 1932 προτάθηκε στην βιβλιογραφία από τους Max Bergmann και Λεωνίδα Ζέρβα, η μέθοδος της καρβοβενζοξυ- ομάδας[Cbo-]. Η προστασία της αμινομάδος των αμινοξέων με το αντιδραστήριο- προστατευτική ομάδα **καρβοξυβενζοξυλωρίδιο**

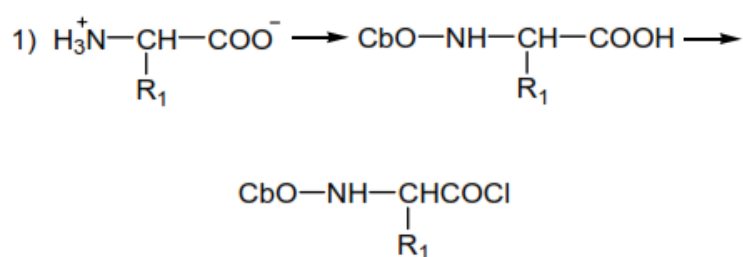
είναι η σημαντικότερη και πλέον εύχρηστη εργαστηριακή μέχρι σήμερα μέθοδος. Η αντίδραση προστασίας της αμινομάδος πραγματοποιείται ως εξής:



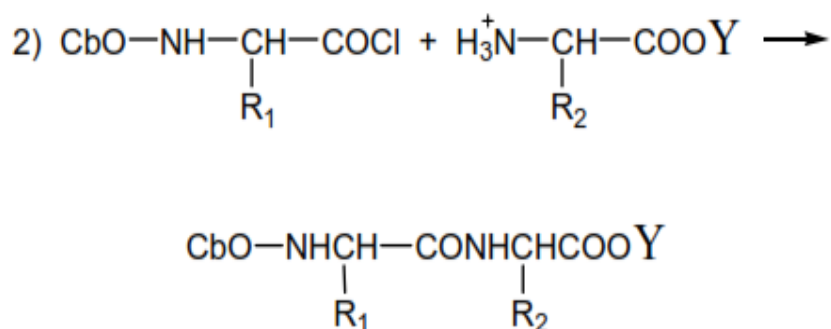
Σχήμα 2.5.1.1 Η δράση του αντιδραστηρίου καρβοξυβενζοξυχλωρίδιο, στην πορεία προστασίας της ελεύθερης αμινομάδας των αμινοξέων, ενός πολυπεπτιδίου.

Ακολουθεί η πρόταση του γενικού μηχανισμού των διαφόρων σταδίων της σύνθεσης ενός διπεπτιδίου.

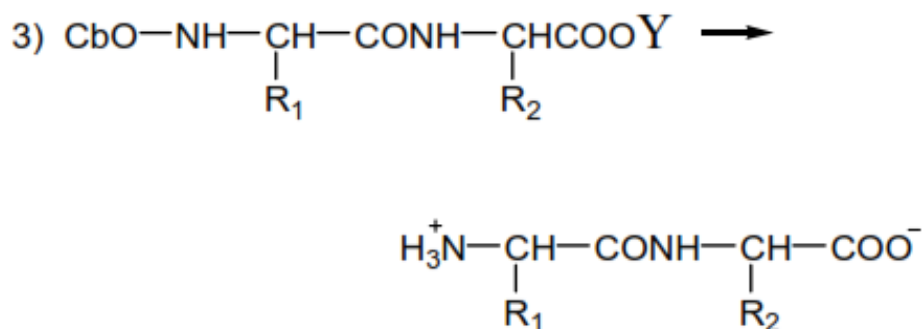
1)- Στο πρώτο στάδιο επιχειρείται τόσο η προστασία της α-αμινομάδος του ενός αμινοξέος, με την καρβομεθοξυ-ομάδα **[CbO-]**, όσο και η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδος, του δευτέρου αμινοξέος, με την προστατευτική **[Y]** ομάδα:



2)- Στο δεύτερο στάδιο αποκαθίσταται ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού, μεταξύ των δύο προστατευμένων αμινοξέων. Με **[Y]** δηλώνεται η προστατευτική ομάδα του καρβοξυλίου.



3)- Στο τρίτο στάδιο της βιοχημικής σύνθεσης αφαιρούνται κατάλληλα οι δύο προστατευτικές ομάδες **[Cbo-]** και **[Y]**, οπότε παραλαμβάνεται το ζητούμενο διπεπτίδιο.

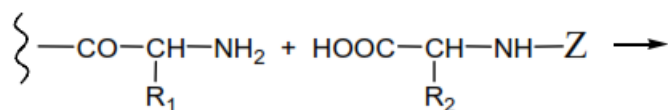


Η σχολαστική και σχετικώς επίπονη συνθετική διαδικασία που προαναφέρθηκε, για την περίπτωση ενός απλού διπεπτιδίου, καθίσταται σημαντικώς πιο περίπλοκη, κοπιώδης και ίσως προβληματική, στην περίπτωση συνθέσεως πολυπεπτιδίων. Στις περιπτώσεις αυτές επιχειρείται κατά πρώτον η παρασκευή μικρότερων πεπτιδίων και στη συνέχεια η συνθετική συνένωση αυτών, προς το τελικό ζητούμενο προϊόν. Η απόδοση των ενδιάμεσων αντιδράσεων σχηματισμού των πεπτιδικών δεσμών, είναι παράμετρος πολύ μεγάλης σημασίας στην βιοχημική παρασκευή των πολυπεπτιδίων. Έχει διαπιστωθεί ότι αν πρόκειται να συνθέσουμε ένα πεπτίδιο από 100 αμινοξέα, η κάθε μία από τις 100 διαφορετικές αντιδράσεις πρέπει να προχωρήσει με απόδοση τουλάχιστον 98-99%. Εάν το κάθε ενδιάμεσο συνθετικό στάδιο είχε απόδοση μόνον 90%, τότε η συνολική απόδοση παραλαβής του εκατονταπεπτιδίου θα ήταν μόνον 0,003%. Το πρόβλημα αυτό έχει αντιμετωπισθεί με την τεχνική συμπυκνώσεως τμημάτων (fragment condensation). Τα μικρότερα πεπτίδια με 10-15 αμινοξέα

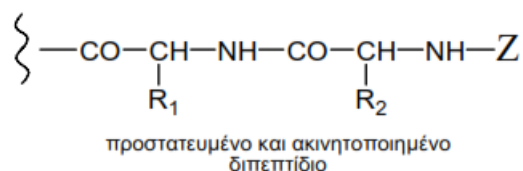
συμπυκνώνονται με λίγα σχετικά συνθετικά βήματα, γιά να παραληφθεί το τελικό πεπτίδιο.

2.5.2 Τεχνική Στερεάς Φάσεως

Ο **R.B. Merrifield** εισήγαγε μία νεότερη τεχνική για την σύνθεση πολυπεπτιδίων, γνωστή και ως τεχνική της στερεάς φάσεως, η οποία επιτρέπει σχεδόν πλήρη αυτοματισμό των διαφόρων συνθετικών σταδίων. Στην μέθοδο αυτή αρχίζουμε από το καρβοξυτελικό άκρο, δηλαδή την καρβοξυλομάδα του τελευταίου αμινοξέος, που επιθυμούμε να έχει το νέο πεπτίδιο, της οποίας αποκαθιστούμε χημική σύνδεση, με μία **ρητίνη πολυστυρενίου**, επάνω στην οποία συνδέεται χημικά.



(Z = προστατευτική ομάδα)



Σχήμα 2.5.2.1 Η αντίδραση ακινητοποίησης ενός αμινοξέος, με το καρβοξυλικό τερματικό του, πάνω σε ρητίνη πολυστυρενίου και συμπύκνωσή του με έτερο προστατευμένο αμινοξύ.

Η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση, από σφαιρίδια πολυμερούς πολυστυρενίου, που διαθέτει χλωρο- μεθυλο- ομάδες. Αναλυτικά τα επί μέρους στάδια της μεθόδου είναι:

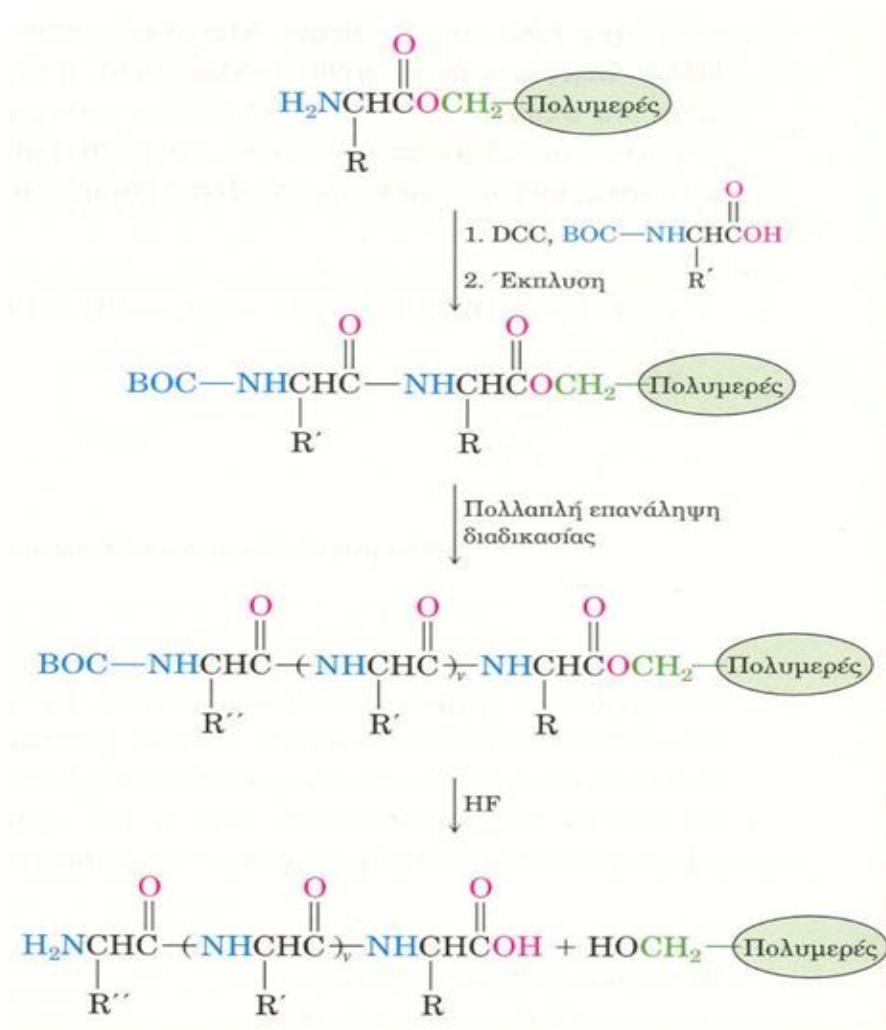
1. Ένωση BOC προστατευμένου αμινοξέος με πολυμερές, μέσω του εστερικού δεσμού.
2. Έκπλυση, κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ, για την απομάκρυνση του BOC.

3. Δεύτερο BOC προστατευμένο αμινοξύ ενώνεται με το πρώτο, παρουσία DCC.
4. Έκπλυση, κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ για απομάκρυνση BOC.
5. Επανάληψη των παραπάνω κύκλων.
6. Απομάκρυνση τελευταίας ομάδας BOC με HF, αποχωρισμός του ελεύθερου πεπτιδίου και απομόνωση.

Τα υπόλοιπα στάδια της σύνθεσης γίνονται όλα επάνω σ' αυτό το "ακίνητοποιημένο" αμινοξύ, το οποίο λόγω της συνδέσεώς του με τη στερεά ρητίνη βρίσκεται σε "στερεά" φάση και παραμένει σταθερό και αδιάλυτο. Στο τέλος της όλης διαδικασίας, το τελικό πεπτίδιο που σχηματίστηκε απελευθερώνεται από την ρητίνη. Η μέθοδος στερεάς φάσεως είναι φανερό ότι έχει διευκολύνει κατά πολύ την εργαστηριακή σύνθεση των πεπτιδίων, διότι μας προσφέρει τη δυνατότητα, με σχετικά απλές διαδικασίες όπως η διήθηση, να αφαιρέσουμε από το μίγμα αντίδρασης όλα τα διαλυτά συστατικά, ενώ το σχηματιζόμενο πεπτίδιο παραμένει ακίνητοποιημένο στην ρητίνη.

- Η εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται μέσω προστασίας όλων των ομάδων, πλην αυτών που θα αντιδράσουν.
- Οι καρβοξυλομάδες προστατεύονται, με μετατροπή τους σε μεθυλο ή βενζυλο εστέρες.
- Οι αμινομάδες προστατεύονται με τη μορφή των tert-βουτοξυκαρβονυλο αμιδικών παραγώγων (BOC).
- Ο αμιδικός δεσμός σχηματίζεται συνήθως, με την επίδραση δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC), σε μείγμα προστατευμένης αμίνης.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου Merrifield (πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης) είναι ότι η ρητίνη δεν δεσμεύει τα διάφορα παραπροϊόντα. Έτσι, αυτά απομακρύνονται με την έκπλυση της στήλης και λαμβάνεται μόνο το καθαρό προϊόν της αντίδρασης.



Σχήμα 2.5.2.2 Συγκεντρωτική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων της Μεθόδου Merrifield.

Πρακτικά, η αυτοματοποιημένη αυτή μέθοδος έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων που περιέχουν έως και 50 αμινοξέα. Τα μεγαλύτερα πολυπεπτίδια συντίθενται με αντίδραση επιμέρους μικρότερων πεπτιδίων. Για παράδειγμα, ένα πολυπεπτίδιο με 120 αμινοξέα είναι δυνατόν να συντεθεί από τον συνδυασμό τριών επιμέρους μικρότερων πεπτιδίων (πχ που περιέχουν 45, 40 και 35 αμινοξέα αντιστοίχως). Η τεχνητή αυτή μέθοδος δεν είναι δυνατόν να συγκριθεί με αυτήν της φύσης, η οποία έχει τη δυνατότητα να συνθέτει με ευκολία ιδιαίτερα πολύπλοκες πρωτεΐνες και πεπτίδια (Konigshoffetal., 2012). Με στόχο τη διαλεύκανση και χρησιμοποίηση του μηχανισμού αυτού ερευνητικές προσπάθειες

(γενετική μηχανική) έχουν καταφέρει να απομονώσουν ή παράγουν βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολλά χρήσιμα πεπτίδια και πρωτεΐνες, όπως π.χ. η ανθρώπινη ινσουλίνη.

2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.

Τα πεπτίδια παράγονται με την χρήση διαφόρων οδών. Τα φυσικά πεπτίδια μπορεί να αποτελούνται από πρωτεϊνογόνα και μη πρωτεϊνογόνα αμινοξέα. Για τον έλεγχο και την καταγραφή της τεράστιας ποικιλίας και διακύμανσής των πεπτιδίων, γίνεται μία πρώτη ομαδοποίηση αυτών, ανάλογα με το αν παράγονται από τον ριβοσωμικό μηχανισμό ή όχι. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν ριβοσώματα για τη σύνθεση πεπτιδίων. Οι μηχανισμοί σύνθεσης πρωτεϊνών μεταφράζουν το mRNA σε πρωτεΐνες, με πολυμερισμό συμπυκνώσεως των 20 πρωτεϊνογενετικών αμινοξέων και με βάση την αλληλουχία του mRNA. Οι προκύπτουσες πρωτεΐνες στη συνέχεια διασπώνται σε μικρότερα πεπτίδια, μέσω των πρωτεολυτικών ενζύμων. Όπως οι πρωτεΐνες, έτσι και τα ριβοσωμικά πεπτίδια υποβάλλονται επίσης, σε υστερομεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational modifications), όπως η φωσφορυλίωση, η γλυκοζυλίωση, η θείωση, η υδροξυλίωση και ο σχηματισμός δισουλφιδικών γεφυρών (Lietal., 1991).

Τα βακτήρια και οι μύκητες (Bacteria and fungi) είναι σε θέση να παράγουν βραχεία πεπτίδια σε διαφορετικά στάδια, που περιλαμβάνουν διαφορετικά ένζυμα. Εκτός από τα πρωτεϊνογενετικά αμινοξέα, τα βακτηριδιακά και τα μυκητιακά πεπτίδια μπορούν επίσης να αποτελούνται από μη-πρωτεϊνογόνα L- και D-τύπου αμινοξέα. Έχει αποδειχθεί ότι η σταθερότητα των πεπτιδίων αυξάνεται με τον αριθμό των εντεταγμένων D-αμινοξέων. Αυτό τα καθιστά ιδιαίτερος σπουδαία και ενδιαφέροντα, για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Πολλές πρωτοποριακές δομές προέρχονται από τέτοια βακτηριδιακά πεπτίδια. Τα βακτηριδιακά και μυκητιακά πεπτίδια, που συντίθενται από μια σπονδυλωτή πολυ-ενζυμική και μη-ριβοσωμική πεπτιδιο-συνθετάση (nonribosomal peptidesynthetase, NRPS). Κάθε τέτοια NRPS μπορεί να

συνθέσει μόνο ένα συγκεκριμένο είδος πεπτιδίου. Περίπου 1.200 μη-ριβωσωμικά πεπτίδια έχουν ανακαλυφθεί, σε 247 διαφορετικούς οργανισμούς.

► **Τεράστια εμπόδια: η εκχύλιση και η απομόνωση (extraction and isolation).**

Προτού τα πεπτίδια συντεθούν με τη χρήση χημικών ή και ανασυνδυασμένων εργαλείων, χρειάζεται να εξαχθούν και να απομονωθούν, μια διαδικασία που συχνά αποτυγχάνει, διότι τα μίγματα πεπτιδίων όταν απομακρύνονται από το βιολογικό τους περιβάλλον, εύκολα εκφυλίζονται και αποικοδομούνται.

Οι ερευνητές που θέλουν να αντιγράψουν τα φυσικά πεπτίδια χρειάζονται εξαιρετικές αναλυτικές δυνατότητες, καθώς και την πρόσβαση σε εξελιγμένες τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζας, η υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η παράλληλη φασματοσκοπία- μαγνητικός συντονισμός, προκειμένου να συγκεντρώσουν πληροφορίες, σχετικά με τις φυσικο-χημικές παραμέτρους ενός πεπτιδίου, όπως η μοριακή σύσταση και η μάζα του. Πολλές αναλυτικές τεχνικές απαιτούνται για να επιτευχθεί μια πλήρης εικόνα, της δομής και της βιολογικής δραστηριότητας, ενός φυσικού ή συνθετικού πεπτιδίου (Goodman and Stenden., 1962).

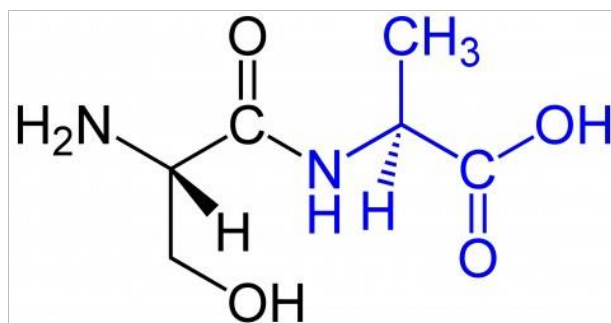
► **Η έρευνα εστιάζεται σήμερα σε μακρύτερα πεπτίδια (longer peptides).** Ο όρος πεπτίδιο ανάγεται στο 1902, όταν ο Γερμανός χημικός και κάτοχος του βραβείου Νόμπελ Emil Fischer πέτυχε τη σύνθεση του πρώτου διπεπτιδίου. Με την ανάπτυξη της μεθόδου της σύνθεσης στερεάς φάσης από τον RM Merrifield, (βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1984) η έρευνα των πεπτιδίων έλαβε ώθηση, καθώς τότε έγινε δυνατή η χημική σύνθεση πεπτιδίων, πάνω σε έναν αδρανή στερεό φορέα (solid matrix). Η ανακάλυψη αυτή διηύρηνε τις δυνατότητες παραγωγής και απομόνωσης μεγαλύτερων ποσοτήτων και καθαρότερων πεπτιδικών ουσιών. Η διαδικασία σύνθεσης πεπτιδίων στερεάς φάσης αργότερα αυτοματοποιήθηκε και τέτοιες συσκευές διατίθενται πλέον στην αγορά. Στην παραγωγή πεπτιδίων μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικές τεχνολογίες (Khavinson, 2002).

► **Η σύγχρονη χημεία πεπτιδίων** επικεντρώνεται σε τρόπους σύνθεσης ιδιαίτερα μακρών πεπτιδίων, οι οποίοι είναι τεχνικώς σε θέση να συνθέσουν πεπτίδια έως και

30 αμινοξέων. Για την κατασκευή μακρύτερων πεπτιδίων η TanjaWeil et al., περιλαμβάνουν την σύνδεση αρκετών μικρών πεπτιδίων, σε μακρύτερα πολυπεπίδια, (Weil et al., 2011). Τα πεπίδια ήταν πάντα ελκυστικά για τους βιοχημικούς, για το ρόλο τους ως πολυλειτουργικών δομικών στοιχείων. Οι βιοδραστικές ομάδες των πεπτιδίων, καρβοξυλο- ομάδες και αμινο- ομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για τη σύνδεση μονομερών αμινοξέων (πολυμερισμός). Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων -με την εξαίρεση της γλυκίνης, η οποία έχει μόνο έναν υποκαταστάτη υδρογόνου ως πλευρική αλυσίδα της- μπορούν να εξοπλιστούν με συμπληρωματικές λειτουργικές ομάδες, ενεργοποίησης και προστασίας. Η ικανότητα των αμινοξέων να προσδένουν προστατευτικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες επιτρέπει την παραγωγή μακρομορίων, καθορισμένου μήκους και αλληλουχίας, (Meier et al., 2014). Η εταιρεία PEPperPRINT της Χαϊδελβέργης χρησιμοποιεί ένα μοναδικό τρόπο, για την παραγωγή του πεπτιδικών μικροσυτοιχίων. Τα πεπίδια συντίθενται πάνω σε ολοκληρωμένα κυκλώματα (on-chip), χρησιμοποιώντας μικρο-σωματίδια αμινοξέων και εκτυπωτές λείζερ, προσαρμοσμένων χρωμάτων.

2.7 ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ

Η ένωση δύο αμινοξέων πραγματοποιείται με την αντίδραση συμπύκνωσης, μεταξύ της καρβοξυλομάδας του ενός και της αμινομάδας του επομένου. Συνέπεια αυτής της χημικής ένωσης είναι η δημιουργία διπεπτιδίου.



Σχήμα 2.7.1 Ο συντακτικός τύπος του διπεπτιδίου [Ser-Ala], που αποτελείται από την L-αμινοξύ σερίνη (στο τερματικό -N) και το L-αμινοξύ αλανίνη, φαίνεται στο μπλε, στον τερματικό -C.

Ένα διπεπτίδιο είναι μια πεπτιδική αλυσίδα που περιλαμβάνει δύο αμινοξέα. Πολυάριθμα διπεπτίδια ανευρίσκονται στη φύση, όπου εκτελούν μία ποικιλία λειτουργιών και μπορούν επίσης να συντεθούν στα βιοχημικά εργαστήρια. Τα διπεπτίδια έχουν μια σειρά από εμπορικές και βιομηχανικές χρήσεις, εκτός του ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιολογία πολλών εμβίων ειδών στη Γη. Τα διπεπτίδια παράγονται από τα πολυπεπτίδια, με τη δράση του ενζύμου υδρολάση της διπεπτιδύλ-πεπτιδάσης. Οι διαιτητικές πρωτεΐνες πέπτονται προς διπεπτίδια και αμινοξέα, και τα διπεπτίδια απορροφώνται πιο γρήγορα από ό,τι τα αμινοξέα, επειδή η πρόσληψη τους περιλαμβάνει ένα ξεχωριστό μηχανισμό. Τα διπεπτίδια ενεργοποιούν τα G-κύτταρα που βρίσκονται στο στομάχι, ώστε να πραγματοποιηθεί η έκκριση γαστρίνης. Η πεπτιδική σύνθεση αζλακτόνης κατά Bergmann είναι μία κλασική οργανική σύνθεση, για την παρασκευή διπεπτιδίων.

Πολλοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν πρωτεΐνες με τη βοήθεια των ενζύμων, τα οποία μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να σπάσουν τις πρωτεΐνες και τα πολυπεπτίδια σε υπομονάδες, οι οποίες μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία από τον οργανισμό. Κατά τη διάρκεια της πέψης, το πεπτικό σύστημα αρχίζει να κατακερματίζει τις διατροφικές πρωτεΐνες σε πολυπεπτίδια και αυτά μπορούν να θραύονται σε μικρότερες μονάδες, όπως τα διπεπτίδια. Αυτό γίνεται με την προσβολή του πεπτιδικού δεσμού, που συνδέει δύο διαδοχικά αμινοξέα. Μόλις κατατμηθούν, οι πεπτιδικές ή πρωτεϊνικές ουσίες μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό. Τουλάχιστον ένα διπεπτίδιο σηματοδοτεί στην πραγματικότητα τον οργανισμό, ώστε να παράγει ένζυμα, χρήσιμα στην πέψη.

Εάν το σώμα έχει ανάγκη για ένα συγκεκριμένο διπεπτίδιο, μπορεί να το απορροφήσει μέσω του εντερικού σωλήνα ή να το συνθέσει ανάλογα με το διπεπτίδιο. Η σύνθεση των πεπτιδίων απορροφά ενέργεια από το σώμα, ενώ η θραύση είναι πολύ πιο εύκολη. Πολυάριθμα διπεπτίδια μπορούν να βρεθούν στο σώμα. Ένα παράδειγμα είναι η κυτορφίνη (kyotorphin), που ανευρίσκεται στον εγκέφαλο, όπου δρα ως μέρος του συστήματος, που χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του πόνου. Άλλα διπεπτίδια συνεργούν στην μείωση της κόπωσης ή λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά. Ένα πασίγνωστο διπεπτίδιο με βιομηχανικές χρήσεις είναι η

ασπαρτάμη, μια τεχνητή γλυκαντική ουσία. Αναπτύχθηκε στη δεκαετία του 1970, θεωρήθηκε υπεύθυνη για ένα ευρύ φάσμα προβλημάτων υγείας. Πρόσθετες μελέτες εισηγούνται ή προτείνουν τη χρήσης ασπαρτάμης σε χαμηλά επίπεδα ως τεχνητού γλυκαντικού, δεν υπάρχει λόγος ανησυχίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους, μακρομόρια. Οι πρωτεΐνες είναι ουσίες με κυρίαρχη, πρωταρχική και καθοριστική αποστολή στο φαινόμενο της ζωής. Άλλωστε και η ονομασία τους, υποδηλώνει ότι είναι ουσίες βασικής και πρωταρχικής σημασίας για το φαινόμενο της ζωής. Αποτελούν απαραίτητο στοιχείο για κάθε ζωντανό οργανισμό. Οι πρωτεΐνες λέγονται και λευκώματα λόγω του λευκού χρώματος πολλών από αυτές. Ακόμη και σε ένα απλό κύτταρο βακτηρίου εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες, με την καθεμία εξ αυτών να έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν, είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου, είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων(Karlson, 1998 ; Bergetal., 2002).

Είναι μεγάλα και σύνθετα βιομόρια, αποτελούμενα από διάφορα α-L-αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους εν σειρά, σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Στα ειδικά αυτά πολυπεπτιδικά βιοπολυμερή, τα είκοσι βιογενικώς ενεργά αμινοξέα (κατ' άλλους είκοσι δύο, κατ' άλλους είκοσι τέσσερα), που αποτελούν σχεδόν αποκλειστικά τους βιολογικούς δομικούς λίθους ανοικοδόμησης όλων ανεξαιρέτως των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών, συνδέονται μεταξύ τους, με τον χαρακτηριστικό επίπεδο ομοιοπολικό πεπτιδικό δεσμό. Ο αμιδικός δεσμός που έχει τον χαρακτήρα διπλού δεσμού κατά περίπου 40% και χαρακτήρα απλού αμιδικού δεσμού κατά 60%, οδηγεί στον σχηματισμό μιας σταθερής γραμμικής αλυσίδας, που καλείται αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Τα δομικά στοιχεία- βιογενικά αμινοξέα- δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών εντάσσονται μέσα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, με μεταβαλλόμενη α)- ποσοτική αναλογία και β)- αλληλουχία- σειρά διαδοχής(KhanAcademy, 2017 ; PalmoreandMacDonald., 2000).

Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί τα 20 (κατ' άλλους 22 και κατ' άλλους 24) αμινοξέα, εκ των 170 περίπου υπαρχόντων στη φύση αμινοξέων.

Απαραίτητα (11): Ασπαραγίνη*, Βαλίνη, Θρεονίνη, Ισολευκίνη, Ιστιδίνη, Λευκίνη, Λυσίνη, Μεθειονίνη, Σεληνοκυστεΐνη**, Τρυπτοφάνη και Φαινυλαλανίνη.

Μη απαραίτητα (11): Αλανίνη, Αργινίνη*, Ασπαρτικό οξύ, Γλουταμικό οξύ, Γλουταμίνη*, Γλυκίνη*, Κυστεΐνη*, Προλίνη*, Πυρολυσίνη**, Σερίνη και Τυροσίνη*.

Εξ' αυτών τα (*) είναι τα απαραίτητα, μόνο σε ειδικές περιπτώσεις και τα (**) είναι στην πράξη αταξινομήτα και συμπληρώνουν τον κανόνα της είκοσι δυάδος.

Παρόλα αυτά εκείνα τα αμινοξέα που συνιστούν τις πρωτεΐνες συχνά υφίστανται χημικές μεταλλαγές, κατά την μετα-μεταγραφική τροποποίηση και προτού η πρωτεΐνη μπορέσει να λειτουργήσει, είτε στο κύτταρο, είτε στο τμήμα των μηχανισμών ελέγχου. Κατά συνθήκη ο αριθμός των αμινοξέων-δομικών λίθων στα μεγαλομόρια αυτά πρέπει να είναι >100, οπότε τα μοριακά τους βάρη κυμαίνονται από τις 10.000 περίπου, μέχρι και μερικά εκατομμύρια Daltons (Παπαδόπουλος και Σεφεριάδης., 1994) .

Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο και οι περισσότερες εξ αυτών και θείο. Πρόκειται για ενώσεις πολύπλοκης σύστασης, οι οποίες αποτελούνται κυρίως από C, H, O, N, S και σε μερικές περιπτώσεις και από P. Κάποιες από αυτές μπορεί να περιέχουν σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό και φώσφορο. Είναι χαρακτηριστικό ότι η μέση περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε N είναι 16% και ο λόγος [Άζωτο, N]/[Πρωτεΐνη, P]=6,25, γεγονός που επιτρέπει στις σχέσεις αυτές να χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, μέσω της περιεκτικότητάς τους σε N (WorldHealthOrganization, 2007).

Αυτά τα πολύπλοκα μακρομόρια, που αποτελούν το βασικό δομικό υλικό όλων ανεξαιρέτως των κυττάρων, σχεδόν πάντων των έμβιων όντων επί Γης διαθέτουν ταυτόχρονα και αποφασιστικό λειτουργικό ρόλο, τόσο στη δομή, όσο και στη βιολογική λειτουργία των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες είναι τα απαραίτητα συστατικά των ζώντων οργανισμών, κυρίως ως δομικά στοιχεία και ως ένζυμα, που υπεισέρχονται σχεδόν σε όλα τα φαινόμενα του μεταβολισμού. Τα φυτά είναι ικανά να συνθέτουν πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας τις ανόργανες ενώσεις του αζώτου (όπως αμμωνία, νιτρικά ή νιτρώδη άλατα), ορισμένα βακτήρια ακόμη και από το

ατμοσφαιρικό άζωτο, ενώ ο άνθρωπος και τα ανώτερα ζώα εξαρτώνται άμεσα ή έμμεσα από τις φυτικές πρωτεΐνες (Youngetal., 1994).

Ο άνθρωπος παραλαμβάνει τις απαραίτητες για τη διατροφή του ποσότητες πρωτεΐνων, από τα φυτικά και ζωικά τρόφιμα. Τα ζωικά τρόφιμα περιέχουν σημαντικά ποσά πρωτεΐνης, ενώ από τα φυτικά τρόφιμα ορισμένα παρουσιάζουν αξιόλογες ποσότητες πρωτεΐνης. Ενδεικτικά αναφέρονται για συνήθη τρόφιμα της διατροφής οι περιεκτικότητές τους σε πρωτεΐνες. Για: το κρέας 15-25%, το λεύκωμα αυγού: 12%, τον κρόκο αυγού: 16%, το ψωμί: 6-10%, το αλεύρι: 10-15%, το γάλα: 3-4%, τα λαχανικά και τις πατάτες: 1-4% (Hermann, 2007).

Περαιτέρω η βιολογική αξία μίας πρωτεΐνης ή ενός τροφίμου περιορίζεται από τα αμινοξέα εκείνα, τα οποία περιέχονται σε ποσότητες μικρότερες, από τα αντίστοιχα ελάχιστα απαιτούμενα όρια. Τα αμινοξέα αυτά ονομάζονται ελλείποντα ή περιοριστικά ουσιώδη αμινοξέα. Αξιολογώντας τις διάφορες πηγές τροφίμων από πρωτεϊνικής άποψης, προκύπτει ότι οι ζωικές πρωτεΐνες έχουν καλές αναλογίες απαραίτητων αμινοξέων και συνεπώς υψηλή βιολογική αξία. Από την άλλη πλευρά οι φυτικές πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιολογική αξία, λόγω ανεπάρκειας ουσιωδών απαραίτητων αμινοξέων, η βιολογική τους αξία όμως μπορεί να βελτιωθεί, με τον εμπλουτισμό τους με τα αντίστοιχα ελλείποντα αμινοξέα, μέσω συνδυασμού πρωτεϊνών ή τροφίμων (Murrayetal., 2006 ; Dowetal., 1996).

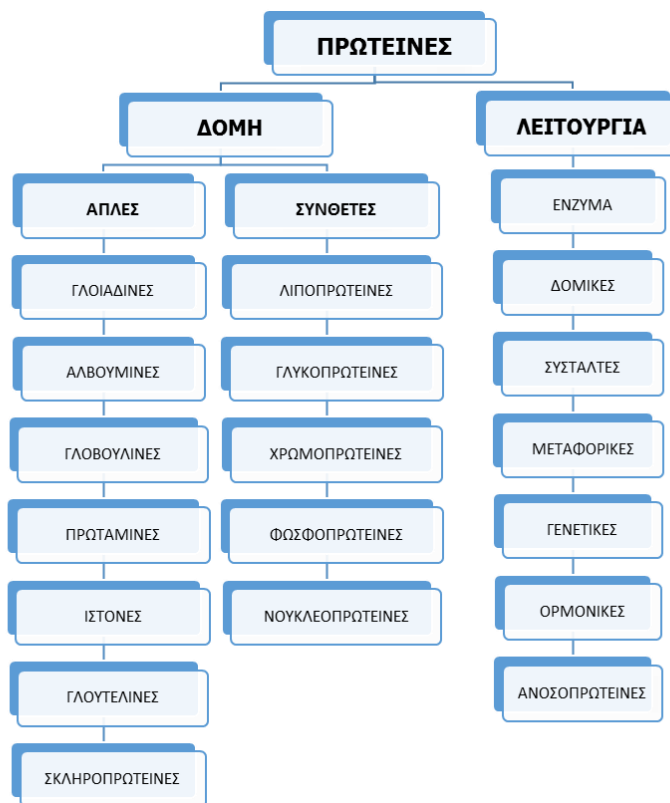
3.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ταξινόμηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με βάση διάφορα χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα όπως η διαλυτότητα, η μοριακή τους μάζα, το σχήμα και η βιολογική τους λειτουργία. Αρχικά είχαν ταξινομηθεί με βάση τη διαλυτότητά τους σε διάφορους διαλύτες, καθώς ήταν άγνωστος ο βιολογικός τους ρόλος. Οι πρωτεΐνες μπορεί να καταταγούν σε δύο θεμελιώδεις οικογένειες, με βάση την βιοχημική τους σύνθεση και την χημική δομή τους, διότι η προΐστορία τους αυτή θα καθορίσει και τα προϊόντα, που θα προκύψουν κατά την διαδικασία της υδρόλυσής των. Εάν τα

υδρολύματα αυτά περιέχουν αποκλειστικώς και μόνον τα βιογενικά αμινοξέα, τότε χαρακτηρίζονται ως:

1)-Ομοπρωτεΐνες ή Απλές Πρωτεΐνες. Στην ομάδα ανήκουν οι πρωταμίνες, οι ιστόνες, οι προλαμίνες, οι γλουτελίνες, οι αλβουμίνες, οι σφαιρίνες και οι σκληροπρωτεΐνες. Εάν περιέχουν και άλλες, μη πρωτεϊνικής φύσεως προσθετικές ομάδες, τότε χαρακτηρίζονται ως:

2) Ετεροπρωτεΐνες, ή Σύνθετες Πρωτεΐνες ή Πρωτεΐδια. Τα πρωτεΐδια είναι πρωτεΐνες που περιέχουν και μη πρωτεϊνικό τμήμα στο μορίό τους, το οποίο και αποδίδουν κατά την υδρόλυσή τους. Τα πρωτεΐδια, ανάλογα με τη φύση του μη πρωτεϊνικού των τμήματος, δηλαδή της πρόσθετης ομάδας που περιέχουν και με βάση γενικότερα κριτήρια κατατάσσονται στις εξής υποκατηγορίες: **α)** Μεταλλο-πρωτεΐνες (περιέχουν μεταλλικά στοιχεία, όπως η αλκοολική δεϋδρογενάση), **β)** Λιπο-πρωτεΐνες (περιέχουν λιποειδείς ενώσεις, όπως β-λιποπρωτεΐνη), **γ)** Νουκλεο-πρωτεΐνες (περιέχουν νουκλεϊνικά οξέα, όπως τα ριβοσώματα), **δ)** Γλυκο-πρωτεΐνες (περιέχουν υδατάνθρακες, όπως η γ-γλοβουλίνη), **ε)** Ένζυμα, **στ)** Χρωμο-πρωτεΐνες (όπως η βιλιπρωτεΐνη, η φυκοερυθρίνη, η φυκοκυανίνη, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή), **ζ)** Φωσφο-πρωτεΐνες (όπως οι καζεΐνες) και **η)** Αιμο-πρωτεΐνες (όπως η αιμογλοβίνη) (McClements, 2015 ; Leaderetal., 2008).



Σχήμα 3.2.1 Γενική δομική και μορφολογική ταξινόμηση των πρωτεϊνών.

Οι διάφορες πρωτεΐνες με κριτήρια την τρισδιάστατη δομή τους, τη συνθέσή τους, αλλά και την λειτουργία τους, μπορούν να χαρακτηριστούν και να καταταγούν στις παρακάτω υποκατηγορίες:

- 1) Με κριτήριο την μορφή τους σε: α) Ινώδεις Πρωτεΐνες και σε: β) Σφαιρικές Πρωτεΐνες, αναλόγως αν οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες τους οργανώνονται σε ευθεία γραμμή, ώστε να μοιάζουν με "ίνες" (κολλαγόνο, κερατίνη) ή αν αναδιπλώνονται κατά τέτοιον τρόπο, ώστε να διαμορφώνεται μια σφαιρική τρισδιάστατη δομή.
- 2) Με κριτήριο την λειτουργία τους οι πρωτεΐνες διακρίνονται: α) σε Δομικές Πρωτεΐνες (κερατίνη, ελαστίνη), που βρίσκονται στους ιστούς και στα όργανα και αποτελούν επίσης δομικά υλικά του κυττάρου, β) σε Λειτουργικές Πρωτεΐνες, όταν εμφανίζουν βιολογική δραστηριότητα και συμβάλλουν σε κάποιες ζωτικές βιοχημικές λειτουργίες (ένζυμα, ορμόνες, τοξίνες) και γ) σε Πρωτεΐνες Τροφίμων, οι οποίες δεν αποτελούν από μόνες τους μια κατηγορία, αλλά ανήκουν σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες. Αυτές είναι βρώσιμες διατροφικές πρωτεΐνες, που πέπτονται,

δεν είναι τοξικές και μπορεί να παραχθούν οικονομικά, για την ανθρώπινη κατανάλωση (Murzinetal., 1995).

3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Ο Σκελετός των Πρωτεϊνών. Ο σκελετός των πρωτεϊνικών αλυσίδων συνήθως αποτελείται μόνο από α-L- αμινοξέα, ενωμένα αναμεταξύ των, αποκλειστικά και μόνον με ομοιοπολικούς πεπτιδικούς δεσμούς. Ο χαρακτηριστικός πεπτιδικός δεσμός [-CO-NH-] σχηματίζεται από την συμπύκνωση της καρβοξυλομάδος του προηγούμενου αμινοξέος, με την αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος, ύστερα από την απομάκρυνση ενός μορίου ύδατος. Ολιγοπεπτίδια ονομάζονται εκείνα, που προέρχονται από την συμπύκνωση μέχρι 10 αμινοξέων, τα πολυπεπτίδια από 10 μέχρι 100 αμινοξέων, ενώ οι πρωτεΐνες αποτελούνται από τη συνένωση 100 και πλέον αμινοξέων. Ιδιαίτερο βιοχημικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ακροτελικά αμινοξέα, που παραμένουν στις άκρες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, δηλαδή το πρώτο αριστερά αμινοξύ, με την N- ακροτελεύτια ομάδα (αμινοτελική ομάδα) και το τελευταίο δεξιά αμινοξύ, με την C- ακροτελεύτια ομάδα (καρβοξυτελική ομάδα). Η ταυτότητα των ακροτελεύτιων αμινοξέων προσδιορίζεται με τη μέθοδο Sanger ή με την υδραζονόλυση αντίστοιχα (Grimaldo, 2016 ; Wilhelmetal., 1981).

Ο προσδιορισμός MB των πρωτεϊνών γίνεται με φυσικές μεθόδους, όπως η ωσμωτική πίεση, η υπερφυγοκέντρωση και οι ιοντοεναλλακτικές ρητίνες. Τα πρωτεϊνικά μεγαλομόρια αποτελούνται από εκατοντάδες αμινοξέα και η συχνότητα εμφάνισης καθενός αμινοξέος διαπιστώνεται με την ανάλυση των υδρολυμάτων των πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά η σειρά και ο τρόπος σύνδεσης των αμινοξέων μπορούν να γίνουν γνωστά μόνο με μελέτη της δομής των πρωτεϊνών. Η δευτεροταγής και η τριτοταγής δομή αναφέρονται στην τρισδιάστατη οργάνωση της αλυσίδας, δηλαδή στον τρόπο με τον οποίο η πολυπεπτιδική αλυσίδα συσπειρώνεται, ανακάμπτεται και προσανατολίζεται στο χώρο. Την πιο συνηθισμένη μορφή δευτεροταγούς δομής αποτελεί η α-έλικα η οποία οφείλεται στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου, μεταξύ του υδρογόνου της δευτεροταγούς αμινικής ομάδας [HN=] ενός πεπτιδικού δεσμού και του καρβονυλικού οξυγόνου, του μεθεπόμενου πεπτιδικού δεσμού. Άλλη μορφή δευτεροταγούς δομής αποτελεί η πτυχωτή επιφάνεια ή β-δομή. Υπάρχουν

περιπτώσεις όπως το κολλαγόνο όπου η δευτεροταγής του δομή εμφανίζει τη μορφή τριπλής έλικας. Οι τρεις έλικες συγκρατούνται μεταξύ των με διπλούς δεσμούς υδρογόνου, μεταξύ δυο πεπτιδικών αμινομάδων, διαφορετικών αλυσίδων και του πεπτιδικού καρβονυλίου της τρίτης. Οι δύο σημαντικότερες τεχνικές προσδιορισμού της δομής μιας πρωτεΐνης είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η κρυσταλλογραφία των ακτίνων X, (X-Ray Diffraction) (Stewartetal., 1990).

Η μελέτη του σχήματος μιας πρωτεΐνης στο χώρο μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενέργειας πολύ μικρού μήκους κύματος, με χρήση ακτίνων X. Η ανάλυση με ακτίνες X είναι μια διαδικασία που δίνει τη δυνατότητα στον αναλυτή να απεικονίσει την τρισδιάστατη εικόνα της θέσης κάθε ατόμου στην πρωτεΐνη. Η πρώτη πρωτεΐνη που μελετήθηκε με αυτή τη μέθοδο ήταν η μυοσφαιρίνη και ακολούθησε η αιμοσφαιρίνη. Καθώς όλο και περισσότερες πρωτεΐνες προστίθεντο στη λίστα αυτή, έγινε φανερή η ακόλουθη αρχή: σε κάθε πρωτεΐνη, ουσιαστικά όλα τα αμινοξέα στο εσωτερικό της είναι μη πολωμένα αμινοξέα, όπως η λευκίνη, η βαλίνη και η φαινυλαλανίνη. Η τάση του νερού να απωθεί λόγω υδροφοβικότητας τα μη πολωμένα μόρια ουσιαστικά ωθεί τα μη πολωμένα τμήματα της αλυσίδας αμινοξέων στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, (Bellissent-Funel etal., 2016). Το γεγονός αυτό θέτει τα παραπάνω τμήματα πολύ κοντά το ένα στο άλλο, αφήνοντας ελάχιστο κενό μεταξύ τους στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Τα πολωμένα και φορτισμένα αμινοξέα είναι αυτά που απομένουν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, εκτός από ορισμένα που έχουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο (Radzickaetal., 1998).

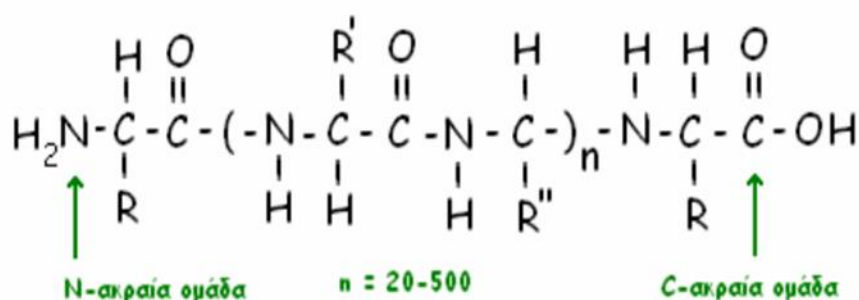
Τα μήκη δεσμών και οι γωνίες δεσμών του πολυπεπτιδικού μοριακού ικρίώματος (backbone) της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερές, πάνω στις επίπεδες πεπτιδικές υπομονάδες (ομάδες). Ωστόσο οι φ και ψ πρωτεϊνικές γωνίες αποτελούν τις μοναδικές ελεύθερες παραμέτρους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που μαζί με τους πολλαπλούς διαμοριακούς δεσμούς (υδρογόνου, θείου, φορτίου, πλευρικών ομάδων) τους επιτρέπουν να αναδιατάσσονται (αναδίπλωση, δίπλωμα, folding) και να αποδιατάσσονται (αποδίπλωση, ξεδίπλωμα, defolding), στον τρισδιάστατο χώρο, μεταβάλλοντας τις στερεοδιατάξεις των, σε συμπυκνωμένες ή εκτεταμένες δομές. Τέτοιοι διαμοριακοί δεσμοί είναι εντός της πρωτεϊνικής ατράκτου (scaffold) οι γέφυρες (δεσμοί) υδρογόνου, οι δεσμοί φορτίου ιοντικών ζευγών (δεσμοί άλατος), οι

ομοιοπολικοί δεσμοί (θείου-θείου) και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (δημιουργία υδροφοβικού πυρήνα)(Albertsetal., 2010).

Η δομή των πρωτεϊνών ακολουθεί μια ιεραρχία και καθορίζεται πλήρως, από την πρωτοταγή (αμινοξική ακολουθία), την δευτεροταγή (τοπικές διαμορφώσεις της πολυ-πεπτιδικής αλυσίδας), την τριτοταγή (τρισδιάστατο δίπλωμα, folding) και την τεταρτοταγή δομή (αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) (Lindorff-Larsenet al., 2011).

3.3.1 Πρωτοταγής δομή

Τα αμινοξέα συνδέονται με αμιδικούς ή πεπτιδικούς ομοιοπολικούς δεσμούς, που δημιουργούνται μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της α-αμινομάδας του επόμενου, για να σχηματίσουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι πρωτεΐνες επειδή είναι γραμμικά πολυμερή, μπορούν να περιγραφούν και ως αλληλουχίες αμινοξέων. Κατά σύμβαση αυτές οι γραμμικές σειριακές αλληλουχίες γράφονται από το αμινοτελικό, προς το καρβοξυτελικό άκρο. Ο δεσμός αυτός έχει πολλές σημαντικές ιδιότητες.



- 1) Είναι εντυπωσιακά ανθεκτικός στην υδρόλυση, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να χαρακτηρίζονται από κινητική σταθερότητα.
- 2) Η πεπτιδική μονάδα είναι επίπεδη και άκαμπτη, διότι ο δεσμός C-N έχει μερικώς χαρακτήρα διπλού δεσμού (40%).

3) Κάθε Πεπτιδική Μονάδα έχει έναν δότη (N-H) και έναν δέκτη (C=O) δεσμών υδρογόνου. Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων αυτών του κορμού, είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της πρωτεϊνικής δομής.

4) Ο πεπτιδικός δεσμός δεν έχει φορτίο, επιτρέποντας έτσι στις πρωτεΐνες να δημιουργούν συμπαγείς σφαιρικές δομές, με το μεγαλύτερο μέρος του κορμού, βυθισμένο στο εσωτερικό της πρωτεΐνης.

Η δομή των πρωτεϊνών προκύπτει κατά κύριο λόγο από τη δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, από τις οποίες αποτελούνται. Έτσι αναγνωρίζουμε την πρωτοταγή δομή, η οποία αναφέρεται στην σειριακή αλληλουχία, με την οποία ενώνονται τα αμινοξέα μεταξύ τους, για να σχηματίσουν τον πολυπεπτιδική σπονδυλική στήλη (backbone) ή το πολυπεπτιδικό κρίωμα (scaffold). Ως πρωτοταγής πρωτεϊνική δομή, ενός πολυπεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης ορίζεται η γραμμική ακολουθία των αμινοξέων, που απαρτίζουν το μεγαλομοριακό πολυπεπτιδικό κρίωμα. Αυτή η συγκεκριμένη κατά περίπτωση αλληλουχία των αμινοξέων είναι εκείνη, που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό πολλές από τις θεμελιακές ιδιότητες, των διαφόρων πρωτεϊνών και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές τους.

Οι πρωτεΐνες επειδή είναι γραμμικά πολυμερή, μπορούν να περιγραφούν και ως αλληλουχίες αμινοξέων. Κατά σύμβαση οι αλληλουχίες αυτές γράφονται απ' το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο. Δηλαδή η πρωτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται, πάντοτε ξεκινώντας από το αριστερό αμινο-τερματικό ή αμινο-τελικό $[-NH_2]$ άκρο και προχωρώντας προς το δεξιό καρβοξυλο-τερματικό ή καρβοξυ-τελικό $[-COOH]$ άκρο.

1	Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Lys Val	15
16	Ala Gly Thr Trp Tyr Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser	30
31	Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg ₄₀ Val Tyr Val Glu Glu	45
46	Leu Lys Pro Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys	60
61	Trp Glu Asn Gly Glu Cys₆₆ Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys	75
76	Thr Lys Ile Pro Ala Val Phe ₈₂ Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn	90
91	Lys Val Leu Val Leu Asp Thr Asp Tyr Lys Lys Tyr Leu Leu Phe	105
106	Cys₁₀₆ Met Glu Asn Ser Ala Glu Pro Glu Gln Ser Leu Ala Cys₁₁₉ Gln	120
121	Cys₁₂₁ Leu Val Arg Thr Pro Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys	135
136	Phe Asp Lys Ala Leu Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser	150
151	Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys₁₆₀ His Ile	

Σχήμα 3.3.1.1 Πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης: β-λακτογλοβουλίνη του γάλακτος, που αποτελείται από αλληλουχία 162 α-αμινοξέων, με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (Kontopidisetal., 2004).

Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών συνηθέστατα πραγματοποιείται, με τα ριβοσώματα των κυττάρων, ενώ τα πεπτίδια μπορούν επίσης να συντεθούν στο εργαστήριο. Η αλληλουχία της πρωτοταγούς δομής μιάς πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας, ή συνάγεται από τις αλληλουχίες του DNA. Η πρωτοταγής δομή των περισσοτέρων πρωτεϊνών έχει σήμερα διαλευκανθεί (Villaetal., 2009 ; Gumbartetal., 2009).

3.3.2 Δευτεροταγής δομή

Αναφέρεται στον τρισδιάστατο τρόπο διάταξης και την χωροταξική συσχέτιση των αμινοξέων, που βρίσκονται σε σχετικώς γειτονικά τμήματα, στην αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και κατά τον άξονα του πεπτιδικού δεσμού. Η φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης (native structure) τείνει στην ελαχιστοποίηση της

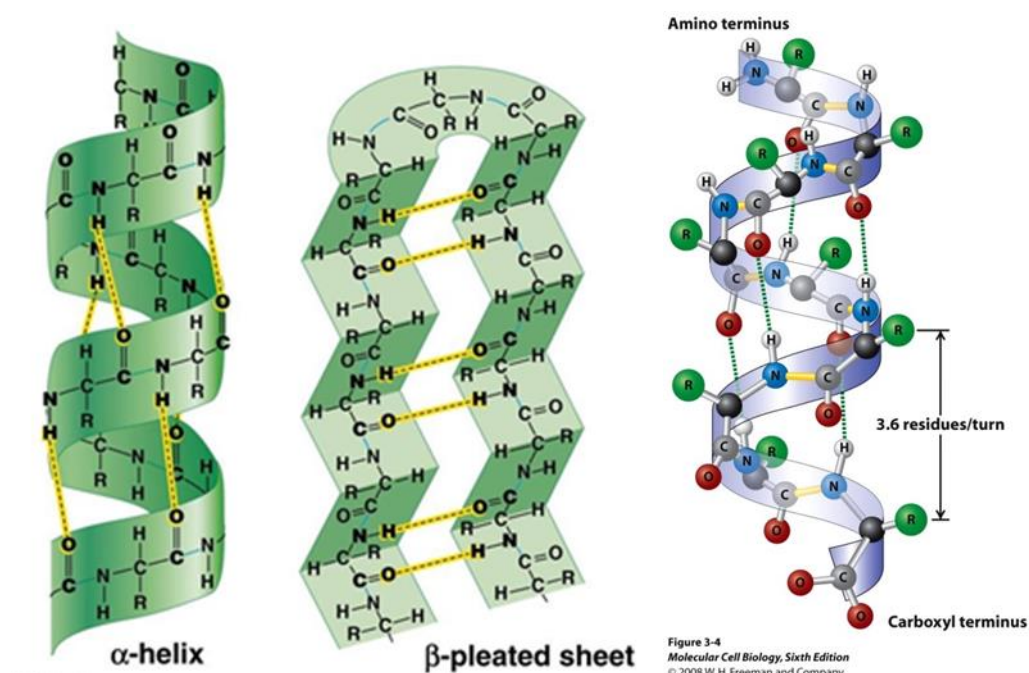
ελεύθερης ενέργειας: $\Delta G = \min$. Είναι η διάταξη που λαμβάνει στο χώρο η πολυπεπτιδική αλυσίδα γύρω από τον άξονα που σχηματίζεται από τον πεπτιδικό δεσμό. Λόγω του σημαντικού χαρακτήρα διπλού δεσμού (~40%) που παρουσιάζει ο δεσμός C-H, ο πεπτιδικός δεσμός αντιστοιχεί σε επίπεδη διάταξη με τα άτομα H και O σε αντιπαράλληλες θέσεις. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες μπορούν να αναδιπλώνονται σε δευτεροταγείς κανονικές δομές, σημαντικότερες και συνηθέστερες των οποίων είναι οι α-έλικες, οι β-πτυχωτές επιφάνειες, η έλικα κολλαγόνου, οι β-στροφές φουρκέτας και οι θηλιές. Άλλες δευτεροταγείς δομές, που όμως δεν επιδεικνύουν κανονικότητες και παρουσιάζουν δυσκολίες, στην κατάταξη και στην περιγραφή είναι οι δομές: Loop/Coil, όπως οι στροφές (φουρκέτες, Ω), η β-διόγκωση (β-bulge), οι τυχαίες (μη κανονικές) δομές [random coil] και οι υπερδευτεροταγείς δομές (Motifs) (Branden et al., 2009).

Δύο είναι τα κύρια δομικά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής: η α-έλικα και η β-πτυχώση. Στην α-έλικα η πολυπεπτιδική αλυσίδα ελίσσεται και δημιουργεί μία συμπαγή ράβδο. Στο εσωτερικό της έλικας, η ομάδα [C=O] κάθε αμινοξέος, δεσμεύεται με δεσμό υδρογόνου στην ομάδα [-NH] του αμινοξέος που βρίσκεται 3-4 κατάλοιπα μακρύτερα στη γραμμική αλληλουχία. Το κάθε αμινοξύ απέχει προβολικά από το επόμενο $1,5\text{\AA}$ άρα το βήμα της α-έλικας είναι $(1,5\text{\AA}/\text{αμινοξύ}) \times (3,6 \text{ αμινοξέα}/\text{στροφή}) = 5,4\text{\AA}/\text{στροφή}$. Στη β-πτυχώση η πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι σχεδόν πλήρως εκτεταμένη. Δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις, συνδεδεμένες με δεσμούς υδρογόνου [-NH...CO-] πλησιάζουν η μία την άλλη, δημιουργώντας β-πτυχωτές επιφάνειες (Murphy, 2001).

α-Έλικα. Η κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό της ράβδου, ενώ οι πλευρικές ομάδες -R στρέφονται και εκτείνονται προς τα έξω. Στις διάφορες πρωτεΐνες εμφανίζονται μόνο δεξιόστροφες α-έλικες. Η σταθεροποίηση της αλυσίδας επιτυγχάνεται με δεσμούς υδρογόνου, μεταξύ του -CO του ενός αμινοξέος και της ομάδας -NH, τεσσάρων μονάδων χαμηλότερα στη γραμμική αλληλουχία. Κάθε δεξιόστροφη περιστροφή περιέχει 3,6 αμινοξέα, με βήμα 0,54nm, με διάμετρο 0,6nm, με γωνία 100 και μετατόπιση $1,5\text{\AA}$. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πεπτιδικών δεσμών οδηγούν σε υψηλή σταθερότητα, μεγάλη πυκνότητα και μικρές επιδράσεις με άλλα μόρια ύδατος. Το αμινοξύ προλίνη με μη συμβατή με α-έλικα, διακόπτει την δομή και οδηγεί σε τμήματα τυχαίας σπείρας, όπως στην καζεΐνη. Τυχαία σπείρα

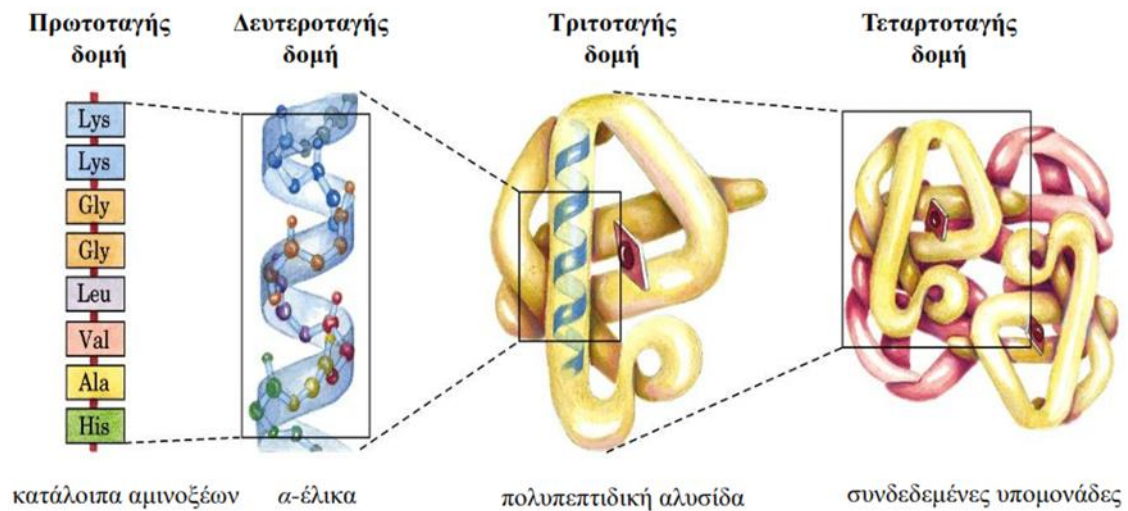
(random coil) δημιουργείται επίσης λόγω φορτισμένων ή ογκωδών πλευρικών αλυσών (ParticleSciences, 2009).

β-Πτυχωτές Επιφάνειες Στη δομή πτυχωμένων φύλλων εμφανίζεται μια επίπεδη επιφάνεια, που είναι σχεδόν τελείως ανοιχτή και διαθέτει μία χαλαρή περιέλιξη, με δομή ζίγκ-ζαγκ, περισσότερο τεντωμένη από την α-έλικα. Η απόσταση μεταξύ των γειτονικών αμινοξέων είναι $3,5\text{\AA}$. Η σταθεροποίηση της β-πτυχωτής επιφάνειας γίνεται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ $-\text{NH}$ και $-\text{CO}$, διαφορετικών τμημάτων της ίδιας αλυσίδας ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Οι διαφορετικές αυτές αλυσίδες μπορεί να έχουν την ίδια ή αντίθετη κατεύθυνση. Οι πεπτιδικές αλυσίδες σχηματίζουν με ενδο-αλυσιδικούς δεσμούς υδρογόνου και τα πτυχωμένα φύλλα διευθετούνται παράλληλα ή αντιπαράλληλα. Οι R- ομάδες τοποθετούνται πάνω και κάτω από τα φύλλα, εκτός των αμινοξέων Asn, Glu, His, Lys, Pro και Ser (Schulzetal., 1990).



Σχήμα 3.3.2.1 Οι χωροταξικές απεικονίσεις της α-Έλικας και των β-Πτυχωτών Επιφανειών. Φαίνονται επίσης οι διαμοριακοί δεσμοί σταθεροποίησης-δεσμοί υδρογόνου, του πρωτεϊνικού μορίου.

Έλικας, Υπερέλικας Κολλαγόνου (310). Αποτελεί μια τρίτη μορφή της δευτεροταγούς δομής. Είναι αριστερόστροφος, με 3 αμινοξέα/περιστροφή. Αποτελείται από τρεις ελικοειδείς αλυσίδες, που περιτυλίγονται η μια γύρω από την άλλη. Διαφέρει από την ελικοειδή μορφή της α-έλικας, καθώς δεν περιέχει δεσμούς υδρογόνου. Σταθεροποιείται με τις απώσεις των δακτυλίων της πυροδιλόνης και της προλίνης.



Σχήμα 3.3.2.2 Συγκριτική απεικόνιση των τεσσάρων χωροταξικών πρωτεϊνικών δομών. Φαίνεται και ο τρόπος, με τον οποίον κάθε απλούστερη δομή εγκιβωτίζεται στην επόμενη συνθετότερη δομή.

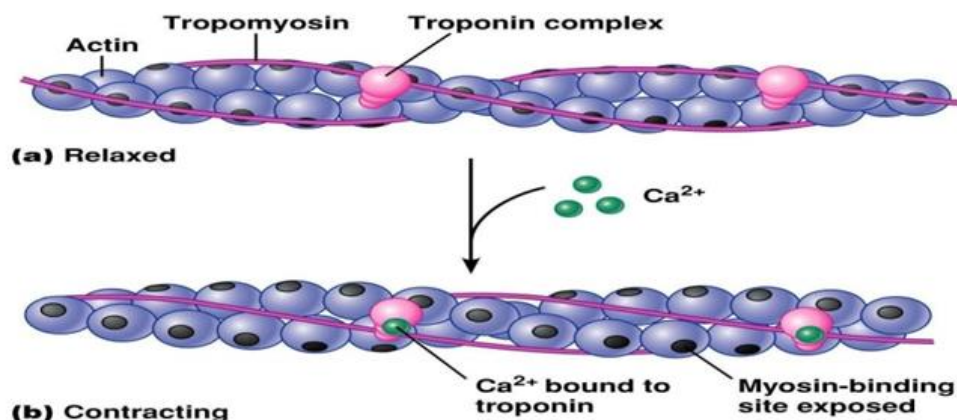
β -Στροφές ή β -κάμψεις. Η δομή αυτή εμφανίζει την μορφή φουρκέτας. Δημιουργείται όταν η ομάδα $-\text{CO}$ στη θέση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ενώνεται με την ομάδα $-\text{NH}$ στη θέση $(n+3)$. Στην δομή αυτή επιτρέπεται η αλλαγή στην κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και συχνά συνδέονται αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες.

3.3.3 Τριτοταγής δομή

Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στην τρισδιάστατη οργάνωση, μεγάλων τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που περιέχουν περιοχές σαφώς καθορισμένης δευτεροταγούς δομής και περιοχές με ασαφή ή χωρίς δευτεροταγή δομή. Αποτελεί τη στερεοδιάταξη των απομακρυσμένων μεταξύ τους αμινοξέων, στην γραμμική αλληλουχία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Προκύπτει από την αναδίπλωση των

αλύσων του όλου συστήματος, οπότε σχηματίζονται οι ινώδεις πρωτεΐνες (fibrous) που περιλαμβάνουν κυρίως α-έλικες και οι σφαιροειδείς πρωτεΐνες (globular) που περιλαμβάνουν εν μέρει α-έλικες. Στην τριτοταγή δομή τα στραμμένα τμήματα του πρωτεϊνικού μορίου συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και κυρίως με ομοιοπολικούς δισουλφιδικούς δεσμούς, που αυξάνουν σημαντικά τη σταθερότητα του μορίου. Η δομή, ονομάζεται τριτοταγής δομή. Η συμπαγής και ασύμμετρη τριτοταγής δομή, κάθε πολυπεπτιδίου στο χώρο δεν είναι εντελώς σταθεροποιημένη, αλλά υφίσταται συνεχείς διακυμάνσεις. Το περιβάλλον μίας πρωτεΐνης καθορίζει τα μέγιστα την τριτοταγή δομή της.

Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες μπορούν να αναδιπλώνονται σε συμπαγείς δομές, με μη πολικά κέντρα. Οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες εισέρχονται στο εσωτερικό της δομής, ενώ οι πολικές στην επιφάνεια. Οι δυνάμεις που καθορίζουν την τρισδιάστατη δομή είναι: ηλεκτροστατικές, δεσμοί υδρογόνου και van der Waals. Οι παραπάνω δυνάμεις σταθεροποιούν τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής. Χαρακτηριστική πρωτεΐνη τριτοταγούς δομής των ανθρώπινων μυών είναι η Τροπομυοσίνη (Nevzorovetal., 2011)(Σχήμα 3.3.3.1).Οι τριτοταγείς δομές των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά:



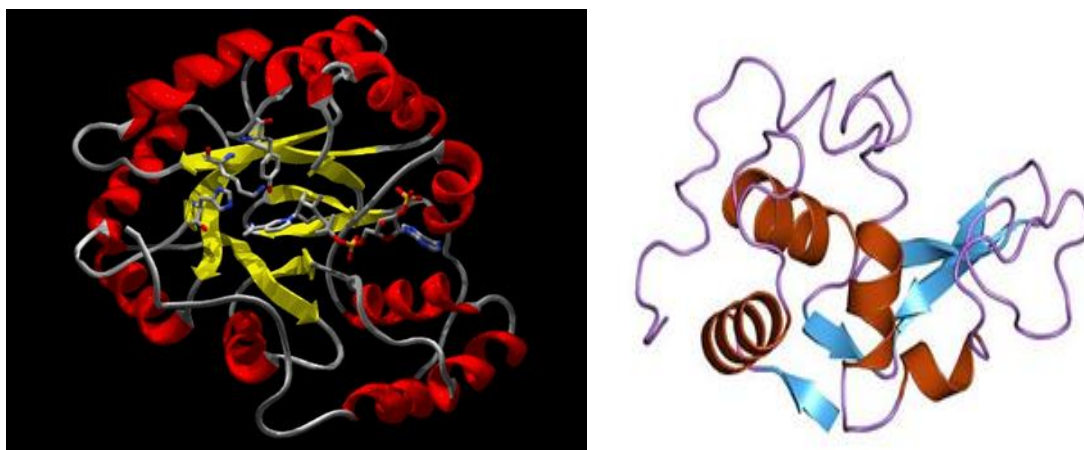
Σχήμα 3.3.3.1 Η τριτοταγής μοριακή δομή της Τροπομυοσίνης-3.

1) Στο εσωτερικό της συμπαγούς πρωτεϊνικής δομής, συνήθως τοποθετούνται τα υδρόφοβα αμινοξέα και

2) Η επιφάνεια περιέχει κατά κύριο λόγο τα υδρόφιλα αμινοξέα, που αλληλεπιδρούν με το υδατικό περιβάλλον.

Η κινητήρια δύναμη της αναδίπλωσης, είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του εσωτερικού πεδίου. Μερικές πρωτεΐνες των μεμβρανών, εμφανίζουν αντίθετη κατανομή, με τα υδρόφοβα αμινοξέα στην επιφάνεια να αλληλεπιδρούν με τη λιπδική διπλοστοιβάδα, και τα υδρόφιλα στο εσωτερικό, αποφεύγοντας το εξωτερικό περιβάλλον.

Η σωστή τριτοταγής δομή είναι απαραίτητη, για τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι διαφορετικοί τρόποι απεικόνισης της τριτοταγούς δομής δίνουν και διαφορετικές πληροφορίες για την ίδια την πρωτεΐνη. Συχνά ορισμένα μοτίβα της δευτεροταγούς δομής χαρακτηρίζουν και την τριτοταγή δομή, καθώς και τη λειτουργία των διαφόρων πρωτεϊνών (Yoshimuraetal., 1988 ; Petersetal., 1989).



Σχήμα 3.3.3.2 Αριστερά: Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής σφαιρικής πρωτεΐνης. Οι κόκκινες σπείρες συμβολίζουν τμήματα α-έλικας και τα βέλη περιοχές πτυχωμένων φύλλων. Δεξιά: Η μοριακή διάταξη της Λυσοζύμης. Οι καστανές περιελίξεις παριστάνουν τις α-helices και τα κυανά βέλη τα β-πτυχωμένα φύλλα.

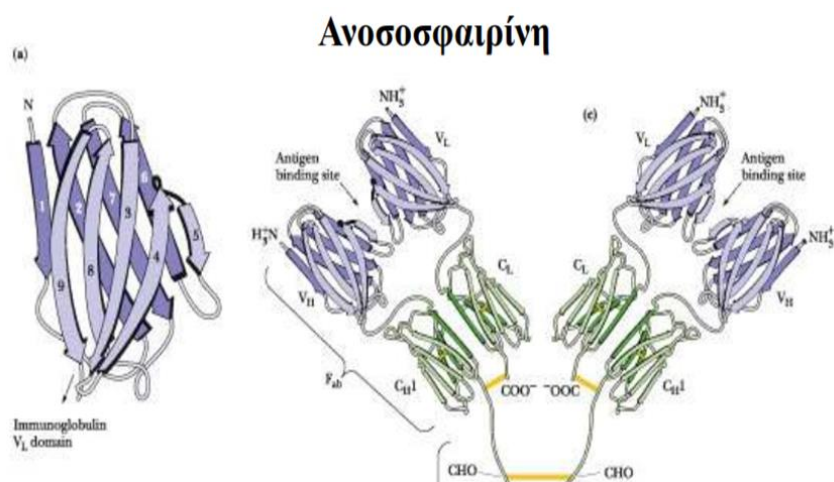
Στην τριτοταγή δομή ανήκουν οι Ινώδεις Πρωτεΐνες (κυρίως α- έλικες) και οι Σφαιροειδείς Πρωτεΐνες (globular). Οι υδατοδιαλυτές σφαιροειδείς πρωτεΐνες τείνουν να αποκτήσουν διαμόρφωση τέτοια, ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να διατάσσονται στο εσωτερικό και τα υδρόφιλα ομοιόμορφα στην επιφάνεια. Οι δεσμοί υδρογόνου

παίζουν σημαντικό ρόλο, στην σταθεροποίηση των τριτοταγών δομών. Σε αυτές ανήκουν οι πρωτεΐνες Καλμοδουλίνη, Τροπομυοσίνη-3 και η Πρωτεΐνη Transcription Factor Sp1 (Stevens, 1983 ; Chinetal., 2000 ; Suske, 1999).

3.3.4 Τεταρτοταγής δομή

Χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες, με περισσότερες από μια υπομονάδες πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αναφέρεται στη χωροδιάταξη αυτών των υπομονάδων, καθώς και στα είδη των επαφών τους. Οι αλυσίδες μπορεί να είναι ταυτοτικές ή και διαφορετικές. Ως τεταρτοταγής δομή χαρακτηρίζεται η χωροταξική γεωμετρία, με την οποία συγκροτείται το μόριο της πρωτεΐνης, ως αποτέλεσμα του τρόπου με τον οποίο συνδέονται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεταξύ των, έτσι ώστε να αποκτήσουν τη μεγαλύτερη δυνατή θερμοδυναμική και χωροταξική σταθερότητα. Η δομή αυτή σχηματίζεται αυθόρμητα κατά τη βιοσύνθεση μιας πρωτεΐνης και προκύπτει μέσω αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ενεργών ομάδων, που ευρίσκονται στην επιφάνεια των πολυπεπτιδίων (Veenhoffetal., 2002).

Διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης, συχνά με διαφορετικές λειτουργίες, είναι δυνατό να αποτελούν δομικά διακριτές περιοχές. Περιοχές με συγγενικές δομές απαντούν σε διαφορετικές πρωτεΐνες, που εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες. Οι τεταρτοταγείς δομές μπορεί να είναι απλές, όταν αποτελούνται από δύο ίδιες υπομονάδες ή πολύπλοκες, όταν αποτελούνται από πολλές διαφορετικές υπομονάδες. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι υπομονάδες συγκρατούνται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Η εκτεθειμένη επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι δυνατό να εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια, συμπεριλαμβανομένων και άλλων πρωτεϊνών. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα μεταξύ των υπο-μονάδων των ενζύμων ή μεταξύ πολυμερών δομικών πρωτεϊνών έχουν ως συνέπεια το υψηλότερο επίπεδο οργάνωσης, την τεταρτοταγή δομή. Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες τεταρτοταγούς δομής και υψίστης βιοχημικής σημασίας είναι τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες(immunoglobulines) (Nelsonetal., 2012).



Σχήμα 3.3.4.1 Οι στερεοτακτικές μοριακές δομές της ανοσοσφαιρίνης

3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, η κάθε μία με ξεχωριστή διαμόρφωση στο χώρο, η οποία οφείλεται στη διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων τους και ξεχωριστές ιδιότητες και ξεχωριστό τρόπο δράσεως. Για να γίνει η μελέτη τους, οι πρωτεΐνες πρέπει να απομονωθούν από το κυτταρικό διάλυμα στο οποίο βρίσκονται, κάτι που επιτυγχάνεται με ποικίλες διαδικασίες, ώστε οι πρωτεΐνες να καθαρισθούν και να απαλλαγούν από όλες τις ανεπιθύμητες προσμίξεις. Στη συνέχεια μπορεί να βρεθεί η αλληλουχία της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Edman, αλλά πρόσφατα σε αυτό το τομέα η χρήση τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA έχει προσφέρει νέες πληροφορίες. Στο προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης πολύ χρήσιμη έχει αποδειχθεί η χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η κρυσταλλογραφία ακτίνων- X. Τέλος, σημαντική για τη κατανόηση της φυσιολογικής δράσης μιας πρωτεΐνης είναι ο εντοπισμός της, εντός του ζώντος οργανισμού (Vittetal., 1990).

3.5 Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Οι πρωτεΐνες, εκτός των στοιχείων οξυγόνο (O) υδρογόνο (H) και άνθρακα (C) περιέχουν απαρεγκλίτως το χημικό στοιχείο άζωτο (N). Οι ενώσεις του αζώτου

λέγονται αμίνες και βρίσκονται στις πρωτεΐνες με τη μορφή αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες με τη βοήθεια ορισμένων ενζύμων και οξέων διασπώνται σε μικρότερες μονάδες μέσα στον στόμαχο των θηλαστικών, στα αμινοξέα. Χημικά μία ένωση θεωρείται αμινοξύ, όταν περιέχει στο μόριο της τουλάχιστον μία αμινομάδα κι ένα καρβοξύλιο. Τα αμινοξέα που έχουν ανακαλυφτεί μέχρι τώρα είναι εικοσιεπτά, από τα οποία τα δεκαεννέα το ανθρώπινο σώμα έχει την ικανότητα να τα συνθέτει από μόνο του, παράγοντάς τα από διάφορους συνδυασμούς, ενώ τα άλλα οχτώ πρέπει οπωσδήποτε να τα παραληφθούν σε καθημερινή βάση, από τις διατροφικές πηγές, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν είναι αναγκαίο να παραλαμβάνονται από τις τροφές και τα υπόλοιπα αμινοξέα (Murrayetal., 2006).

Τα οχτώ αυτά αμινοξέα τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός μας και πρέπει να τα παίρνουμε καθημερινά από τις τροφές μας ονομάζονται βασικά αμινοξέα. Αντίθετα με τον άνθρωπο τα φυτά μπορούν να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα που τους χρειάζονται. Βασικά αμινοξέα είναι η θρεονίνη, η αργινίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η βαλίνη, η λευκίνη, φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη, η ισολευκίνη και η ιστιδίνη. Μη βασικά είναι η γλυκίνη, η αλανίνη, η σερίνη, η κυστεΐνη, η καζεΐνη, η γλουταμίνη, το γλουταμινικό οξύ, η τυροσίνη, η προλίνη, η κιτρουλίνη, η ορνιθίνη και το ασπαρτικό οξύ.

Το 1981 δύο ομάδες βιοχημικών ανακάλυψαν άλλα τρία αμινοξέα ανατρέποντας έτσι το μέχρι τότε "δόγμα των 20 αμινοξέων". Συγκεκριμένα οι βιοχημικοί Wilhelm και Kupka στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης απομόνωσαν το αμινοκιτρικό οξύ από τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNP), (Wilhelm & Kupka, 1981). Τον ίδιο χρόνο οι Κωχ και Μπούσκερκ από το Πανεπιστήμιο του Κολοράντο ανακάλυψαν άλλα δύο ακόμη βασικά αμινοξέα το β-καρβοξυ-ασπαραγινικό οξύ και το γ-καρβοξυ-γλουταμινικό οξύ, (Robert et al., 1981).

Η διάκριση σε "βασικά" (απαραίτητα) και "μη βασικά" αμινοξέα βρίσκεται μόνον στην θεωρία: Όλα τα αμινοξέα είναι "απαραίτητα" και σε καμιά περίπτωση δε θα πρέπει να θεωρήσουμε τα μεν χρήσιμα και τα δε άχρηστα. Εκτός από αυτά τα αμινοξέα υπάρχουν μερικές δεκάδες ακόμα, που είτε μελετώνται, είτε θεωρούνται απολύτως δευτερεύοντα ή χαρακτηρίζονται ως "ψευδοαμινοξέα", δηλαδή ουσίες που η χημική τους σύνθεση προσομοιάζει με αυτήν των αμινοξέων, χωρίς όμως να είναι

απολύτως όμοια. Τέτοια είναι η ταυρίνη, η ορνιθίνη, η ομοκυστεΐνη, η κιτρουλλίνη, το αργινινοηλεκτρικό και άλλα (USDA, 2005).

3.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν την εργαλειοθήκη του ζώντος κυττάρου. Ο αριθμός των διάφορων πρωτεϊνών που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό υπερβαίνει τις 30.000. Ο αριθμός φαντάζει πολύ μεγάλος, αλλά θα πρέπει να σκεφτεί κανείς, ότι κάθε μία πρωτεΐνη επιτελεί και μία συγκεκριμένη λειτουργία, καθώς επίσης ότι ο αριθμός των λειτουργιών, τις οποίες οι πρωτεΐνες επιτελούν είναι τεράστιος. Θα αναφερθούμε περιληπτικά σε μερικές από αυτές τις λειτουργίες και στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτές. Η τεράστια βιοχημική σημασία των πρωτεϊνικών ενώσεων, εντός των ζώντων οργανισμών επικεντρώνεται κατά κύριο λόγο (Iwaniaketal., 2008):

α) στην ανάπτυξη νέων κυττάρων (τρίχες, αίμα και νύχια), β) στην αποκατάσταση και ανακατασκευή των κατεστραμμένων κυττάρων, γ) στην παραγωγή θερμότητας και ενέργειας, (Αποτελούν την έσχατη πηγή για τον οργανισμό, σε συνθήκες στέρησης), δ) στην παραγωγή σημαντικών χημικών ουσιών του σώματος, όπως τα ένζυμα, οι ορμόνες και τα αντισώματα, ε) στην ενζυμική κατάλυση, στ) στην μεταφορά και αποθήκευση, ζ) στην συνδυασμένη κίνηση, η) στην μηχανική στήριξη, θ) στην ανοσολογική προφύλαξη, ι) στην δημιουργία και μεταφορά νευρικών ώσεων και κ) στην ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης (Tropp, 2011).

3.7 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

Ο βιοχημικός εντοπισμός και η ανίχνευση μιας πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο και γενικότερα μέσα στον οργανισμό των εμβίων όντων είναι το ίδιο σημαντική, για τη μελέτη της φυσιολογικής της δράσης, με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων και της δομής της πρωτεΐνης. Για το εντοπισμό μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προσδένουν την πρωτεΐνη με την οποία εμφανίζουν συγγένεια. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη

περιοχή της πρωτεΐνης, το αντιγόνο, πάνω στην οποία και προσδένονται (Mahmoodetal., 2007).

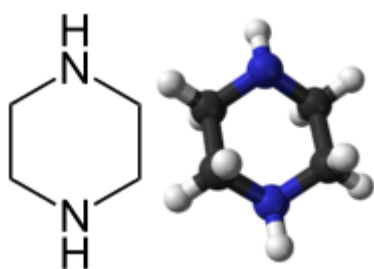
Στη συνέχεια, ιχνηθετημένα με φθορίζουσες ή ραδιενεργές ουσίες αντισώματα προσδένονται στα πρώτα και επιτρέπουν τον εντοπισμό τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ευρέως στις εργαστηριακές εξετάσεις επειδή είναι εξειδικευμένα, με αποτέλεσμα να συνδέονται με ένα μόνο αντιγόνο (Kraynovetal., 2011).

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα για να εντοπιστεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα διάλυμα, όπως για παράδειγμα ο ορός του αίματος, χρησιμοποιείται η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση, γνωστή εν συντομία ως ELISA. Μια διαφορετική μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνών στο κύτταρο ή σε ένα κυτταρικό υγρό είναι η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Ουέστερν (Western blotting). Σε αυτή τη τεχνική το διάλυμα ηλεκτροφορείται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου και για να αντιδράσουν πιο εύκολα με το αντίσωμα μεταφέρονται σε μια άλλη επιφάνεια. Έπειτα, ένα δεύτερο ιχνηθετημένο αντίσωμα συνδέεται με το πρώτο και βοηθά στον εντοπισμό του. Για την παρατήρηση πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο χρησιμοποιείται ο ανοσοφθορισμός. Φθορίζοντα αντισώματα προσδένονται στη πρωτεΐνη στόχο και στη συνέχεια ένα μικροσκόπιο φθορισμού αποκαλύπτει τη θέση τους -άρα και τη θέση της πρωτεΐνης- μέσα στο κύτταρο (Weiletal., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

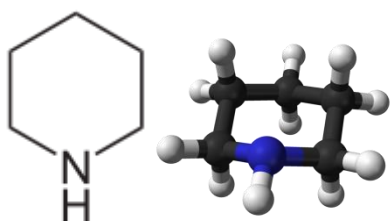
Η πιπεραζίνη είναι μια οργανική ένωση που αποτελείται από έναν εξαμερή δακτύλιο που περιέχει δύο άτομα αζώτου στις αντίθετες θέσεις στον δακτύλιο. Η πιπεραζίνη εμφανίζεται ως μικροί αλκαλικά υγροποιημένοι κρύσταλλοι με μια αλατούχο γεύση. Οι πιπεραζίνες είναι μια ευρεία κατηγορία χημικών ενώσεων με πολλές σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες, οι οποίες περιέχουν έναν πυρήνα πιπεραζίνης ως λειτουργική ομάδα.



Πιπεραζίνη

Προέλευση και ονομασία

Οι πιπεραζίνες ονομάστηκαν αρχικά έτσι λόγω της χημικής ομοιότητάς τους με την πιπεριδίνη, (μέρος της δομής της πιπερίνης), στο φυτό του μαύρου πιπεριού (*Pipernigrum*). Είναι σημαντικό να σημειωθεί, εντούτοις, ότι οι πιπεραζίνες δεν προέρχονται από φυτά του γένους *Piper*.



Πιπεριδίνη

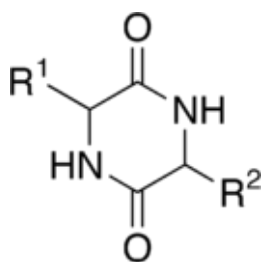
Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPS) είναι κυκλικά διπεπτίδια που δημιουργούνται από την συμπύκνωση δύο α-αμινοξέων. Όχι μόνο αφθονούν στη φύση, αλλά συχνά παράγονται ως προϊόντα διάσπασης των πολυπεπτιδίων, ιδιαίτερα στον τομέα των μεταποιημένων τροφίμων και ποτών. Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες απαντώνται σε πολλά φυσικά προϊόντα, και αυτή η υποομάδα συχνά βρίσκεται μόνη της ή ενσωματωμένη σε μεγαλύτερες, πιο πολύπλοκες αρχιτεκτονικές μέσα σε μια ποικιλία φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνει μύκητες, βακτήρια, το φυτικό βασίλειο και τα θηλαστικά. Πρόκειται για μια κατηγορία απαντώμενων φυσικών προνομιακών δομών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε ένα μεγάλο εύρος υποδοχέων, και διαθέτουν πολλά από τα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ελκυστικά για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Είναι μικρού MB, περιορισμένης διαμορφώσεως ετεροκυκλικές χημικές ενώσεις των οποίων η πολυμορφία μπορεί να εισαχθεί σε έως και έξι θέσεις ενώ στερεοχημικά ελέγχεται σε έως και τέσσερις θέσεις, και είναι σταθερές στην πρωτεόλυση. Είναι σημαντικές στην δημιουργία φαρμάκων επειδή έχουν άκαμπτο σκελετό, οι οποίες μπορούν να μιμηθούν ένα κατά προτίμηση πεπτίδιο διαμόρφωσης και δεσμεύουν αμινοξέα τα οποία εντάσσονται στο πλαίσιο των δομών τους, χωρίς τις ανεπιθύμητες φυσικές ιδιότητες των πεπτιδίων και των μεταβολικών προϊόντων τους.

Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPs), είναι τα μικρότερα κυκλικά διπεπτίδια που λαμβάνονται από τη συμπύκνωση δύο α-αμινοξέων (Borthwick, 2012), η χημική δομή των οποίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1.1. Οι 2,5- δικετοπιπεραζίνες, είναι γνωστές και ως 2,5-διοξοπιπεραζίνες, κυκλοδιπεπτίδια και ανυδρίτες των διπεπτιδίων. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά ως φυσικά προϊόντα στις αρχές του 20ου αιώνα (Borthwick A. D., 2012; Marinea M., et al, 2013; Van der Merwe E., et al, 2008). Η πρώτη δικετοπιπεραζίνη που συντέθηκε ήταν η κύκλο-γλυκίνη-γλυκίνη (cyclo-Gly-Gly) από τους Curtius και Goebel το 1888 (Borthwick, 2012) . Η πρώτη βιολογικά δραστική ένωση η cyclo (L-His-L-Pro) βρέθηκε στα ανθρώπινα ούρα από τον Perry και τους συνεργάτες του το 1965 (Prasad, 1995). Αναρίθμητα μόρια φυσικών προϊόντων που φέρουν το δακτύλιο 2,5-DKPs έχουν απομονωθεί επειδή ορισμένες από αυτές τις ενώσεις εμφάνισαν ποικίλες και ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες (Borthwick, 2012). Μέχρι σήμερα περίπου 200 DKPs έχουν απομονωθεί από ένα ευρύ φάσμα θαλάσσιων οργανισμών (El-Gendy and Rateb, 2015). Οι 2,5-

DKPs, φέρεται να είναι ενδογενείς σε κάποιους ζωντανούς οργανισμούς ή υπάρχουν ως προϊόντα από ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις, ή αποτελούν παραπροϊόντα των διαδικασιών παραγωγής ή αποτελούν τα προϊόντα της αποικοδόμησης των μεγαλύτερων πρωτεϊνών (Dourtoglou et al., 2012; Van der Merwe et al., 2008) ή των ολιγοκαι πολυπεπτιδίων σε επεξεργασμένα τρόφιμα και ποτά που συχνά σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της χημικής και θερμικής επεξεργασίας (Dourtoglou et al., 2012; Prasad, 1995). Πιστεύεται δε, ότι προκύπτουν από τη μη ενζυμική κυκλοποίηση διπεπτιδίων και τα αμίδιά τους, κατά τη διάρκεια των χημικών και θερμικών χειρισμών τους (Prasad, 1995). Σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση, μια δικετοπιπεραζίνη, η cyclo (Pro-Pro), φέρεται να είναι μια φερομόνη η οποία παράγεται από τα άλγη, μόνο κατά τη διαδικασία ζευγαρώματος των περωτών διατόμων και η έλξη ήταν θετική μόνο όταν η συγκεκριμένη δικετοπιπεραζίνη ήταν ανιχνεύσιμη (Gillard et al, 2013).

Αυτά τα απλά μόρια, σε μεγάλο βαθμό λαμβάνονται με εκχύλιση από φυσικές πηγές αλλά μπορούν και να συντεθούν εύκολα από άμεσα διαθέσιμα α-αμινοξέα και έχουν τη δυνατότητα να αυξάνουν τη γεύση σε μια ποικιλία τροφίμων (Martins and Carvalho, 2007). Έχουν χρησιμοποιηθεί ως βάση για την δημιουργία βιβλιοθηκών-συλλογών στη συνδυαστική χημεία και στην ανακάλυψη συνδυαστικών φαρμάκων. Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη χημεία και βιολογία των φυσικών προϊόντων που περιέχουν το δακτύλιο των 2,5-DKP, στην πηγή σύνθεσής τους, στις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, στις φαρμακολογικές ιδιότητες του δακτυλίου στη σύνθεση, στα φυσικά χαρακτηριστικά, στη χημική δραστηριότητα και στις εφαρμογές τους (Borthwick, 2012).

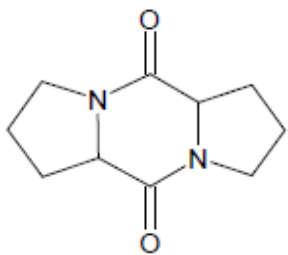
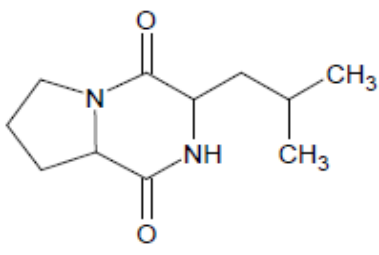
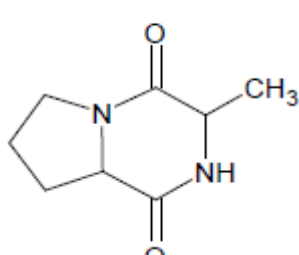


Σχήμα 4.1.1 Γενική χημική δομή δικετοπιπεραζίνης

Οι 2,5-DKPs πρόσφατα έχουν προσελκύσει την προσοχή πολλών ερευνητών λόγω των βιολογικών τους ιδιοτήτων (Chen et al., 2004). Αποτελούν μια πλούσια πηγή νέων βιολογικά ενεργών συστατικών, με το ιδιόμορφο ετεροκυκλικό σύστημά τους να βρίσκεται σε πολλά φυσικά προϊόντα.

Η ονοματολογία τους υποδεικνύεται από τον κώδικα τριών γραμμάτων για κάθε ένα από τα δύο αμινοξέα συν ένα πρόθεμα που ορίζει την απόλυτη διαμόρφωση, π.χ. *cyclo* (L-Xaa-L-Yaa) (Borthwick and Da Costa, 2015). Στο Πίνακα 4.1.1 φαίνεται η χημική δομή της *cyclo* (Pro -Pro) (A), της *cyclo* (Leu-Pro) (B) και της *cyclo* (Ala-Pro) (Γ).

Πίνακας 4.1.1 Χημικές δομές δικετοπιπεραζινών

A	B	Γ
		
cyclo (Pro -Pro)	cyclo (Leu-Pro)	cyclo (Ala- Pro)

4.2 ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Οι κρυσταλλικές και οι μοριακές δομές των 2,5-DKPs έχουν εξεταστεί εκτεταμένα επειδή αυτά τα μόρια αποτελούν την απλούστερη κατηγορία των κυκλικών πεπτιδίων. Έχουν 2 *cis*-αμιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα να διαθέτουν 2 δεσμούς H δέκτες και 2 δεσμούς H δότες, σημαντικό για πρόσδεση σε ένζυμα και υποδοχείς. Επιπλέον η πλούσια πολυμορφία των δομών που περιέχουν 2,5-DKPs είναι αποτέλεσμα των έξι θέσεων στις οποίες μπορούν να προστεθούν υποκαταστάτες και των τεσσάρων θέσεων στις οποίες μπορεί να ελεγχθεί η στεreoχημεία τους. Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες είναι ημιάκαμπα μόρια και παρ' όλο που είναι αποκλειστικά

ετεροκυκλικές ενώσεις, είναι εύκαμπτες γιατί ο εξαμελής δακτύλιος μπορεί να υφίσταται διαμόρφωση (Borthwick and Da Costa, 2015).

4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Οι 2,5-DKPs είναι τα απλούστερα κυκλικά πεπτίδια που βρίσκονται στη φύση. Συνήθως βιοσυντίθενται από αμινοξέα από διαφορετικούς οργανισμούς και αντιπροσωπεύουν μια πολλά υποσχόμενη κατηγορία, βιολογικά ενεργών, φυσικών προϊόντων. Η ιδιόμορφη ετεροκυκλική δομή τους, τους προσδίδει υψηλή σταθερότητα έναντι της πρωτεόλυσης (ενζυμική αποικοδόμηση).

Λόγω της περιορισμένης τους, διαμορφωτικά, ελευθερίας και την απλότητα της δομής τους, οι DKPs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως πολύτιμα πρότυπα για διαμορφωτικές μελέτες (Cornacchia et al., 2012).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη σύνθεση των 2,5-DKPs είναι ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού με κυκλοποίηση ενός διπεπτιδίου. Δύο διπεπτίδια που είναι υποκατεστημένα με μία αμίνη στο ένα άκρο και ένα εστέρα στο άλλο, μπορούν αυθόρμητα να κυκλοποιηθούν για να σχηματίσουν μια 2,5-DKP σε ένα εύρος pH. Ωστόσο, απαιτείται προσεκτική επιλογή της συνθήκης της αντίδρασης για τον περιορισμό της ρακεμοποίησης. Αυτό επιτεύχθηκε πρόσφατα μέσω μια μεθόδου με θέρμανση με νερό, σε μικροκύματα, η οποία σε αντίθεση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους είναι ανεξάρτητη από την αλληλουχία αμινοξέων και χωρίς να παρατηρηθεί επιμερισμός (Cornacchia et al., 2012).

4.4 ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Παρά το γεγονός ότι οι 2,5-DKPs έχουν διάφορες βιολογικές δράσεις, ο φυσιολογικός ρόλος τους στους οργανισμούς που τα παράγουν παραμένει ασαφής. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι 2,5-DKPs δρουν ως διαχεόμενα μόρια και εμπλέκονται στην επικοινωνία κύτταρο-προς-κύτταρο. Μπορεί να αποτελούν μία νέα κατηγορία ανίχνευσης σημάτων σε βακτήρια (Gu et al., 2013). Τα βακτήρια επικοινωνούν μεταξύ τους με μια διαδικασία που ονομάζεται «απαρτία ανίχνευσης» (QuorumSensing, Q.S) και διαχεόμενες χημικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους

που ονομάζονται μόρια σήματος και χρησιμοποιούνται ως γλώσσες επικοινωνίας. Ανάλυση με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας μάζας έδειξε ότι αυτές οι ενώσεις ήταν οι DKPs, Cyclo (Pro-Phe), Cyclo (Pro-Tyr), Cyclo (Ala-Val), Cyclo (Pro-Leu) και Cyclo (Pro-Val) (Wang et al., 2010). Εκτός αυτού, οι 2,5-DKPs έχουν βιοδραστικές επιδράσεις επί των φυτικών ή ζωικών ξενιστών (Gu et al., 2013).

Από τις πέντε βασικές ιδιότητες της γεύσης, το πικρό θεωρείται ως προειδοποίηση κατά της τοξικότητας. Παρ' όλα αυτά, το πικρό εξακολουθεί να είναι επιθυμητό σε ορισμένα τρόφιμα όπως η μύρα, η σοκολάτα, το πράσινο και μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί και ο καφές. Στον άνθρωπο υπάρχουν 25 διαφορετικοί υποδοχείς στο πικρό. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τους υποδοχείς της πικρής γεύσης. Τα πικρά πεπτίδια είναι δομικά διαφορετική ομάδα ενώσεων. Η πικρή γεύση των τροφίμων έγκειται συνήθως σε αυτά τα πεπτιδικά κλάσματα. Υδρόλυση των πρωτεϊνών με πρωτεολυτικά ένζυμα πολύ συχνά συνοδεύεται από το σχηματισμό πικρών ουσιών (Lee and Kofonow, 2014).

Στο κακάο αναφέρθηκαν είκοσι κυκλικά διπεπτίδια. Αυτά σχηματίζονται κατά τη διαδικασία καβουρδίσματος του κακάο και παρουσιάζουν αύξηση στην πικράδα με την παρουσία της θεοβρωμίνης. Η θεοβρωμίνη έχει χαμηλό κατώφλι αντίληψης, 10 mg/L στο νερό και είναι παρούσα σε κόκκους κακάο σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1,8-3,8g/100g (Borthwick and Da Costa, 2015).

Τα κυκλικά διπεπτίδια γενικά θεωρούνται πιο πικρά από τα γραμμικά πεπτίδια. Αυτά έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία ως πικρά, ξηρά, στυπτικά και μεταλλικά. Ο Ishibashi και οι συνεργάτες του το 1988, πραγματοποίησαν μια συγκριτική μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των συνθετικών κυκλικών και των αντίστοιχα γραμμικών διπεπτιδίων και επιβεβαίωσαν ότι τα κυκλικά διπεπτίδια ήταν πιο πικρά, κάτι που συσχετίστηκε με την παρουσία των υδρόφοβων αμινοξέων. Αnéφεραν επίσης ότι τα ουδέτερα αμινοξέα δεν είχαν γεύση. Τα γραμμικά πεπτίδια εμφάνισαν μια ευρύτερη ποικιλία γεύσεων όπως πικρή, όξινη, γλυκιά, καθώς επίσης και γεύση παρόμοια με αυτή του όξινου γλουταμινικού νατρίου το οποίο αποτελεί ενισχυτικό γεύσης των τροφίμων. Η πικράδα των γραμμικών πεπτιδίων μπορεί να ενισχυθεί με ακετυλίωση ή εστεροποίηση του αμινοξέος και/ή καρβοξυ-ομάδων της αλυσίδας σύμφωνα με τον Kohl και τους συνεργάτες του. Επιπλέον, καθώς αυξάνεται το μήκος

του πεπτιδίου, αυξάνεται και η πικράδα. Τα πικρά γραμμικά πεπτίδια συνήθως περιέχουν 8 ή λιγότερα αμινοξέα (Borthwick and Da Costa 2015).

4.5 ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΕΣ

Τα απλά δικυκλοπεπτίδια προλίνης (L-Xaa-L-Pro), συμπεριλαμβανομένου των φυσικών προϊόντων cyclo (LPro-L-Pro), cyclo (L-His-L-Pro), cyclo (L-Phe-L-Pro), cyclo (L-Tyr-L-Pro), cyclo (L-Leu-L-Pro) και cyclo (L-Val-L-Pro), βρίσκονται ευρέως στα τρόφιμα και τα ποτά. Επίσης, τα αρωματικά και αλειφατικά αναλόγων cyclo (L-Phe-L-Pro), cyclo (L-Tyr-L-Pro), cyclo (L-Leu-L-Pro) και cyclo (L-Val-L-Pro) εμφανίζονται συχνά μαζί σε μια ποικιλία από καλλιέργειες βακτηρίων και μυκήτων (Borthwick, 2012). Η βιολογική δράση που παρουσιάζει αυτή η κατηγορία των 2,5-DKPs είναι εκτεταμένη και έχει αξιολογηθεί. Οι 2,5-DKPs που το ένα αμινοξύ τους είναι η προλίνη είναι οι πλέον άφθονες και δομικά ποικιλόμορφες 2,5-DKPs οι οποίες βρίσκονται στα τρόφιμα (Borthwick and Da Costa, 2015).

4.5.1 Συμμετρική Cyclo (L-Pro-L-Pro)

Η συμμετρική cyclo (L-Pro-L-Pro) είναι η κύρια 2,5-DKP σε βρασμένο βοδινό κρέας (55 ppm) (Chen et al., 2009). Εμφανίζεται επίσης σε αρκετά ποτά και τρόφιμα όπως στην μπύρα (Gautschi et al., 1997), το ψωμί (Ryan et al., 2009) και σε εκχύλισμα κοτόπουλου (Chen et al., 2004). Έχει μια αδύναμη, ελαφρώς πικρή, κοκκώδη γεύση στα 50 ppm (TC) (Gautschi et al., 1997), μια μεταλλική γεύση στα 760 μmol/L (TC), μια πικρή γεύση στα 2580 μmol/L (TC) [20] και μια ελαφρώς μεταλλική γεύση στα 200 ppm (Chen et al., 2009). Έχει επίσης απομονωθεί από το ψυχρόφιλο βακτήριο της Ανταρκτικής, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (Mitova et al., 2005) και έχει αποδειχθεί ότι έχει ασθενή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Pseudomonas aeruginosa* και *Micrococcus luteus* (Huberman et al., 2007). Επιπλέον ταυτοποιήθηκε ως φερομόνη προερχόμενη από το διάτομο *Seminavisrobusta* και βοηθά στην αναπαραγωγή (Gillard et al., 2013).

4.5.2 Αλειφατικά παράγωγα της προλίνης

4.5.2.1 Cyclo (L-Leu-L-Pro)

Το παράγωγο της λευκίνης η cyclo (L-Leu-L-Pro) είναι μια από τις σημαντικότερες 2,5-DKP, η οποία βρέθηκε στο προζύμι και το ψωμί. Βρέθηκε σε συγκέντρωση των 23 mg/kg σε κρούστα ψωμιού (Ryan et al., 2009) και είναι μια από τα σημαντικότερες 2,5-DKPs στο κακάο (149ppm, 771μmol/kg) (Stark and Hofman, 2005). Η συγκέντρωση όσον αφορά την πικρή γεύση είναι κάτω από το κατώφλι αντίληψης. Είναι το δεύτερο πιο σημαντικό παράγωγο της προλίνης, το οποίο βρέθηκε σε μια σειρά από μύρες (Gautschi et al., 1997). Επίσης, έχει βρεθεί στο μαγειρεμένο βόειο κρέας (20,6ppm) (Chen et al., 2009), σε εκχύλισμα αυτολυόμενης μαγιάς (19,2ppm) (Da Costa et al., 2010) και στον καφέ (Ginz and Engelhardt, 2000). Έχει ένα ελαφρώς πικρό, αλμυρό χαρακτήρα στα 30 ppm (Gautschi et al., 1997), και μια μεταλλική γεύση στα 120μmol/L (TC) και μια πικρή γεύση στο 1190μmol/L (TC) (Stark and Hofman., 2005).

Η cyclo (L-Leu-L-Pro) είναι ένας αντιμυκητιασικός παράγοντας που απομονώθηκε από *Streptomyces* sp. και το βακτήριο *Achromobacter xylosoxidans* και έχει ταυτοποιηθεί ως δραστική έναντι του μύκητα *Pyricularia oryzae* και μιας σειράς άλλων μυκήτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι αναστέλλει την παραγωγή της καρκινογόνου και τερατογόνου αφλατοξίνης που παράγεται από το μύκητα *Aspergillus parasiticus*. Μελέτες έδειξαν ότι τα trans-ισομερή ήταν λιγότερο ενεργά από άλλα κυκλοπεπτίδια χωρίς προλίνη και δεν είχαν την ίδια δράση με τα διπεπτίδια ανοικτής αλυσίδας (Kumar et al., 2013). Ο συνδυασμός της cyclo (L-Leu-L-Pro) και της cyclo (L-Phe-L-Pro) φαίνεται να είναι συνεργιστική. Παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα έναντι αναερόβιων Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων (Rhee, 2006).

4.5.2.2 Cyclo (L-Ile-L-Pro)

Η cyclo (L-Ile-L-Pro) είναι η δεύτερη σημαντικότερη 2,5 δικετοπιπεραζίνη η οποία βρίσκεται στο κακάο σε συγκέντρωση 113ppm, 537μmol/kg, πάνω από το κατώφλι αντίληψης (Stark and Hofman, 2005). Είναι η τρίτη σημαντικότερη 2,5 δικετοπιπεραζίνη η οποία έχει βρεθεί στην μύρα σε συγκέντρωση κάτω από το

κατώφλι αντίληψης (30ppm στο νερό) (Gautschi et al., 1997). Έχει αλμυρή γεύση στα 30 ppm (Gautschi et al., 1997), μεταλλική γεύση στα 120μmol/L και πικρή γεύση στα 480μmol/L (Stark and Hofman, 2005). Η cyclo (L-Ile-L-Pro) απομονώθηκε από το μύκητα *Rhizoctonia solani* (Pedras et al., 2005), και αποδείχτηκε ότι έχει αντιμυκητιασική δράση έναντι του *Aspergillus fumigatus*. Έρευνες έχουν δείξει ότι η cyclo (L-Ile-L-Pro) και η cyclo(L-Leu-L-Pro) βρέθηκαν σε μη ενοφθαλμισμένο μέσο ανάπτυξης και πιθανόν να σχηματίστηκαν από πεπτίδια που προέκυψαν και στη διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας κατά την παρασκευή τους (Borthwick and Da Costa, 2015).

4.5.2.3 Cyclo (L-Val-L-Pro)

Το παράγωγο της βαλίνης cyclo (L-Val-L-Pro) σε μία συγκέντρωση 1742 ppm, (8878μmol/kg) αναγνωρίστηκε ως η πιο σημαντική 2,5-DKP που συμβάλει στην πικρή γεύση του καβουρδισμένου κακάο, όπου η συγκέντρωσή της βρίσκεται πολύ πάνω από το κατώφλι αντίληψης όσον αφορά την πικρή γεύση του (Stark and Hofman, 2005), (Chen et al., 2009). Επίσης το παράγωγο της βαλίνης έχει διαπιστωθεί ως μία από τις σημαντικότερες 2,5-DKPs σε αυτολυόμενο εκχύλισμα ζύμης στα 120 ppm (Da Costa et al., 2010) και μία από τις κυριότερες 2,5-DKP σε μαγειρεμένο βοδινό κρέας στα 24 ppm (Chen et al., 2009). Το παράγωγο της βαλίνης Cyclo (L-Val-L-Pro) έχει απομονωθεί από το μύκητα *Aspergillus fumigatus* (Furtado et al., 2005) μαζί με τις cyclo (L-Pro-L-Pro), cyclo (L-Phe-L-Pro), cyclo (L-Leu-L-Pro) cyclo (L-Val-L-Leu). Όλες έχουν πολύ ασθενή αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και του *M. luteus* μόνο στη συγκέντρωση των 2,9mmolL⁻¹. Έχει επίσης απομονωθεί από μια ποικιλία θαλάσσιων μικροοργανισμών (Borthwick, 2012).

4.5.2.4 Cyclo (L-Ala-L-Pro)

Το παράγωγο της αλανίνης κυκλο (L-Ala-L-Pro) είναι η τρίτη πιο σημαντική 2,5-DKP η οποία βρέθηκε στο κακάο, (228ppm, 1357μmol/kg), όπου η συγκέντρωσή της είναι κάτω από το κατώφλι αντίληψης της πικρής γεύσης (Stark and Hofman, 2005). Επίσης βρίσκεται σε μια ποικιλία από μύρες σε μια συγκέντρωση κάτω από το κατώφλι αντίληψης (30ppm) (Gautschi et al., 1997). Βρίσκεται επίσης σε αυτολυόμενο εκχύλισμα ζύμης στα 32 ppm (Da Costa et al., 2010), στο βοδινό

κρέας στα 11 ppm και ως δευτερεύον συστατικό στο ψωμί, στο κοτόπουλο και στον καφέ. Έχει ελαφρώς στυφή γεύση στα 50 ppm (Gautschi et al., 1997), μεταλλική γεύση στα 387μmol/L (TC) και μια πικρή γεύση στα 1490μmol/L (TC) (Stark and Hofman, 2005).

4.5.2.5 Cyclo (Gly-L-Pro)

Το παράγωγο της γλυκίνης cyclo (Gly-L-Pro) είναι ένα δευτερεύον συστατικό στο ψωμί (Borthwick and Da Costa, 2015), και στο κακάο (0,3ppm, 2,1μmol/kg), όπου η πικρή γεύση υπάρχει αρκετά κάτω από το κατώφλι αντίληψης (Stark and Hofman, 2005). Εμφανίζεται επίσης σε εκχύλισμα κοτόπουλου (Chen et al, 2004). Έχει μια μεταλλική γεύση στο 384μmol/L (TC) και μια πικρή γεύση στα 3250μmol/L (TC) (Stark and Hofman, 2005). Αυτή η ενδογενής 2,5-DKP, βρέθηκε στον εγκέφαλο αρουραίου (Gudasheva et al., 1996) και έχει αναφερθεί για την ενίσχυση της μνήμης (Samonina et al., 2002) και για την νευροπροστατευτική επίδρασή της (Guan et al., 2007).

4.5.3 Αρωματικά παράγωγα της προλίνης

4.5.3.1 Cyclo (L-Trp-L-Pro)

Η τρυπτοφάνη-προλίνη 2,5-DKPCyclo (L-Trp-L-Pro) είναι δευτερεύουσας σημασίας 2,5-δικετοπιπεραζίνη σε εκχύλισμα ζυμομυκήτων (DaCosta et al., 2010). Έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Streptomyces sp.* στέλεχος TN58 και φαίνεται να διαθέτει αντικαρκινική δράση κατά δύο θετικών κατά Gram βακτηρίων, του *S. aureus* και του *M. Luteus* (Mehdi et al., 2009). Παρόλο που αρχικά έδειξε δυνατότητες για χρήση στη θεραπεία των καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών (Jamie et al., 2002), αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι ηπατοτοξική (Jamie et al., 2002).

4.5.3.2 Cyclo (L-His-L-Pro)

Η Cyclo (L-His-L-Pro) έχει μελετηθεί περισσότερο από όλες τις απλές 2,5-δικετοπιπεραζίνες. Βρίσκεται σε μια ποικιλία τροφίμων, όπως το κρέας, το σιτάρι, τα αυγά και γαλακτοκομικά προϊόντα με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στα ψάρια και τα προϊόντα ψαριών (>2000pmol/g τροφής). Εμφανίζεται σε επεξεργασμένα τρόφιμα

ύστερα από θερμική επεξεργασία. Τα παράγωγα του cyclo (L-His-L-Pro) έχουν μελετηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων για εκφυλισμό των νευρώνων (Cornacchia et al., 2012). Η Cyclo (L-His-L-Pro) έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί ένα μέρος της προέρχεται από την απελευθέρωση της ορμόνης, θυρεοτροπίνης η οποία έχει συνδεθεί με αρκετές βιολογικές λειτουργίες (Chen et al., 2004).

4.5.3.3 Cyclo (L-Tyr-L-Pro)

Το παράγωγο της τυροσίνης η Cyclo (L-Tyr-L-Pro) είναι δευτερεύουσας σημασίας 2,5-DKP η οποία βρίσκεται στο κακάο (1,0ppm 4,0μmol/kg), όπου η συγκέντρωση σε πικρή γεύση είναι κάτω του κατωφλίου αντίληψης (Stark and Hofman, 2005). Έχει επίσης βρεθεί σε αυτολυόμενο εκχύλισμα ζυμομυκήτων στα 8,7ppm (Da Costa et al., 2010). Έχει μια μεταλλική γεύση στα 190μmol/L (TC) και μια πικρή γεύση στα 480μmol/L (TC) (Stark and Hofman, 2005).

4.5.3.4 Cyclo (L-Phe-L-Pro)

Η cyclo (L-Phe-L-Pro) είναι μια αρωματική 2,5-DKP που βρίσκεται σε μια ποικιλία τροφίμων. Είναι ένα από τα δύο μεγάλα παράγωγα της προλίνης μαζί την cyclo (L-Leu-L-Pro) που βρίσκεται στο προζύμι, στο σιτάρι και στο ψωμί (Ryan et al., 2009). Το οξυγαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 παράγει χαμηλά επίπεδα 2,5-DKP και έχει χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση του σιταριού και οδήγησε σε βελτιωμένη διάρκεια ζωής του ψωμιού. Παρά το γεγονός ότι και οι δύο σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του προζυμιού, η θερμοκρασία βρέθηκε να είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας του σχηματισμού της 2,5-DKP κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ψησίματος (Ryan et al., 2009). Επίσης η cyclo (L-Phe-L-Pro) είναι η δεύτερη μεγάλη 2,5-DKP (36ppm) και βρέθηκε να έχει ιδιαίτερα μεγάλο οργανοληπτικό ενδιαφέρον μεταξύ των δέκα 2,5-DKPs που βρέθηκαν σε μαγειρεμένο βοδινό κρέας. Έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε καβουρδισμένο καφέ μαζί με άλλες έξι 2,5-DKPs (Borthwick and Da Costa, 2015). Η cyclo (L-Phe-L-Pro) έχει μια μεταλλική και πικρή γεύση σε συγκέντρωση 131μmol/L και 1020μmol/L αντίστοιχα. Ωστόσο, σε καβουρδισμένο κακάο η cyclo (L-Phe-L-Pro) ήταν παρούσα σε 15,7ppm (64,3μmol/kg) (Stark and Hofman, 2005). Η απομάκρυνση του κυκλικού διπεπτιδίου από το υπόλειμμα της απόσταξης του αλκοολούχου ποτού awamori (Takaya et al., 2007) έδειξε ότι η cyclo (L-Phe-L-Pro) είχε μια μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της

ελεύθερης ρίζας του υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$) ($64,9\%$ στα $2,5 \times 10^{-3}\text{M}$). Η cyclo (L-Phe-L-Pro) έχει επίσης ταυτοποιηθεί ως ένα δραστικό μόριο που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων, ιδιότητα σημαντική για την παθογένεια ορισμένων βακτηρίων (Park et al., 2006).

4.5.3.5 Cyclo (L-leu-L-Phe)

Το παράγωγο της λευκίνης cyclo (L-leu-L-Phe) είναι μια σημαντική δικετοπιπεραζίνη, η οποία βρίσκεται στο εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση $49,4\text{ppm}$ (Da Costa et al., 2010). Στο κακάο η συγκέντρωσή της όσον αφορά την πικρή γεύση είναι κάτω από το κατώφλι αντίληψης ($12,5\text{ppm}$, $47,9\mu\text{mol/kg}$) (Stark and Hofman, 2005). Είναι παρούσα στο βόειο κρέας, στη μύρα, στο ψωμί (Ryan et al., 2009), στο τυρί τσένταρ, στο κοτόπουλο (Chen et al., 2004), στον καφέ στο κόκκινο κρασί, στο λευκό κρασί και στο βαλσαμικό ξύδι. Έχει μεταλλική γεύση στα $40\mu\text{mol/L}$ (TC) και πικρή γεύση στα $190\mu\text{mol/L}$ (TC) (Stark and Hofman, 2005). Η Cyclo (L-leu-L-Phe) απομονώθηκε από το θαλάσσιο βακτήριο *Sulfitobacter*. Σύμφωνα με έρευνα έχει αντιοξειδωτική δράση ένα επίπεδο χαμηλότερη από τη βιταμίνη E (Furukawa et al., 2012).

4.5.3.6 Cyclo (L-Val-L-Phe)

Η Cyclo(L-Val-L-Phe) είναι μια σημαντική 2,5-DKP η οποία βρίσκεται σε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση $24,3\text{ppm}$ (DaCosta et al., 2010). Στο βόειο κρέας τη βρίσκουμε σε συγκέντρωση $2,0\text{ppm}$ (Chen et al., 2009). Στο κακάο υπάρχει σε συγκέντρωση $14,3\text{ppm}$, $58,0\mu\text{mol/kg}$, κάτω από το κατώφλι αντίληψης όσον αφορά την πικρή γεύση ($\text{DoT} < 0.1$) (Stark and Hofman, 2005). Είναι παρούσα στο ψωμί (Ryan et al., 2009), στο τυρί τσένταρ, στο κοτόπουλο (Chen et al., 2004), στον καφέ, στο βαλσαμικό ξύδι, στο κόκκινο κρασί και στο λευκό κρασί. Έχει μια μεταλλική γεύση στα $1000\mu\text{mol/L}$ (TC) (Stark and Hofman, 2005).

4.5.4 Συμμετρικά αλειφατικά παράγωγα

4.5.4.1 Cyclo (L-Leu-L-Leu)

Η συμμετρική αλειφαντική 2,5-DKP, Cyclo(L-Leu-L-Leu) έχει ανιχνευτεί σε εκχύλισμα κοτόπουλου (Chen et al., 2004) και έχει πικρή γεύση όταν βρίσκεται στο κατώφλι αντίληψης και σε συγκέντρωση 1,2mM(Lietal., 2013). Έχει επίσης απομονωθεί από το θαλάσσιο μικροοργανισμό *Bacillus subtilis* (Lu et al., 2009).

4.6 ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΕΡΟΜΟΝΕΣ

Οι DKPs εμφανίζονται σε μύκητες και φυτά με μέχρι στιγμής άγνωστη λειτουργία. Στο διάτομο *Seminavisrobusta* η cyclo (Pro-Pro) δρα ως φερομόνη που βοηθά στην αναπαραγωγή (Frenkel et al., 2014).

Τα διάτομα είναι μονοκύτταροι, φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που συχνά κυριαρχούν στην πρωτογενή παραγωγή πελαγικής αλυσίδας και υδρόβιων οικοσυστημάτων που ζουν στο βυθό της θάλασσας (Gillard et al, 2013). Είναι μια σημαντική ομάδα ευκαριωτικών μικροφυκών που κατοικούν στο υδάτινο περιβάλλον τα τελευταία 200 εκατομμύρια χρόνια (Stonik, 2015). Παρά τον κεντρικό ρόλο τους στη βιόσφαιρα, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη χημεία της φερομόνης και του κύκλου ζωής τους. Η αύξηση του πληθυσμού τους γίνεται αγενώς χωρίς την ανάγκη αλληλεπίδρασης με τον οργανισμό του ίδιου είδους με σύντομες εκρήξεις. Τα διάτομα είναι τα μοναδικά, μεταξύ των μικροφυκών που η εν λόγω γενετήσια αναπαραγωγή είναι δυνατή μόνο κάτω από ένα σεξουαλικό όριο μεγέθους (sexualsizethreshold, SST).

Το SST ελέγχει την ικανότητα ζευγαρώματος των πτερωτών διατόμων και άμεσες ενδείξεις υποδεικνύουν τη συμμετοχή των φερομονών. Οι φυσιολογικές και οι μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με την σεξουαλική αναπαραγωγή στο *Seminavisrobusta*, μελετήθηκαν, από τον JeroenGillard και τους συνεργάτες του, με στόχο να διαφωτιστεί η χημεία των φερομονών (Gillard et al, 2013).

Σε μια καλλιέργεια σύζευξης αυτών των διατόμων, η αναπαραγωγή εξαρτάται από το φως και ακολουθεί ένα αυστηρό ημερήσιο πρότυπο παραγωγής και αποδόμησης της φερομόνης. Η παραγωγή της φερομόνης και η υποδοχή από τους εταίρους ζευγαρώματος εμφανίζεται μεταξύ 6 και 10 ωρών μετά την εφαρμογή του φωτισμού. Βρέθηκαν η cyclo(L-Pro-L-Pro) και η γνήσια cyclo(D-Pro-D-Pro). Είναι ενδιαφέρον ότι και τα δύο συνθετικά εναντιομερή, εμφάνισαν βιολογική σταθερότητα αλλά σύμφωνα

με ανάλυση με τη χρήση φασματομέτρου κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism C.D), η cyclo(L-Pro-L-Pro) απεκκρίνεται από σεξουαλικά ενεργά κύτταρα (Frenkel et al., 2014).

Για την ανάλυση της DKPs προερχόμενη από το διάτομο *Seminavisrobusta* χρησιμοποιήθηκαν, αέρια χρωματογραφία και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χωρίς να επιτευχθεί διαχωρισμός των εναντιομερών. Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται είναι ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μεθόδους ανάλυσης, μπορούν να οδηγήσουν σε ρακεμοποίηση και παράπλευρες αντιδράσεις (Frenkel et al., 2014).

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μεθόδους ανάλυσης, με τη χρήση χρωματογραφίας υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) επιτεύχθηκε διαχωρισμός εντός 4 λεπτών του χρόνου λειτουργίας με χρήση αμυλόζης τρις (3,5-διμεθυλοφαινυλκαρβαμικό) [amylosetris(3,5-dimethylphenylcarbamate)] ως στατική φάση και 2-προπανόλη / CO₂ (2-propanol/ CO₂) ως κινητή φάση (Frenkel et al., 2014).

Αυτή η πολύ ταχεία χρωματογραφική μέθοδος, σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray ionization (ESI) επέτρεψε τον εναντιομερή διαχωρισμό καθώς και την άμεση ανάλυση του κυκλικού διπεπτιδίου. Η μέθοδος αυτή είναι ένα ισχυρό εργαλείο χρωματογραφίας. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες λειτουργίας, σε σύγκριση με την αέρια χρωματογραφία, μειώνουν τον κίνδυνο ρακεμοποίησης της αναλυόμενης ουσίας καθιστώντας τη μια μέθοδο με υψηλό δυναμικό για την εναντιοεκλεκτική ανίχνευση των θερμοευαίσθητων ουσιών. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της περισσειας, πρόσφατα αποδεσμευμένης φερομόνης και να παρακολουθήσει την ταχεία αποδόμηση των διατόμων. Αυτή η αποδόμηση της φερομόνης μπορεί να θεωρηθεί ως μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την αποφυγή του ζευγαρώματος (Frenkel et al., 2014).

Hcyclo(Pro-Pro) είναι μια φερομόνη η οποία βρίσκεται σε διάφορους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανώτερων φυτών και μυκήτων, όπου απαντάται σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις και λειτουργεί ως αντιβακτηριακός παράγοντας (Gillard et al, 2013).

Πιθανότατα η cyclo(Pro-Pro) είναι βιολογικής προέλευσης δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε ισομερίωση κατά τη διάρκεια της παρασκευής του δείγματος, την αποθήκευση και τη μέτρηση. Παρά ταύτα πρέπει να αξιολογηθεί αν είναι ή όχι παραπροϊόν της βιοσύνθεσης ή αποδόμησης της φερομόνης (Frenkel et al., 2014).

4.7 ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι 2,5-DKPs έχουν εντοπιστεί σε καλλιέργειες θρεπτικών ζυμών που έχουν υποστεί ζύμωση με γαλακτικά βακτήρια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε τρόφιμα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο ως φυσικά συντηρητικά σε τρόφιμα και ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, μειώνοντας την προσθήκη χημικών (Axel et al., 2014). Βρίσκονται επίσης σε μια ποικιλία από φυσικά προϊόντα από μύκητες, βακτήρια, λειχήνες, θαλάσσιους οργανισμούς, στο φυτικό βασίλειο και στα θηλαστικά και θεωρούνται δευτερογενείς μεταβολίτες (Prasad, 1995). Η ικανότητα των μικροοργανισμών για την παραγωγή δικετοπιπεραζινών είναι ευρέως διαδεδομένη και δημοσιευμένα στοιχεία έχουν δείξει ότι περίπου το 90% των Gram-αρνητικών βακτηρίων παράγουν 2,5-DKPs. Οι 2,5-DKPs έχουν επίσης απομονωθεί και από Gram-θετικά βακτήρια (Borthwick, 2012) (De Carvalho and Abraham, 2012).

Ενώ βρίσκονται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών μπορεί να αναμένεται να βρεθούν σε έναν συνεχώς αυξανόμενο αριθμό τροφίμων. Απαντώνται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων και εμφανίζουν μια ποικιλία από αισθητικά αποτελέσματα, όπως είναι το πικρό, το αλμυρό, το στυπτικό, το umami, το αλευρώδες, το φυτικό και το μεταλλικό. Οι 2,5-DKPs, έχουν εντοπιστεί στο βόειο κρέας, στην μπύρα, στο ψωμί, στα αλκοολούχα ποτά, στο κακάο, στο κοτόπουλο, στον καβουρδισμένο καφέ, στο τυρί, στα αποξηραμένα καλαμάρια και στο εκχύλισμα μαγιάς. Συνεισφέρουν στη γεύση σε πολλά τρόφιμα και παρόλο που υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η γεύση των τροφίμων αυτών μπορεί να αυξηθεί εξαιτίας της συνεργιστικής δράση των πουρινών (π.χ. θεοβρωμίνη σε κακάο) (Borthwick and Da Costa, 2015).

4.8 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Ο σχηματισμός των 2,5-DKPs εξαρτάται από τη θέρμανση, κάτω από όξινες συνθήκες. Κατά τη θέρμανση ισογραμμομοριακών ποσοτήτων των αμινοξέων δεν παρήχθησαν κυκλικά διπεπτίδια. Ωστόσο, θέρμανση άκυκλων διπεπτιδίων κάτω από όξινες συνθήκες, παρήγαγαν τα αντίστοιχα κυκλικά διπεπτίδια. Επίσης θέρμανση ενός τριπεπτιδίου όπως του Ala-Leu-Gly οδήγησε στο σχηματισμό της cyclo (L-Ala-L-Leu).

Είναι διαδεδομένες σε επεξεργασμένα τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες που παράγονται ως υποπροϊόντα της θερμικής αντίδρασης που συνοδεύει την αντίδραση Maillard, στην οποία οφείλεται το άρωμα και η γεύση πολλών επεξεργασμένων τροφίμων. Η αντίδραση Maillard είναι η θερμική αντίδραση των αμινοξέων/ πεπτιδίων με αναγωγικά σάκχαρα/υδατάνθρακες και οδηγεί σε ένα πλήθος ενώσεων που έχουν ιδιαίτερη γεύση. Αποτελούν επίσης προϊόντα της μη ενζυμικής αμαύρωσης, η οποία συμβαίνει κατά τη διαδικασία του ψησίματος του κρέατος και του ψωμιού. Το δραστικό καρβονύλιο του σακχάρου/υδατάνθρακα αντιδρά με την αμινομάδα του αμινοξέος/πεπτιδίου και σχηματίζει ένα πολύπλοκο μείγμα υπεύθυνο για ένα ευρύ φάσμα αρωμάτων και γεύσεων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επιταχυνθεί υπό αλκαλικές συνθήκες, καθώς οι αμινομάδες αποπρωτονιώνονται και ως εκ τούτου αποκτούν αυξημένη νουκλεοφιλικότητα. Ο τύπος του αμινοξέος/ πεπτιδίου και ζαχάρου/υδατάνθρακα καθορίζει τη γεύση που προκύπτει. Αυτή η αντίδραση είναι η βάση της αλμυρής αρωματικής ύλης στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η απόδοση σε 2,5-DKPs, που σχηματίζονται από την αντίδραση των πεπτιδίων με αναγωγικά σάκχαρα είναι παρόμοια με εκείνη που λαμβάνεται από τη θερμική παραγωγή των 2,5-DKPs από τα πεπτίδια χωρίς την παρέμβαση άλλων αντιδρώντων (Borthwick and Da Costa, 2015).

Υπάρχουν τέσσερις τρόποι σχηματισμού των 2,5-DKPs στα τρόφιμα. Μύκητες, ζύμες και βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθούν κατά την παραγωγή και αποθήκευση των τροφίμων είναι ικανά να παράξουν τις 2,5-DKPs. Οι 2,5-DKPs βρίσκονται επίσης στα τρόφιμα, ως φυσικά προϊόντα που έχουν παραχθεί από ζύμες που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση στη ζυθοποιία, στα οξυγαλακτικά βακτήρια για τη ζύμωση του ψωμιού και από μύκητες (π.χ. *Penicillium roqueforti*) που

χρησιμοποιούνται στην ωρίμανση του μπλε τυριού. Επιπλέον βρίσκονται ως προϊόντα αποικοδόμησης ορισμένων πρόσθετων για τρόφιμα, όπως το τεχνητό γλυκαντικό, ασπαρτάμη ή το αντιβιοτικό Amoxicillin που προστίθεται στις ζωοτροφές και καταλήγει στο κρέας. Ωστόσο, η κύρια οδός για την εμφάνιση των 2,5-DKPs στα τρόφιμα, είναι πιθανώς μέσω σχηματισμού τους από πεπτίδια και πρωτεΐνες, με χημική αντίδραση, κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων (Borthwick, 2012).

Σύμφωνα με αναφορά των Borthwick and Da Costa, (2015) στον Πίνακα 4.8.1 αναφέρονται 30 κυκλικά διπεπτίδια καθώς και η παρουσία τους σε Τρόφιμα και Ποτά.

Πίνακας 4.8.1 Κυκλικά Διπεπτίδια που απαντώνται σε τρόφιμα και ποτά (Borthwick and Da Costa, 2015)

Κυκλικά διπεπτίδια	Τρόφιμα και ποτά
Cyclo(L-Ala-L-Val)	Ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, ψητό χοιρινό, βαλσάμικο ξύδι, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Ala-L-Pro)	Βόειοκρέας, μπύρα, ψωμί, τυρί cheddar, κοτόπουλο, εκχύλισμαβύνης, ψητόχοιρινό, βαλσάμικοξύδι, κόκκινοκρασί, λευκόκρασί, εκχύλισμαζύμης, κακάο
Cyclo(Gly-L-Pro)	Βόειο κρέας, ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Ala-L-Leu)	Ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, ψητό χοιρινό, λευκό κρασί, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Val-L-Val)	Βόειο κρέας, ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(Gly-L-Leu)	Βόειο κρέας, ψωμί, κακάο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Pro-L-Val)	Οινοπνευματώδεςποτό Awamori, βόειοκρέας, μπύρα, ψωμί, τυρί cheddar, κοτόπουλο, κακάο,καφέ,

	εκχύλισμακαλαμποκιού, εκχύλισμαβύνης, ψητόχοιρινό, σαλάμι, βαλσάμικοξύδι, κρασί port, κόκκινοκρασί, λευκόκρασί, εκχύλισμαζύμης,ελληνικόγιαούρτι
Cyclo(L-iLe-L-Pro)	Οινοπνευματώδεςποτό Awamori, βόειοκρέας, μπύρα, κοτόπουλο, κακάο, καφέ, ψωμί, εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Pro-L-Pro)	Αμύγδαλα, τοβόειοκρέας, μπύρα, ψωμί, τυρίτσένταρ, τυρί Comte κοτόπουλο, κακάο, καφέ, εκχύλισμακαλαμποκιού, εκχύλισμαβύνης, τοκόκκινοκρασί, βαλσάμικοξύδι, τοεκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Leu-L-Pro)	Αμύγδαλα, οινοπνευματώδεςποτό Awamori, βόειοκρέας, μπύρα, ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, καφέ, εκχύλισμακαλαμποκιού, εκχύλισμαβύνης, ψητόχοιρινό, γιαπωνέζικοποτό sake, σαλάμι, βανίλια, βαλσάμικοξύδι, port κρασί , κόκκινοκρασί, λευκόκρασί, εκχύλισμαζύμης, ελληνικόγιαούρτι
Cyclo(L-iLe-L-Leu)	Βόειο κρέας, μπύρα, κοτόπουλο, καφές, κακάο, λευκό κρασί, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(Gly-L-Ser)	Κοτόπουλο
Cyclo(L-Leu-L-Leu)	Κοτόπουλο
Cyclo(L-Ala-L-Met)	Εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(Gly-L-Met)	Εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Ala-L-Phe)	Βόειο κρέας, ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, κόκκινο κρασί, λευκό κρασί, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Met-L-Val)	Κοτόπουλο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Leu-L-Met)	Κοτόπουλο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-iLe-L-Met)	Κοτόπουλο, εκχύλισμα ζύμης, βόειο κρέας

Cyclo(L-Phe-L-Val)	Βόειοκρέας, ψωμί, τυρί cheddar, κοτόπουλο, κακάο, καφέ, ψητόχοιρινόκρέας, ξύδιμπαλσάμικο, κόκκινοκρασί, λευκόκρασί, εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Met-L-Pro)	Βόειοκρέας, μύρα, τυρί cheddar, κοτόπουλο, τοκακάο, εκχύλισμαβύνης,ψητόχοιρινό, βαλσάμικοξύδι, λευκόκρασί, εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Phe-L-Pro)	Οινοπνευματώδεςποτό Awamori ,βόειοκρέας, μύρα, ψωμί, τυρί cheddar, κοτόπουλο, κακάο,καφέ, εκχύλισμακαλαμποκιού, ψητόχοιρινό, κόκκινοκρασί, λευκόκρασί,βαλσάμικοξύδι, εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Leu-L-Phe)	Οινοπνευματώδεςποτό Awamori , βόειοκρέας, μύρα, ψωμί, τυρί cheddar, κοτόπουλο, κακάο,καφέ, ψητόχοιρινό, κόκκινοκρασί, λευκόκρασί, βαλσάμικοξύδι, εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Met-L-Met)	Εκχύλισμαζύμης
Cyclo(L-Met-L-Phe)	Κοτόπουλο, το εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-His-L-Pro)	Κρέας, σιτάρι, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια
Cyclo(L-Pro-L-Tyr)	Ψωμί, κοτόπουλο, κακάο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Phe-L-Phe)	Βόειο κρέας, τυρί τσένταρ, κοτόπουλο, κακάο, λευκό κρασί, εκχύλισμα μαγιάς
Cyclo(L-Pro-L-Trp)	Βόειο κρέας, κοτόπουλο, κακάο, εκχύλισμα ζύμης
Cyclo(L-Leu-L-Trp)	Κοτόπουλο, κακάο, εκχύλισμα ζύμης

4.9 ΩΦΕΛΙΜΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Οι 2,5-DKPs έχουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως αντικαρκινικές, αντιαλβινικές, αντιμυκητιασικές και αντιβακτηριακές. Τα τελευταία χρόνια, ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στις αντιαρρυθμιστικές, αντιυπερτασικές και νευροπροστατευτικές δράσεις των 2,5-DKPs. Οι δράσεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί και εισηγείται η

δυνατότητα χρησιμοποίησης αυτών των κυκλικών διπεπτιδίων για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson και η σκλήρυνση κατά πλάκας. Σύμφωνα με μελέτες, η παρουσία ακόρεστων ομάδων στο σκελετό των 2,5-DKPs διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στις προστατευτικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων (Cornacchia et al., 2012).

Από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, τα κυκλικά διπεπτίδια που συντέθηκαν, βρέθηκαν να είναι απαλλαγμένα από τυχόν ξένες ουσίες, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιολογικές μελέτες με στόχο την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές οι 2,5-DKPs έδειξαν σημαντική δραστηριότητα κατά του όγκου, προκαλώντας αναστολή των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Επίσης μπορούν να αναστείλουν τις κυτταρικές γραμμές του καρκινώματος του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας και είναι δραστικές εναντίον του καρκίνου του μαστού (VanderMerweetal., 2008)

Σύμφωνα με έρευνα, επιβεβαιώθηκε η αντιμυκητιασική δράση τριών DKPs, των Cyclo (Leu-Pro), Cyclo (Phe-Ala) και Cyclo (Ala-Pro), οι οποίες εξήχθησαν από το ενδόφυτο της αμπέλου, *Altemariaalternata* έναντι του *Plasmoparaviticola* μύκητα από τον οποίο προκαλείται ο περονόσπορος (Musetti et al., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΕΛΙΑ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελιά ή ελαιόδενδρο ή λιόδενδρο είναι αειθαλές, αιωνόβιο καρποφόρο δέντρο και ανήκει στην βοτανική οικογένεια των ελαιοειδών *Oleaceae*. Στο γένος *Olea*, το οποίο ανήκει στην παραπάνω οικογένεια, έχει δυο παραλλαγές: 1) η άγρια ελιά (*Olea europaea* var. *Oleaster*) και 2) η ήμερη ελιά (*Olea europaea* var. *Sativa*). Μία επικρατούσα άποψη είναι ότι η ήμερη ελιά αποτελεί εξέλιξη της άγριας ελιάς. Φυσικά οι ποικιλίες και οι τύποι της ελιάς είναι πάρα πολλοί και δημιουργήθηκαν είτε από την προσαρμογή του δέντρου στις ειδικές κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες του κάθε τόπου, είτε σε μεταλλαγές και στο φυσικό πολλαπλασιασμό του, είτε στον άνθρωπο. (Richard Fooks., (2002) «Το βιβλίο της ελιάς», 15).

5.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ελιάκαλλιεργείτο στην Αρχαία Ελλάδα από το 3.500 π.Χ. και πιθανότατα κατάγεται από τον χώρο της Ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την Αθηνά στην Ακρόπολη. Στη Νίσυρο, την Κύμη και την Σαντορίνη, βρέθηκαν απολιθωμένα φύλλα της Ευρωπαϊκής Ελέας που χρονολογούνται 50.000 χρόνια. Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιεργήσε την ελιά στον Ευρωπαϊκό Μεσογειακό χώρο. Τη μετέφεραν είτε Έλληνες άποικοι, είτε Φοίνικες έμποροι. Το ελαιόλαδο, το οποίο προέρχεται από την ελιά, χρησιμοποιήθηκε από τους Αρχαίους Έλληνες για την αντιμετώπιση της χρόνιας δυσκοιλιότητας και έλκους στομάχου, σαν ανασταλτικό πόνου, σε εξαρθρώσεις, σε κατάγματα και σε πληγές. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε για τη βελτίωση της ομορφιάς και της υγείας των μαλλιών και του δέρματος και μάλιστα οι αθλητές το θεώρησαν ιδανικό για τη βελτίωση της καρδιαγγειακής τους κυκλοφορίας. Φάνηκε χρήσιμο στη διατήρηση λευκών δοντιών και στη θεραπεία των ούλων. Επιδρά ευνοϊκά στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού αγγειακού συστήματος, στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, στην κανονική ανάπτυξη των παιδιών και σαν αντίδοτο σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων. Όλες οι παραπάνω

εφαρμογές ήταν μέχρι και τον 6^ο αιώνα π.Χ. Έπειτα, ανακάλυψαν ότι αποτελεί και ένα από τα ιδανικότερα είδη διατροφής. Το ελαιόδεντρο θεωρήθηκε ιερό δέντρο και όπως αναφέρει και ο Όμηρος αποτελεί το «χρυσάφενιο υγρό»(Κυριτσάκης, 1993,).

5.3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΜΑ

Η ελιά μπορεί να καλλιεργηθεί μόνο στις εύκρατες περιοχές του Βόρειου και Νότιου ημισφαιρίου. Αυτό οφείλεται στις ειδικές κλιματικές της απαιτήσεις. Η ελιά σήμερα καλλιεργείται στη λεκάνη της Μεσογείου, από όπου είναι και η καταγωγή της, στο Δέλτα του Νείλου, στις ακτές της Συρίας και του Λίβανου, στην Κύπρο, στην Τουρκία, στην Ελλάδα, στη Νότια Ιταλία και Γαλλία, στην Ισπανία και στις απέναντι ακτές της Αφρικής, καθώς και σε ορισμένες περιοχές του Πακιστάν και της Ιαπωνίας. Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στη Σαμοθράκη, Χαλκιδική, Λήμνο, Μυτιλήνη, Χίο, Σάμο, Ικαρία, Ρόδο, Κρήτη, Πελοπόννησο, Ιόνια νησιά, Αιτωλοακαρνανία, Αττική, Φθιώτιδα, Φωκίδα, Εύβοια και Πήλιο. (Richard Fooks. Εισαγωγή. «Το βιβλίο της ελιάς», 9).



Σχήμα 5.3.1: Ελληνικός χάρτης παραγωγής ελιάς

Το ελαιόδεντρο καλλιεργείται μόνο στα εύκρατα κλίματα και ο λόγος που η ζώνη καλλιέργειάς του είναι περιορισμένη είναι γιατί έχει ειδικές απαιτήσεις σε θερμοκρασία και υγρασία. Ευδοκίμει σε περιοχές με υψόμετρο μέχρι 900 μέτρα, σε θερμοκρασίες από -3° C έως 36° C και σε ελαφρώς αλκαλικά εδάφη. Γενικά, είναι ευαίσθητη στους παγετούς αλλά αυτό εξαρτάται και από την ποικιλία. Η θερμοκρασία και η υγρασία της ατμόσφαιρας, η σύσταση και η υγρασία του εδάφους επηρεάζουν τη βλάστηση, την άνθηση, το δέσιμο, τη σύσταση και την ωρίμανση του καρπού. Έχει ανάγκη κρύου το χειμώνα για το σχηματισμό των ανθοφόρων ματιών της και χρειάζεται μία μακρόχρονη θερμή περίοδο για την ωρίμανση του καρπού. (Richard Fooks. Εισαγωγή. «Το βιβλίο της ελιάς», 16-17).

5.4 ΔΟΜΗ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΟΥ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

5.4.1 Ελαιόδεντρο

Ο κορμός του ελαιοδέντρου διακλαδίζεται στους βραχίονες, αυτοί στα κλαδιά και τα κλαδιά στους βλαστούς, οι οποίοι χωρίζονται σε:

- **Ξυλοφόρους**, που δίνουν φύλλα και βλασταράκια και εξελίσσονται σε κλαδιά και πιθανόν σε βραχίονες.
- **Ανθοφόρους**, που δίνουν άνθη και καρπούς τον επόμενο χρόνο από την καλλιέργειά τους.
- **Μεικτούς**, που δίνουν βλάστηση, άνθη και καρπούς.
- **Λαίμαργους**, που δίνουν μόνον υπέρμετρα ανεπτυγμένα βλασταράκια χωρίς καρπούς.

(Richard Fooks. Γενικά. «Το βιβλίο της ελιάς», 19).

Οι ελιές μπορεί να είναι σφαιρικές ή επιμήκεις. Το μέγεθος και το σχήμα διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και μπορεί να είναι είτε ωοειδείς, είτε σε σχήμα καρδιάς, είτε αχλαδιού.

5.4.2 Ελαιόκαρπος

Ο ελαιόκαρπος έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (2 – 6% w/w), υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι (10 – 30% w/w). Τα γενικά χαρακτηριστικά του ελαιοκάρπου είναι τα εξής:

- Μήκος: 1 – 3 cm
- Διάμετρος: 1 – 2 cm
- Βάρος: 0,5 – 15g ή και περισσότερο
- Η σάρκα αποτελεί το 60 – 90% του συνολικού βάρους του ελαιοκάρπου.
- Το κουκούτσι αποτελεί το 10 – 40% του συνολικού βάρους.
- Το έμβρυο αποτελεί το 1 – 2% του συνολικού βάρους.

Ο καρπός της ελιάς αποτελείται από το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο (πυρήνας, κουκούτσι). Το **εξωκάρπιο** αποτελείται από το επικάρπιο (φλοιός) και την επιδερμίδα και το **μεσοκάρπιο** (σάρκα ή πούλπα) που αντιστοιχεί στο 65 – 83% του συνολικού βάρους. Το **ενδοκάρπιο**, το οποίο περιέχει το ενδοσπέρμιο και το κουκούτσι, αντιστοιχεί στο 13 – 30% του συνολικού βάρους.(Kailis and Harris, 2007).

5.4.3 Ποικιλίες για ελαιοποίηση

Τα χαρακτηριστικά τα οποία κάνουν μία ποικιλία ελιάς κατάλληλη για ελαιοποίηση είναι η σταθερότητα και η ποσότητα της καρποφορίας, η ποιότητα του λαδιού, η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του δέντρου με μοσχεύματα και η ανθεκτικότητα σε αρρώστιες και εχθρούς. Το πιο σημαντικό, όμως από τα χαρακτηριστικά είναι η παραγωγικότητα, δηλαδή η απόδοση σε λάδι. Οι σημαντικότερες ποικιλίες είναι:

- Αγουρομανακολιά (*Olea europaea* var. *ovalis*)
- Αδραμυτινή (*Olea europaea* var. *media subrotunda*)
- Βαλανολιά (*Olea europaea* var. *pyriformis*)
- Κορωνέικη (*Olea europaea* var. *mastoides* / *microcarpa*)
- Κουτσουρελιά (*Olea europaea* var. *microphylla*)

- ΛιανολιάΚέρκυρας (*Olea europaea* var. *craneomorpha*)
- Μεγαρίτικη (*Olea europaea* var. *argentata*)
- Μυρτολιά (*Olea europaea* var. *microcarpa subrotunda*)
- ΤσουνάτηήΜατσολιά (*Olea europaea* var. *mamilaris*)
- Μαυρελιά ή Μουρατολιά ή Μεθωνιά

(Richard Fooks. 27 - 34).

5.4.4 Επιτραπέζιες ποικιλίες

Για αυτήν την κατηγορία, εκτός από την παραγωγικότητα, τη συμπεριφορά, την προσαρμογή στις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ανθεκτικότητα στις αρρώστιες, τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού του δέντρου με μοσχεύματα, πρέπει να υπολογίζεται και η ποιότητα του καρπού, δηλαδή η οργανοληπτική αξία και η σύνθεση της σάρκας, η αναλογία σάρκας – πυρήνα, η ευκολία αποκόλλησης του πυρήνα, η συμπεριφορά στην επιθυμητή βιομηχανική επεξεργασία, επίσης και το μέγεθος του καρπού.

Οι σημαντικότερες ποικιλίες είναι:

- Αδρόκαρπη
- Βασιλικάδα
- Καλαμών
- Καρολιά
- Καρυδολιά
- Κολυμπάδα
- Κονσερβολιά
- Στρογγυλολιά

(Richard Fooks. Ποικιλίες επιτραπέζιες. «Το βιβλίο της ελιάς», 35 - 40).

5.4.5 Μεικτές ποικιλίες

Οι μεικτές ποικιλίες έχουν μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη της εντατικής ελαιοκαλλιέργειας. Η αξιολόγησή τους δεν παίρνει μόνο υπ' όψιν τον όγκο του καρπού, αλλά και την αναλογία σάρκας – πυρήνα και την οργανοληπτική αξία. Στην

ουσία οι ποικιλίες αυτές είναι για ελαιοποίηση και μόνο περιστασιακά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιτραπέζιες. Οι σημαντικότερες μεικτές ποικιλίες είναι:

- Αμυγδαλολιά (*Olea europaea* var. *amygdaliformis*)
- Θρουμπολιά ή Χοντρολιά (*Olea europaea* var. *media oblonga*)
- Κοθρέικη (*Olea europaea* var. *minor rotunda*)
- Ματολιά

(Richard Fooks. Ποικιλίες μεικτές. «Το βιβλίο της ελιάς», 41 - 44).

5.4.6 Επιθυμητά χαρακτηριστικά

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την παραγωγή επιτραπέζιας μαύρης ελιάς παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω Πίνακα:

Πίνακας 5.4.6.1 Παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στην επιλογή ποικιλιών κατάλληλων για την παραγωγή επιτραπέζιων ελαιών.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
Μέγεθος και σχήμα	Μεσαίο προς μεγάλο, 2-6g. Το μέγεθος θα πρέπει να είναι γενικά ομοιόμορφο. Το σχήμα θα πρέπει να είναι ομοιόμορφο και να ποικίλει από σφαιρικό μέχρι ελλειπτικό, εξαρτώντας την ποικιλία.
Αναλογία σάρκας - πυρήνα	Η ιδανικότερη αναλογία θα πρέπει να είναι περίπου 5:1. Παρ' όλα αυτά, το μικρότερο ποσοστό για τις μαύρες ελιές είναι 3:1. Η ποιότητα μειώνεται για τις μαύρες ώριμες ελιές που παραμένουν στο δέντρο για να αφυδατωθούν (συρρικνωθούν).
Απόσπαση της σάρκας από τον πυρήνα	Η εύκολη απόσπαση της σάρκας από τον πυρήνα είναι επωφελής για τη βρώση και την αποπυρήνωση.

Υφή της σάρκας	Η υφή της σάρκας δεν πρέπει να είναι κοκκώδης και ινώδης. Οι ελιές θα πρέπει να είναι απαλλαγμένες από εσωτερική φθορά της σάρκας, καθώς και από αμαύρωση εξ' αιτίας προσβολής ή περιβαλλοντικού στρες.
Σταθερότητα	Οι ελιές θα πρέπει να συγκομίζονται, έτσι ώστε να είναι αρκετά σταθερές για να αντιστέκονται στη φθορά κατά τη συγκομιδή και το – μετά τη συγκομιδή – χειρισμό.
Χρώμα σάρκας και μεμβράνης	Οι ελιές θα πρέπει να έχουν τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται για συγκεκριμένη μέθοδο επεξεργασίας. Η μεμβράνη της ελιάς θα πρέπει να είναι λεπτή, (fineanddelicate).
Μέγεθος, σχήμα και επιφάνεια πυρήνα	Ο ελαιόκαρπος θα πρέπει να έχει έναν μικρό πυρήνα που θα είναι στρογγυλός / ελλειπτικός και λείος, χωρίς κοφτερές προεξοχές, καθώς και σάρκα που θα αποσπάται εύκολα από τον πυρήνα.
Συνολική εμφάνιση	Οι ελιές θα πρέπει να είναι καθαρές εξωτερικά, χωρίς πληγές ή ελαττώματα.

5.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗ ΜΑΥΡΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Όταν ο άνθρωπος ανακάλυψε την ελιά ως είδος διατροφής, δεν γνώριζε τις διαδικασίες επεξεργασίας και εκπίκρανσής της. Την θεωρούσαν διατροφικό εποχικό είδος, καθώς η κατανάλωσή της γινόταν μόνο την περίοδο που ωρίμαζαν και ήταν βρώσιμες. Ασφαλώς, λοιπόν, οι πρώτες ελιές που χρησιμοποιήθηκαν ως βρώσιμες ήταν πιθανότατα οι θρούμπες ή σταφιδολιές, που ωριμάζουν με φυσικό τρόπο πάνω στο δέντρο. Για τον λόγο όμως, ότι οι ελιές δεν έχουν την ικανότητα να διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο άνθρωπος και ο πολιτισμός εξελίχθηκαν και βρήκαν τρόπους να καλλιεργούν, να επεξεργάζονται να αποθηκεύουν και να συντηρούν τις επιτραπέζιες ελιές.(Δέρβα,2006)

Οι ελιές από την φύση τους είναι πολύ πικρές και όχι εδώδιμες, έτσι λοιπόν η επεξεργασία των επιτραπέζιων ελαιών περιλαμβάνει εκτός των άλλων και την διαδικασία μετατροπής των πικρών , μη βρώσιμων ελαιών σε βρώσιμες, έτοιμες προς

κατανάλωση. Αυτή είναι και η διαδικασία της εκπίκρυνσης κατά την οποία απομακρύνεται ένα σημαντικό μέρος της ελευρωπαΐνης, που βρίσκεται στις ελιές και οφείλεται για την πικράδα αυτή(KailisandHarris, 2007).

Οι πιο γνωστός παραδοσιακός τρόπος εκπίκρυνσης, από τα αρχαία κιόλας χρόνια, γίνεται με την χρήση νερού. Είναι ο τρόπος που έχει επιβιώσει ακόμα και στις μέρες μας καθώς βρίσκει εφαρμογή και στην οικοτεχνική παραγωγή. Στην περίπτωση λοιπόν αυτή, ο ελαιόκαρπος περνάει από συνεχείς εκπλύσεις με νερό για 10-15 μέρες, μέχρις ότου να είναι εδώδιμες. Μόλις τελειώσουν οι εκπλύσεις γίνεται η προσθήκη διαλύματος χλωριούχου νατρίου(αλάτι) σε συνδυασμό με οποιοδήποτε άλλο συμπληρωματικό υλικό διατήρησης των ελαιών (ελαιόλαδο, ξύδι, μπαχαρικά, βότανα κτλ). Με τον καιρό, η τελική, εξισορροπημένη συγκέντρωση του αλατιού πρέπει να είναι 6-7% w/v. Παρά την απήχηση και την απλότητα της, η μέθοδος αυτή δεν εξυπηρετεί σε βιομηχανικό επίπεδο εξαιτίας της πολύ μεγάλης κατανάλωσης νερού και έτσι με τον καιρό βρέθηκαν άλλοι μέθοδοι, πιο «εκσυγχρονισμένοι»(KailisandHarris, 2007).

Μία άλλη παραδοσιακή μέθοδος, πιο εξελιγμένη, είναι η χρήση ασβέστηκαι στάχτης, η οποία έγινε γνωστή σε πολλούς μεσογειακούς λαούς και εξελίχθηκε με τον καιρό. Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, έτσι και εδώ, οι ελιές παραμένουν για 10-15 μέρες μέσα σε διάλυμα ασβέστη και στάχτη (το οποίο ανανεώνεται συχνά) για να γίνουν εδώδιμες. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την προσθήκη αλατιού σε τελική συγκέντρωση 6 -7% w/v.

Τέλος, η παραδοσιακή μέθοδος, που αργότερα προσαρμόστηκε για να εφαρμόζεται και στην βιομηχανική παραγωγή ελαιών, είναι η άλμη. Στην μέθοδο αυτή οι μαύρες ελιές ζυμώνονται από την πρώτη στιγμή σε άλμη, η οποία είναι και το μοναδικό υγρό απόβλητο που παράγεται. Οι φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη είναι ο χαρακτηριστικός εμπορικός τύπος ελαιών στις ανατολικές χώρες της Μεσογείου και στην Ελλάδα. Οι ελιές θα πρέπει να είναι ώριμες, χρώματος από ιώδες μέχρι και μελανοϊδές και η συλλογή τους να γίνεται πριν από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα. Οι ελιές τοποθετούνται σε άλμη συγκέντρωσης 8-10% w/v και κατά την διάρκεια της ζύμωσης εξασφαλίζονται συνθήκες απουσία αέρα(αναερόβιες). Η ζύμωση διαρκεί αρκετό χρόνο, επειδή η διάχυση των ζυμωμένων συστατικών μέσω της επιδερμίδας

του καρπού είναι αργή, αφού οι ελιές δεν έχουν υποστεί επεξεργασία με καυστικό νάτριο πρώτα. Με αυτόν τον τρόπο, η ελευρωπαϊνή (υδατοδιαλυτό συστατικό) μεταφέρεται από τον καρπό στην άλμη και η εκπίκρυνση επιτυγχάνεται με την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 8-12 μήνες (Δέρβα,2006).

5.6 ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΣΤΙΣ ΕΛΙΕΣ

Οι ελιές καλλιεργούνται στην περιοχή της Μεσογείου για τουλάχιστον 5.000 χρόνια και η Ελλάδα κατέχει μία σημαντική θέση ως ελαιοπαραγωγός χώρα, παράγοντας 2,5 εκατομμύρια τόνους ελιάς ετησίως. Οι ελιές είναι καρποί πλούσιοι σε βιοδραστικά συστατικά, γεγονός που συνδέεται άρρηκτα με την υψηλή διατροφική τους αξία. Είναι σημαντική πηγή φυσικών συστατικών όπως φαινολών, φλαβονοειδών, τερπενίων κλπ. τα οποία διαθέτουν σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (Boskouetal., 2006). Επίσης περιέχουν υψηλά ποσοστά μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, σημαντικές ποσότητες βιταμίνης A και καροτενοειδών, βιταμίνες B1, B6 και B12, β-τοκοφερόλες και α-τοκοτριενόλες και σημαντικά ιχνοστοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, φωσφόρο, σίδηρο και μαγνήσιο.

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα από τα πιο σημαντικά παραδοσιακά ζυμώμενα τρόφιμα και ένα από τα σημαντικότερα εξαγωγίμα προϊόντα στην Ελλάδα. Οι επιτραπέζιες ελιές έχουν υποστεί συγκεκριμένη επεξεργασία η οποία περιλαμβάνει τα στάδια της εκπίκρυνσης και της γαλακτικής ζύμωσης, οι οποίες αποσκοπούν στην βελτίωση της γεύσης και στην αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Κατά την φάση της ζύμωσης παράγονται οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες, η ανίχνευση των οποίων είναι ιδιαίτερος σημαντική δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές είναι βιοδραστικές και ως εκ τούτου θα ενισχύσουν το εμπορικό και διατροφικό ενδιαφέρον για τα ζυμώμενα προϊόντα στην αγορά και ειδικά των επεξεργασμένων ελιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ΟΙΝΟΣ

6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΟΙΝΟ

Ο οίνος αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα ζυμούμενα αλκοολούχα ποτά με την ιστορία του να ξεπερνά τα 8000 χρόνια. Στις παραδοσιακά οινοπαραγωγικές χώρες και περιοχές της Ευρώπης, ο οίνος ήταν εύκολα διαθέσιμος και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των διατροφικών συνηθειών πολλών λαών, ενώ εδώ και μερικές δεκαετίες, το αλκοολούχο αυτό ποτό έχει γίνει μέρος της διατροφής ακόμα και σε χώρες που δεν έχουν ενδογενή οινοποιητική βιομηχανία. Παρά τη μακραίωνη ιστορία του οίνου, η μελέτη των φυσικοχημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα κατά την οινοποιητική διαδικασία και η μετατροπή της οινοποιητικής διαδικασίας από τεχνική σε επιστήμη έγινε μόλις πριν λίγες δεκαετίες, τη δεκαετία του '50 συγκεκριμένα, από τους χημικούς Emile Peynaud και Jean Ribéreau-Gayon στην περιοχή του Μπορντώ και των καθηγητών Jaulmes και Flanzy στο Μονπελιέ (Larousse., 2005)

Η σύσταση του οίνου περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο νερό (86,7%) και αιθανόλη (11,2%), ενώ σε μικρότερες ποσότητες απαντούν οργανικά οξέα (0,5%), πτητικές ενώσεις (0,5%), σάκχαρα, βιταμίνες, αζωτούχες ενώσεις και ανόργανα συστατικά (1%). Τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου είναι αυτά που καθορίζουν και την ποιότητά του, η οποία ανεξάρτητα από την προέλευσή του, το στυλ ακόμα και το χρώμα του, εξαρτάται πάντα από την αμπελοοινική περιοχή, ωστόσο και ο παράγοντας άνθρωπος παίζει σπουδαίο ρόλο αφού είναι αυτός που με την ποιότητα της δουλειάς του από το αμπέλι μέχρι την οίναποθήκη, με τις καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και με τις οινοποιητικές τεχνικές που θα εφαρμόσει, έχει τη δυνατότητα να μετουσιώσει την πρώτη ύλη σ' ένα ποιοτικό οίνο (Larousse., 2005).

Η διαδικασία παραγωγής του οίνου ονομάζεται οινοποίηση και περιλαμβάνει το σύνολο των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη μετατροπή των νωπών σταφυλιών ή του γλεύκους σε οίνο. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης τα σάκχαρα του γλεύκους (γλυκόζη και φρουκτόζη) μετατρέπονται με τη βοήθεια των ζυμομυκήτων σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα σε περίπου ίσες αναλογίες, ενώ απελευθερώνεται και θερμότητα, σύμφωνα με την Αντίδραση 1.



Συμπληρωματικά σχηματίζονται μικρές ποσότητες και άλλων προϊόντων όπως γλυκερόλη και άλλες ανώτερες αλκοόλες, οξικό και άλλα πτητικά λιπαρά και μη οξέα, ενώ τέλος ορισμένες αλκοόλες μετατρέπονται σε εστέρες που συμβάλλουν στην ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου (Grainger and Tattersall , 2005).

6.2. ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΕΣ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣ

Η προέλευση των 2-5 DKPs στους οίνους δεν είναι απολύτως γνωστή. Σύμφωνα με έρευνες έχει αποδειχθεί ότι προέρχονται από πεπτίδια που βρίσκονται στη φύση, αλλά δεν διευκρινίστηκε εάν έχουν σχηματιστεί από κυκλοποίηση απλών διπεπτιδίων ή από τον κατακερματισμό πολυπεπτιδίων τα οποία στη συνέχεια κυκλοποιήθηκαν. Με βάση βιβλιογραφικές αναφορές μπορούν να παραχθούν σε προηγούμενα βήματα πριν από τη ζύμωση του γλεύκους κατά την ωριμότητα του σταφυλιού. Θα μπορούσε να είναι μια αντίδραση επικοινωνίας των φυτών με τους μικροοργανισμούς. Οι 2-5 DKPs έχουν εντοπιστεί σε τρόφιμα και ποτά και σε κάθε περίπτωση προσδίδουν μια μεταλλική πικρή γεύση, όπως στην περίπτωση της μύρας και της σκόνης από κακάο (Marineaetal, 2013).

Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να δοκιμαστεί τόσο η δυνατότητα εκχύλισης καθώς και η δυνατότητα δημιουργίας συμπληρωματικών 2-5 DKPs in vitro. Πράγματι, όπως διάφοροι συγγραφείς προτείνουν, είναι πιθανόν να δημιουργούνται από πρόδρομες ουσίες, οι οποίες σε γενικές γραμμές μπορεί να είναι διπεπτίδια. Σε συνθήκες υψηλής ενέργειας έγιναν πειράματα για να καταγραφεί η συμπεριφορά τους. Από τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν τα μόρια αυτά είναι γενικά σταθερά και από τη στιγμή που έχουν δημιουργηθεί είναι χημικά αδρανή χωρίς περαιτέρω υποβάθμιση. Είναι σχετικά σταθερές ουσίες στις συνθήκες πριν από την εκχύλιση των οίνων. Η σύνθεση των κυκλικών πεπτιδίων από τα γραμμικά πεπτίδια μπορεί να ξεκινήσει από θερμότητα ή από άλλες πηγές ενέργειας, όπως τα ηλεκτρικά πεδία ή με τη χρήση υπερήχων ή με ένα συνδυασμό όλων των προαναφερθέντων τεχνικών (Marineaetal, 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΝΤΙΚΕΪΜΕΝΟ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPs) είναι κυκλικά διπεπτίδια μικρού ΜΒ. Δημιουργούνται από την συμπύκνωση δύο α-αμινοξέων, ως προϊόντα διάσπασης πολυπεπτιδίων μεταποιημένων τροφίμων και ποτών ή μέσω της δράσης μικροοργανισμών. Έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται από πλήθος πρωτεϊνικών υποδοχέων με αποτέλεσμα να αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις με δυνητική φαρμακευτική δράση. Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία των δικετοπιπεραζινών σε πολλά φυσικά προϊόντα, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, γεγονός που τις καθιστά δύσκολα ανιχνεύσιμες και τις εφαρμογές τους στην ιατρική, μέσω των βιολογικών τους δράσεων, η ανίχνευσή τους σε προϊόντα διατροφής καθίσταται ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα.

Ως αντικείμενο μελέτης της παρούσης εργασίας επιλέχθηκε να μελετηθούν οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες σε επεξεργασμένες ελιές και σε εμφιαλωμένους οίνους, δεδομένου ότι τα εν λόγω προϊόντα παρουσιάζουν τα τελευταία χρόνια αυξανόμενο διατροφικό, εμπορικό και οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα.

Αρχικός στόχος ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας εκχύλισης των 2,5-δικετοπιπεραζινών από επεξεργασμένα τρόφιμα (ελιές, οίνος).

Επόμενος στόχος ήταν η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των ενώσεων αυτών με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή μάζας. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας / διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (LC / MSn), χρησιμοποιώντας φασματόμετρο μάζας με σύστημα ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) Orbitrap, ώστε να εξηγηθεί ο μηχανισμός θραυσμάτωσης των DKPs από τη μελέτη των θραυσμάτων και της σχετικής αφθονίας τους. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη του προφίλ των 2,5-δικετοπιπεραζινών σε επεξεργασμένες ελιές διαφορετικών ποικιλιών.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών δικετοπιπεραζινών σε εμφιαλωμένους οίνους με αεριοχρωματογραφία συνδυασμένη με ανιχνευτή φασματογραφίας μαζών ώστε να γίνει η ταυτοποίηση και ο χημικός χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των δειγμάτων των οίνων και των ελιών, όπως και η ανάλυση GC-MS πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης & Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων και στο Εργαστήριο Βιοχημικής Ανάλυσης και Βιοχημείας οίνου της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Τ.Ε.Ι. Αθήνας, ενώ η LC-ESI-MSn ανάλυση έγινε στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Ε.Ι.Ε..

8.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

8.2.1 Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Πρότυπες 2,5-δικοτοπιπεραζίνες: cyclo(Ala-Gly), cyclo-D-(Ala-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Pro-Val), cyclo(Ala-His), cyclo(Leu-Pro), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Leu-Phe), cyclo(Phe-Phe), cyclo(His-Phe), cyclo(Leu-Trp), cyclo(Asp-Gly), cyclo(Asp-Asp), cyclo(Trp-Tyr), cyclo(Val-Val), cyclo(Gly-Leu), cyclo(Ser-Tyr), cyclo(Phe-Ser) and cyclo(Gly-Gly) από τη Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA).

Πρότυπες ουσίες: N-tert-butoxycarbonyl (BOC) amino acids, που περιέχουν BOC-leucine, BOC-phenylalanine, BOC-valine, και BOC-alanine, phenylalanine methyl ester hydrochloride, proline methyl ester hydrochloride, triethylamine, HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate), (1-(5.6.7.8-Tetrahydro-3.5.5.6.8.8-hexamethyl-2-naphthalenyl) ethanone), και trifluoroacetic acid από τη Sigma-Aldrich (Hohenbrunn, Germany).

Πρότυπη ουσία 3-octanol (Sigma Aldrich, USA). Για την παρασκευή του εσωτερικού προτύπου, 24,00 mg 3-οκτανόλης διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο (dichloromethane

CH₂Cl₂) σε ογκομετρική φιάλη των 10,00 mL. Η τελική συγκέντρωσή ισούται με 2,400 g/L.

Νερό (H₂O): Water LC–MS Grade, MW=18,02 g/mol, CAS: 7732-18-5, Fischer Scientific, UK

Διχλωρομεθάνιο $\geq 99,8\%$ από την Chem-Lab (Zedelgen Belgium).

n-Εξάνιο από την SupraSolv (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany).

ΑνυδροΘευκόΝάτριο $\geq 99\%$, από την Chem-Lab (Zedelgen Belgium).

Ακετόνη $\geq 99,5\%$ από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Ακετονιτρίλιο (ACN): Acetonitrile hypergrade for LC–MS, LiChrosolv, CH₃CN, MW=41,05 g/mol, CAS: 75-05-8, Merck KGaA, (Germany).

Οξικό οξύ.

8.2.2 Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Ζυγός ηλεκτρονικός ακρίβειας στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου, (Kern, Switzerland).

Λουτρόυπερήχων Transsonic 570/H (Elma, Germany).

Ομογενοποιητής: Omni Mixer Homogenizer, Model No 17106, Omni International, USA.

Περιστροφικός εξεραμιστήρας, (Rotary evaporator) Rota vapor R-205 με Heating Bath B-490 και κυκλοφορητή ψύξης (recirculating cooler) SRC4 Stuart (BUCHI, Switzerland).

Στήλη διαχωρισμού αεριοχρωματογραφίας: silica capillary κολώνα, 30m X 0,32 mm i.d. X 0,25 μ m film thickness (HP-%MS 5%, phenylmethylsiloxane, Agilent Technologies).

Αέριο χρωματογράφος: Agilent 6890 Series GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Ανιχνευτήςμάζας: Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Φίλτρα Milex Filter Unit 0,22μm, Durapore PVDF Membrane, (Millipore, Ireland).

Στήλη διαχωρισμού υγροχρωματογραφίας: Kromasil column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm).

Αυτόματοςδειγματολήπτηςγια LC: Finnigan Surveyor Autosampler Plus Lite, Thermo Fisher Scientific Inc., UK

Μηχάνημαυγροχρωματογραφίας: UHPLC (Thermo Accela) (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Germany).

Φασματογράφοςμάζας: Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

8.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΧΩΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ένα σύνολο από είκοσι ένα (n=21) δείγματα ερυθρών, λευκών και αφρωδών εμπορικών οίνων συλλέχθηκαν τυχαία από διάφορα τοπικά καταστήματα. Η προέλευση των οίνων ήταν ελληνική και οι ποικιλίες ήταν Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Αγιωργίτικο, Μαλαγουζιά, Ξινόμαυρο, Ροδίτης, Αθήρι, και Μανδηλάρι. Στον Πίνακα 8.3.1 παρατίθενται οι εμφιαλωμένοι οίνοι που μελετήθηκαν.

Πίνακας 8.3.1 Δείγματα εμφιαλωμένων οίνων

Δείγματα	Ποικιλίες οίνων
1	Agiorgitiko TEI of Athens 2007
2	Agiorgitiko, Repanis Nemea 2007
3	Bourgogne Grand Ordinaire 2011
4	Boutaris Xinomauros 2005
5	Cabernet Sauvignon California 2001 Fetzer Vineyards
6	Cabernet Sauvignon 2004
7	Cabernet Sauvignon Hatzimichalis 2007
8	Cuvee' Argyro, Repanis Nemea 2007
9	DisenokoTokaji2009 Hungary

10	Evelli, aged wine, Sampani 2002
11	Harveys Bristol, Sherry, 2000
12	Jerez, Real Tesoro, Fino, Sherry
13	Merlot-Agiorgitiko 2008
14	Pinot Grigio 2007, Italy
15	Porto Ruby
16	Pouilly Fume, Guy Saget, 2007, France
17	Pouilly Fume, 2010, France
18	Roditis TEI of Athens 2002
19	Roditis TEI of Athens 2011
20	Sauternes, Cordier1996, France
21	Vinsanto 2004

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν να μελετηθούν δεκατέσσερα (14) διαφορετικά δείγματα επεξεργασμένων ελιών από τις ποικιλίες «Θρουμπολιές», «Κοθρέϊκες», «Καλαμών», «Αμφίσσης», «Κορωναϊκή», «Μεγάρων» και «Χονδροελιές». Οι περιοχές από τις οποίες προέρχονταν οι ελιές ήταν η Άμφισσα, η Φθιώτιδα, η Φωκίδα, τα Μέγαρα, η Κόρινθος, η Ηλεία και η Καλαμάτα. Στον Πίνακα 8.3.2 παρατίθενται οι Ελληνικές ποικιλίες ελιών που μελετήθηκαν.

Πίνακας 8.3.2 Ελληνικές ποικιλίες ελιών που μελετήθηκαν

Δείγματα	Ποικιλία
1	Θρουμπολιές μεγάλου μεγέθους από τα Μέγαρα
2	Κοθρέϊκες μεσαίου μεγέθους από την Άμφισσα
3	Καλαμών μεσαίου μεγέθους από την Κόρινθο
4	Καλαμών μεσαίου μεγέθους από την Ηλεία
5	Αμφίσσης μεσαίου μεγέθους από τη Φθιώτιδα
6	Χονδροελιές μεγάλου μεγέθους από την Άμφισσα
7	Μεγάρων μεσαίου μεγέθους από τα Μέγαρα
8	Καλαμών γλυκές μεγέθους γίγας από την Καλαμάτα
9	Καλαμών γλυκές μεσαίου μεγέθους από την Καλαμάτα
10	Καλαμών μεγέθους γίγας από την Καλαμάτα
11	Καλαμών μεγέθους μαμούθ από την Καλαμάτα

12	Αμφίσσης μεσαίου μεγέθους από την Φωκίδα
13	Καλαμών μεσαίου μεγέθους από τα Μέγαρα
14	Κορωναϊκή μεσαίου μεγέθους από την Ηλεία

8.4 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Η εκχύλιση αποτελεί μία από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μίας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, οι οποίες αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος, καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στην μικρο- και μακρο-ανάλυση.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid extraction, L.L.E.) βασίζεται στην κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών. Η επιλογή του εκχυλιστικού μέσου είναι σημαντική και πρέπει να γίνεται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- το εκχυλιστικό μέσο να μην αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ένωση,
- τα δύο υγρά να διαφέρουν σημαντικά ως προς την πυκνότητά τους,
- η εκχυλιζόμενη ένωση να ανακτάται εύκολα από το εκχυλιστικό μέσο,
- οι δύο φάσεις να μην εμφανίζουν τάση σχηματισμού γαλακτωμάτων,
- η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ένωσης στο εκχυλιστικό μέσο να είναι η μεγαλύτερη δυνατή
- το εκχυλιστικό μέσο να μην είναι τοξικός και εύφλεκτος διαλύτης.

8.4.1 Εκχύλιση των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των οίνων

Για την εκχύλιση των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των οίνων, δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης έως ότου βρεθεί η πιο αποδοτική δηλαδή η μέθοδος στην οποία ανακτώνται οι περισσότερες ενώσεις.

Παρακάτω γίνεται αναφορά σε όλες τις μεθόδους εκχύλισης που δοκιμάστηκαν:

Μέθοδος 1

- Λήψη 100mL οίνου
- Προσθήκη 1 mL εσωτερικού προτύπου (3-octanol)
- Ακολουθούν 3 διαδοχικές εκχυλίσσεις αρχικά με 40 mL διχλωρομεθανίου και στη συνέχεια δύο φορές με 30 mL διχλωρομεθανίου
- Έκπλυση της οργανικής φάσης με 3 mL αποσταγμένου νερού
- Ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό νάτριο
- Διήθηση
- Εξάτμιση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45-50°C με χρήση στήλης Vigreux

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε και με τη χρήση μίγματος πεντάνιου-αιθέρα σε αναλογία 1:1 ως διαλύτη εκχύλισης.

Μέθοδος 2

- Συμπύκνωση οίνου από 700 mL στα 100 mL υπό κενό (Rotary Evaporator)
- Εκχύλιση με 30 mL διχλωρομεθανίου τρεις φορές
- Έκπλυση της οργανικής φάσης με 3 mL απιονισμένου νερού
- Ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό νάτριο
- Διήθηση
- Εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού υπό κενό

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε και με τη χρήση μίγματος πεντάνιου-αιθέρα σε αναλογία 1:1 καθώς και με οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη εκχύλισης. Επιπλέον σε κάποια δείγματα έγινε προσθήκη χλωριούχου νατρίου πριν την έναρξη της εκχύλισης.

Μέθοδος 3

- Λήψη 100 mL οίνου

- Προσθήκη 70 mL κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου
- Εκχύλιση αρχικά με 50mL διχλωρομεθανίου και στη συνέχεια 2 φορές με 30 mL
- Ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό νάτριο
- Διήθηση
- Εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού υπό κενό

Μέθοδος 4

Στην μέθοδο αυτή, η εκχύλιση γίνεται με ανάδευση και διαχωρισμός φάσεων με φυγοκέντρηση, η εξάτμιση του διαλύτη με στήλη Vigreux.

- Λήψη 50mL οίνου
- Προσθήκη 35mL κορεσμένου χλωριούχου νατρίου
- Εκχύλιση με 50 mL διχλωρομεθανίου υπό συνεχή ανάδευση
- Φυγοκέντρηση της οργανικής φάσης
- Επανάληψη εκχύλισης με 35 mL διχλωρομεθανίου
- Φυγοκέντρηση της οργανικής φάσης
- Ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό νάτριο
- Διήθηση
- Εξάτμιση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45-50°C με χρήση στήλης Vigreux

Η εκχύλιση των πτητικών ενώσεων που εφαρμόστηκε τελικώς βασίζεται σε τροποποίηση της μεθόδου των Schneider et al. (1998). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ανάκτηση των 2,5-δικετοπιπεραζινών από οίνους σε ποσοστό 96%. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Κάθε κρασί αναλύθηκε με δύο τρόπους, δηλαδή μετά από εξουδετέρωση των οργανικών οξέων του ή απευθείας χωρίς να προηγηθεί εξουδετέρωση. Για την εκχύλιση των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των οίνων, εφαρμόστηκε εκχύλιση υγρού-υγρού με διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM) και η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια. Λαμβάνονται 100,00 mL οίνου και οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες

εκχυλίζονται με διχλωρομεθάνιο (DCM) (50 mL) με εκχύλιση υγρού / υγρού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές και τα ενωμένα εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου ξηραίνονται με προσθήκη άνυδρου θειϊκού νατρίου, διηθούνται και συμπυκνώνονται σε προζυγισμένα φιαλίδια ζυγίσεως με περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι σταθερού βάρους, για τον σταθμικό προσδιορισμό του υπολείμματος.

Παράλληλα άλλα 100,00 mL οίνου εξουδετερώνονται με προσθήκη NaOH μέχρι ρυθμίσεως του pH σε τιμή 9 και από το προκύπτον διάλυμα εκχυλίζονται 2,5-δικετοπιπεραζίνες με διχλωρομεθάνιο (DCM) (50 mL) με εκχύλιση υγρού / υγρού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές και τα ενωμένα εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου ξηραίνονται με προσθήκη άνυδρου θειϊκού νατρίου, διηθούνται και συμπυκνώνονται σε προζυγισμένα φιαλίδια ζυγίσεως με περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι σταθερού βάρους, για τον σταθμικό προσδιορισμό του υπολείμματος.

Στη συνέχεια, τα ξηρά υπολείμματα που λαμβάνονται και περιέχουν το κλάσμα των 2,5-δικετοπιπεραζινών, επαναδιαλύονται σε χλωροφόρμιο, διηθούνται μέσω φίλτρου 0,45 µm και αποθηκεύεται στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση με GC-MS.

8.4.2 Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των ελίων

Τα δείγματα ελιάς από κάθε είδος μετά την αφαίρεση του ελαιοπυρήνα ομογενοποιούνται ξεχωριστά με τη χρήση ομογενοποιητή, ώστε να μετατραπούν σε πάστα ελιάς. Στη συνέχεια ποσότητα πάστας (30 g) από το κάθε είδος εκχυλίζεται με εκχύλιση στερεού-υγρού σύμφωνα με τη μέθοδο των Ryan et al. (2009) με τις ακόλουθες τροποποιήσεις. Γίνεται αρχικώς εκχύλιση με κανονικό εξάνιο (50 mL) για την απομάκρυνση των λιπιδικών συστατικών και των λιποδιαλυτών χρωστικών, σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min υπό ανάδευση, η οποία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Μετά από κάθε εκχύλιση το διάλυμα φυγοκεντρείται και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόχυση. Στη συνέχεια το απολιπανθέν υλικό εκχυλίζεται με μίγμα ακετόνης / νερού (70/30, v/v) (50 mL), για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες τρεις φορές. Μετά από κάθε εκχύλιση το διάλυμα φυγοκεντρείται και οι ενωμένοι διαλύτες παραλαμβάνονται και

ξηραίνονται με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου. Το προκύπτον διάλυμα διηθείται και η ακετόνη απομακρύνεται με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα στους 30 °C. Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες εκχυλίζονται στη συνέχεια από το υδατικό διάλυμα που προκύπτει με διχλωρομεθάνιο (DCM) (30 mL) με εκχύλιση υγρού / υγρού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές και τα ενωμένα εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου ξηραίνονται με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου, διηθούνται και συμπυκνώνονται σε προζυγισμένα φιαλίδια ζυγίσεως με περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι σταθερού βάρους, για τον σταθμικό προσδιορισμό του υπολείμματος. Στη συνέχεια, το ξηρό αυτό υπόλειμμα που περιέχει το κλάσμα των 2,5-δικετοπιπεραζινών επαναδιαλύεται σε DCM, διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 µm και αποθηκεύεται στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση με LC-MSⁿ.

8.5 ΣΥΝΘΕΣΗ 2,6-ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Στα πλαίσια της έρευνας για την λειτουργικότητα και την πλήρη ταυτοποίηση των δικετοπιπεραζινών στο κρασί, κρίθηκε απαραίτητη η οργανική σύνθεση των ουσιών cyclo(Leu-Pro), cyclo(Val-Phe), cyclo(Ala-Phe), cyclo(Phe-Pro). Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την χρήση προστατευμένων διπεπτιδίων με την ομάδα BOC στην πλευρά της αμινομάδας και με μεθυλεστέρα στην πλευρά της καρβοξυλομάδας, ενώ για την πραγματοποίηση της πεπτιδικής σύνθεσης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο HBTU ως ενεργοποιητής. Μετά την διαδικασία της οργανικής σύνθεσης των ουσιών ακολούθησε ο καθαρισμός τους με την χρήση χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης (OCC), αφού πρώτα διαχωρίστηκαν σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

8.5.1 Σύνθεση των Διπεπτιδίων

Η σύνθεση των διπεπτιδίων βασίστηκε στην διαδικασία που περιγράφεται από τους Dourtoglou et al.(2012). Συγκεκριμένα προστέθηκαν 5 mmol τριαιθυλαμίνης σε ένα μίγμα BOC-προστατευμένων αμινοξέων (2 mmol) σε ακετονιτρίλιο (25 mL). Το αντιδραστήριο σύζευξης ήταν το HBTU(Dourtoglou et al., 1984) (4,2 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά την εξάτμιση του

διαλύτη τα προστατευμένα διπεπτίδια, μαζί με την περίσσεια των αρχικών αντιδραστηρίων και τα υποπροϊόντα αναδιαλύθηκαν σε 100 mL οξικού αιθυλεστέρα. Το διάλυμα εκπλύθηκε δύο φορές με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 5% (20 mL), νερό (20 mL) και με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (20 mL) και τελικά με νερό (20 mL). Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με προσθήκη θειικού μαγνησίου, διηθήθηκε και ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση.

8.5.2 Κυκλοποίηση των Διπεπτιδίων

Στα BOC-προστατευμένα διπεπτίδια έγινε προσθήκη τριφλουροξικού οξέος και συνεχής ανάδευση για 1 ώρα προκειμένου να επιτευχθεί η αποπροστασία του διπεπτιδίου (αφαίρεση της BOC ομάδας). Ακολούθησε εξουδετέρωση, εις διπλούν, του οξέος με 5 mL κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου και έκπλυση με 5 mL νερού. Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό νάτριο, φιλτράρισμα και συμπύκνωση αυτής υπό κενό. Ανάλυση του δείγματος στον φασματογράφο μάζας (GC-MS) για την ταυτοποίηση της ουσίας και τον προσδιορισμό της καθαρότητας της.

8.5.3 Καθαρισμός και απομόνωση των δικετοπιπεραζινών

Ο καθαρισμός των δικετοπιπεραζινών επιτεύχθηκε με την χρήση χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης (OCC), αφού πρώτα διαχωρίστηκαν σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), προκειμένου να εξευρεθεί ο καλύτερος διαλύτης ανάπτυξης για τις συγκεκριμένες ουσίες. Στον Πίνακα 8.5.3.1 παρατίθενται όλα τα δοκιμαστικά συστήματα διαλυτών της TLC και καταγράφονται τα συστήματα που έδωσαν τον καλύτερο διαχωρισμό. Στο Σχήμα 8.5.3.1 απεικονίζονται οι φωτογραφίες των δοκιμών TLC.

8.5.4 Σύστημα TLC και OCC

Μετά την διαδικασία της οργανικής σύνθεσης των ουσιών ακολούθησε ο καθαρισμός τους με την χρήση χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης (OCC), αφού πρώτα διαχωρίστηκαν σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) προκειμένου να εξευρεθεί ο καλύτερος διαλύτης ανάπτυξης για τις συγκεκριμένες ουσίες. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με όλες τις δοκιμές διαλυτών των TLC.

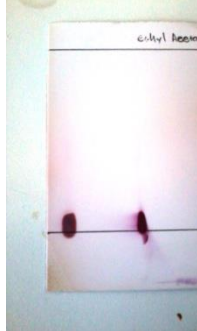
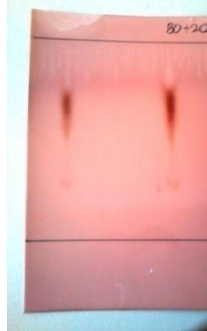
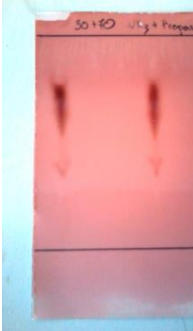
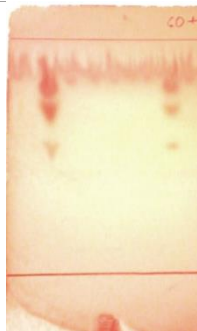
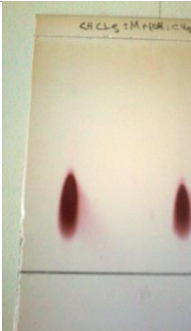
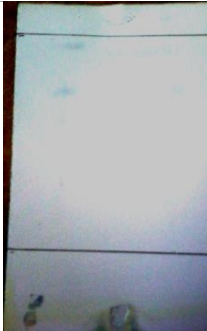
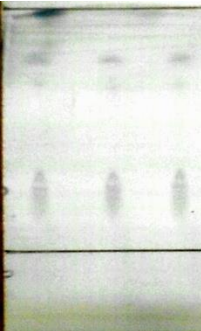
Πίνακας 8.5.3.1 Αποτελέσματα δοκιμών TLC

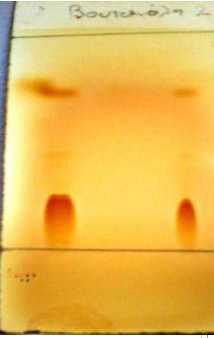
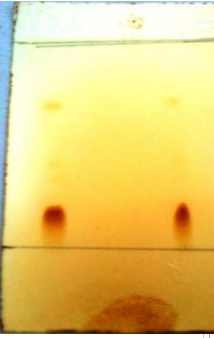
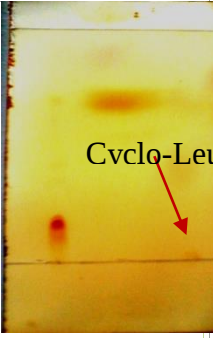
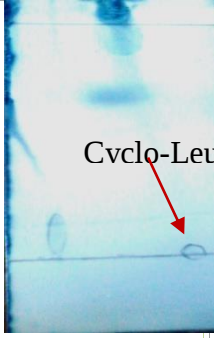
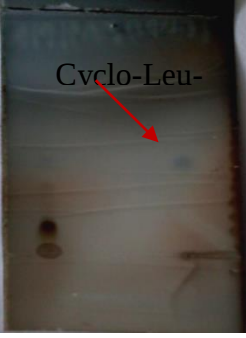
a/a	Σύστημα διαλυτών	Αντιδραστήριο Εμφάνισης	Διαλύτης δείγματος	Διαχωρισμός
1	Ethyl Acetate	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε πλάκα	Ethyl Acetate	x
2	Ethyl Acetate/Hexane (1:1)	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε πλάκα	Ethyl Acetate	x
3	NH ₃ /Propanol (10:90)	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acetate	x
4	NH ₃ /Propanol (20:80)	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acetate	x
5	NH ₃ /Propanol (30:70)	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acetate	√
6	NH ₃ /Propanol (40:60)	Νιτυδρίνη, θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acetate	√
7	CHCl ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH	Νιτυδρίνη,	Ethyl	x

	(70:10:5)	θέρμανση σε φούρνο	Acatate	
8	CHCL ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH (70:10:5)	Φωσφομολβδικό οξύ 1% (εμβάπτιση), θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acatate	?
9	CHCL ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH (70:10:5)	Φωσφομολβδικό οξύ 1% (εμβάπτιση) again, θέρμανση σε πλάκα	Ethyl Acatate	✓
10	CHCL ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH (70:10:5)	Φωσφομολβδικό οξύ 1% (εμβ.) & Νινυδρίνη, θέρμανση σε φούρνο	Ethyl Acatate	x
11	CHCL ₃ /CH ₃ OH (14:2)	Φωσφομολβδικό οξύ 1% (εμβάπτιση) θέρμανση σε πλάκα	Ethyl Acatate + CHCL ₃	?
12	CHCL ₃ /CH ₃ OH (14:2)	Στερεό Ιώδιο	Ethyl Acatate + CHCL ₃	?
13	2-Butanol	Στερεό Ιώδιο	Ethyl Acatate + CHCL ₃	✓
14	2-Butanol	Στερεό Ιώδιο	CHCL ₃ *	✓
15	2-Butanol προσθήκη cyclo- Leu-Pro	Στερεό Ιώδιο	CHCL ₃	✓

16	2-Butanol προσθήκη cyclo-Leu-Pro	Στερεό Ιώδιο και μετά εμβάπτιση σε Φωσφομολβδικό οξύ 1%	CHCL3	✓
17.	CH ₂ CL ₂ προσθήκη cyclo-Leu-Pro	Στερεό Ιώδιο και μετά εμβάπτιση σε Φωσφομολβδικό οξύ 1%	CHCL3	x
18.	2-Butanol προσθήκη cyclo-Leu-Pro	Εμβάπτιση σε Φωσφομολβδικό οξύ 2%	CHCL3	✓
19	Ethyl Acetate-Methanol (60:40)	Εμβάπτιση σε Φωσφομολβδικό οξύ 2%	CHCL3	✓

Φωτογραφίες πλακών TLC

				
1_Ethyl Acetate	2_ Ethyl Acetate/Hexan e (1:1)	3_NH ₃ /Propanol (10:90)	4_NH ₃ /Propa nol (20:80)	5_NH ₃ /Prop anol (30:70)
				
6_NH ₃ /Prop anol (40:60)	7_CHCl ₃ /C H ₃ OH/ CH ₃ COOH (70:10:5)	8_CHCl ₃ /C H ₃ OH/ CH ₃ COOH (70:10:5)	9_CHCl ₃ /C H ₃ OH/ CH ₃ COOH (70:10:5)	10_CHCl ₃ /CH ₃ OH/ CH ₃ COOH (70:10:5)

				
11_ CHCl ₃ /CH ₃ OH (14:2)σε PMb acid	12_CHCl ₃ / CH ₃ OH (14:2)σεI ₂	13_2-Butanol, sample in ethyl acetate σεI ₂	14_2-Butanol, sample in CHCl ₃ σεI ₂	15_2-Butanol + cyclo-Leu- Pro σεI ₂
				
16_2-Butanol + cyclo-Leu- Pro και PMb acid	17_CHCl ₃ σε PMb acid	18_2-Butanolσε 2%PMb acid		

Σχήμα 8.5.3.1 Αποτελέσματα δοκιμών TLC-Φωτογραφίες

8.5.5 Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης

Από τα αποτελέσματα δοκιμών της TLC, καταλήξαμε στο σύστημα EthylAcetate – Methanol σε αναλογία 60:40 ως διαλύτη έκλουσης, για τις δικετοπιπεραζίνες cyclo(Phe-Pro) και cyclo(Leu-Pro). Για τις υπόλοιπες δύο χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης 2-Βουτανόλη. Η πορεία ήταν η εξής :

- Ανάμειξη 100 mL Silica gel και 100 mL Ethyl Acetate και τοποθέτησή τους εντός της στήλης

- Συμπύκνωση του δείγματος έως τα 1ml και τοποθέτηση εντός της στήλης
- Προσθήκη μίγματος 60 mL Ethyl Acetate και 40 mL Methanol
- Παραλαβή της κάθε μπάντας σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα
- Ανάλυση στο φασματογράφο μάζας (GC-MS)

Στον Πίνακα 8.5.5.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα προϊόντα που παρήχθησαν από την οργανική σύνθεση καθώς και οι χρωματογραφικές καθαρότητες των διπεπτιδίων, των αποπροστατευμένων διπεπτιδίων και των δικετοπιπεραζινών έπειτα από ανάλυσή αυτών στον αέριο χρωματογράφο – φασματογράφο μάζας (GC-MS), καθώς και οι αποδόσεις τους.

Πίνακας 8.5.5.1 Αποτελέσματα Σύνθεσης Δικετοπιπεραζινών

	MB	mmol	Τελικά mmol	Χρωματογραφική καθαρότητα (%)	Yield (%)
Boc-Pro-OH	231				
Leu-OMe	129				
Boc-Pro-Leu-OMe	342	2	1,65	91	76
Pro-Leu-OMe	241				
Cyclo-Leu-Pro	210		1,26	99	63
Boc-Pro-OH	265,3				
Boc-Pro-Phe-OMe	376	2	1,42	94	67
Pro-Phe-OMe	275				
Cyclo-Phe-Pro	244		1,07	94	-
Boc-Ala-OH	189,2				
Phe-OMe	179				
Boc-Ala-Phe-OMe	350	2	1,54	96	73
Ala-Phe-OMe	249			66	27
Cyclo-Ala-Phe	218		1,3	19	10

Boc-Val-OH	217				
Phe-OMe	179				
Boc-Val-Phe-OMe	377	2	1,72	89	77
Val-Phe-OMe	276			46	42
Cyclo-Val-Phe	245		1,65	18,40	20

8.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GAS CHROMATOGRAPHY, GC) ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΗΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Κάθε εκχύλισμα κρασιού αναλύθηκε χρωματογραφικά σε ένα GC συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας MS. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέρια χρωματογραφίας της Agilent 6890 series εξοπλισμένο με 5975CVLMSD και μια silicacapillary κολώνα, 30mX 0,32 mm i.d. X 0,25 μm film thickness (HP-%MS 5%, phenylmethylsiloxane, Agilent Technologies). Δείγματα όγκου (1,0 μl) εισήχθησαν χρησιμοποιώντας την λειτουργία split με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι 250°C και το φέρον αέριο είναι το Ήλιο με ροή 1 ml/min και 25 cm/s. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.6.1.

Πίνακας 8.6.1 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Oven Ramp	°C/min	Next °C	Hold min	Run Time
Initial		50	2,50	2,50
Ramp 1	2,50	180	0,00	54,50
Ramp 2	2,00	230	0,00	79,50
Ramp 3	6,00	250	5,00	87,83
Post Run		0	0,00	87,83

Η θερμοκρασία της transferline ρυθμίστηκε στους 280°C, ο φασματογράφος μάζας λειτουργεί με electron ionization mode (EI) με τάση ιονισμού 70eV σε διακύμανση

μάζας 40-550 amu. Όλα τα αρχεία καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Turbomass 5.0 ChemStation.

8.6.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα για την ταυτοποίηση των γραμμικών και κυκλικών διπεπτιδίων που προέκυψαν από τη χημική σύνθεση

BOC-Leu-Pro-OCH₃ (M⁺ 342): MS m/z (%) 41.1 (19), 43 (13), 57.1 (61), 59.1 (13), 70.1 (74), 86.1 (100), 128 (65), 130 (99), 129 (69), 186.2 (15), 209.2 (19).

BOC-Phe-Pro-OCH₃(M⁺ 362): MS m/z (%) 57.1 (98), 70.1 (82), 91.1 (34), 120.1 (100), 125.1 (41), 128.1 (64), 164.1 (49), 185.1 (99), 200.1 (30), 259.1 (26).

BOC-Val-Phe-OCH₃(M⁺ 378): MS m/z (%) 41.1 (10), 55.1 (11), 57.1 (56), 72.1 (100), 88.1 (16), 91.1 (25), 116.1 (79), 120.1 (25), 162.1 (54), 172.1 (12).

BOC-Ala-Phe-OCH₃(M⁺ 350): MS m/z (%) 44.1 (64), 57.1 (63), 88 (64), 91.1 (32), 120.1 (32), 131.1 (16), 144.1 (14), 146.1 (12), 162 (100), 163.1 (10).

Cyclo (Leu-Pro) (M⁺ 210): MS m/z (%) 41.1 (10), 70.1 (52), 86.1 (17), 124.1 (8), 125.1 (10), 154.1 (100), 155.1 (9).

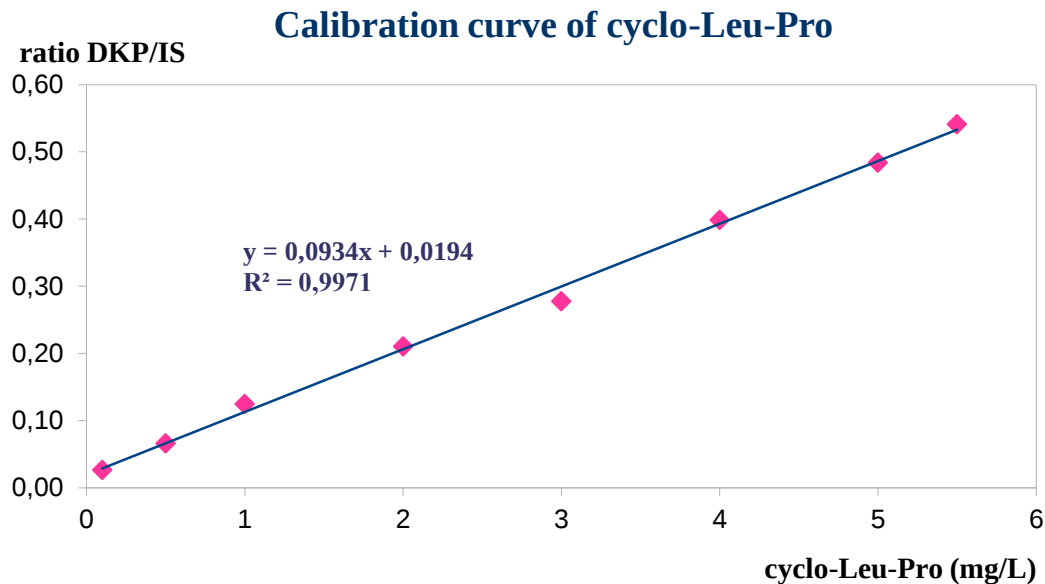
Cyclo (Phe-Pro) (M⁺ 244): MS m/z (%) 41.1 (10), 70.1 (44), 91.1 (44), 92.1 (11), 120.1 (14), 125.1 (100), 153.1 (35), 244.2 (45).

Cyclo (Val-Phe) (M⁺ 246): MS m/z (%) 72.1 (15), 85.1 (26), 91.1 (100), 92.1 (16), 99.1 (16), 113 (19), 120.1 (14), 127.1 (53), 155.1 (17), 246.2 (52).

Cyclo (Ala-Phe) (M^+ 218): MS m/z (%) 44.1 (15), 65.1 (8), 91.1 (100), 92.1 (15), 99.1 (28), 127.1 (16), 218.1 (35).

8.6.2 Πρότυπη καμπύλη cyclo-Leu-Pro

Εκτός από την ποιοτική ανάλυση των 2,5-δικετοπιπεραζινών στους οίνους, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός για να καθοριστούν τα επίπεδα των συγκεντρώσεών τους. Ποσοτικά μελετήθηκε η ένωση cyclo(Leu-Pro). Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων της cyclo(Leu-Pro) ήταν 0,10, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 5,00 και 5,50 mg/L, και ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η 1-(5.6.7.8-Tetrahydro-3.5.5.6.8.8-hexamethyl-2-naphthalenyl) ethanone (50 mg/L), που δεν υπάρχει στα δείγματα κρασιών. Η ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου προστίθεται και στα δείγματα κρασιών. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της cyclo(Leu-Pro) περιγράφει τη συνάρτηση του λόγου των εμβαδών των κορυφών της πρότυπης ουσίας και του εσωτερικού προτύπου ως προς τη συγκέντρωσή της. Στο σχήμα 8.6.2.1 παρατίθεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της cyclo(Leu-Pro).



Σχήμα 8.6.2.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της cyclo(Leu-Pro)

8.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΛΙΩΝ

Η LC-MS τεχνική αποτελεί μια από τις αποτελεσματικότερες αναλυτικές προσεγγίσεις για τη μελέτη των 2,5-δικετοπιπεραζινών (Ryan et al., 2009). Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό δίνει σημαντικές πληροφορίες για το προφίλ των δικετοπιπεραζινών και είναι αποτελεσματικό εργαλείο για τη μελέτη της μοριακής τους δομής (Furtado et al., 2007; Guo et al., 2009). Αποτελεί μια ήπια μορφή ιοντισμού και σπάνια δημιουργεί θραύσματα ιόντων στην πηγή του φασματογράφου μάζας. Στο θετικό ιοντισμό (ESI⁺), τα μόρια ιοντίζονται με πρωτονίωση. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα συμβολίζονται ως [M+H]⁺. Με τις πολλαπλές διαδοχικές θραυσματοποιήσεις των αρχικά σχηματιζόμενων ιόντων, γίνεται εφικτός ο χαρακτηρισμός των αμινοξέων της δικετοπιπεραζίνης.

Το σύστημα της LC-MS που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από το σύστημα UHPLC (Thermo Accela) και το φασματογράφο μάζας Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) που αξιοποιεί σε ένα όργανο δύο τεχνολογίες: της παγίδας ιόντων και της τροχιακής παγίδας ιόντων (orbitrap).. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό είναι η Kromasil column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm).

Πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα της LC, τα εκχυλίσματα των 2,5-δικετοπιπεραζινών των ελιών φιλτραρίστηκαν για την απομάκρυνση αδιάλυτων συστατικών.

Ως διαλύτες κινητής φάσης επιλέχθηκαν ο διαλύτης A (υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1%) και ο διαλύτης B (ακετονιτρίλιο που περιέχει 0.1% οξικού οξέος). Το πρόγραμμα της βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόσθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.7.1

Πίνακας 8.7.1 Πρόγραμμα διαλυτών για τη βαθμιδωτή έκλυση των δικετοπιπεραζινών μέσω της HPLC και λοιπές ρυθμίσεις.

Χρόνος (min)	A (υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1%)	B (ακετονιτρίλιο που περιέχει 0,1% οξικού οξέος)
0,00	90,0	10,0
7,00		
3,00		
6,00		
15,00		
Ροή διαλυτών 0,250 mL/min		Όγκος δείγματος 1,0 μ L

Ειδικότερα, η πολλαπλή θρασματοποίηση των θετικών και αρνητικών ιόντων συνέβη με την εφαρμογή διαφορετικών ενεργειών πρόσκρουσης ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα προς σύγκριση μοτίβα θραυσμάτων m/z . Οι συνθήκες που ορίστηκαν για το σύνολο των MS αναλύσεων αναγράφονται στον Πίνακα 8.7.2.

Η επεξεργασία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων από το LC–MS έγινε με το λογισμικό Mass Frontier 6.0 (High Chem Ltd.) για την παραγωγή όλων των πιθανών μηχανισμών θραυσμάτωσης με τη χρήση των τυποποιημένων βάσεων δεδομένων (HighChem ESI Pos 2008 and HighChem Fragmentation Library).

Πίνακας 8.7.2 Συνθήκες που ορίστηκαν για το θετικό (ESI⁺) ιοντισμό των δικετοπιπεραζινών και για τη διαδοχική θραυσμάτωσή τους.

Ρυθμίσεις MS	Θετικός ιοντισμός (ESI ⁺)
Τάση πηγής (kV)	3,50
Θερμοκρασία τριχοειδούς (capillary) σωλήνα (°C)	300
Ροή αερίου Sheath gas (αυθαίρετες μονάδες)	35 Arb
Ροή αερίου Auxiliarygas (αυθαίρετες μονάδες)	15 Arb

8.8 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΘΕΙΜΕΝΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΚΩΝ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H NMR

Οι δομές των συντεθειμένων δικετοπιπεραζινών καθώς και των πρόδρομων ενώσεών τους ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (¹HNMR, ¹³CNMR) σε φασματογράφο Varian 300MHz. Εντοπίστηκαν μικρές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ των κορυφών των μελετούμενων κυκλικών και γραμμικών πεπτιδίων με αντίστοιχα φάσματα της βιβλιογραφίας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στη συνέχεια.

BOC-Leu-Pro-OCH₃ (DahiyaandKumar, 1984): ¹HNMR (300 MHz, Varian) inCDCl₃δ (ppm) = 0.94-1.00 [2dd, 6H, *J* = 6.3, 6.6 Hz, -CH₃Leu], 1.42 [s, 9H, -(CH₃)₃BOC], 1.45-1.52 [m, 1H, C_γH₁Leu], 1.78 [m, 4H, C_βH₂-C_γH₂Pro], 2.05-2.25 [m, 2H, C_βH₂Leu], 3.60 [m, 1H, C_δH₁, Pro], 3.72 [s, 3H, -OCH₃], 3.75 [m, 1H, C_δH₁, Pro], 4.43-4.55 [m, 2H, C_αH₁Pro-C_αH₁Leu], 5.14 [d, br, 1H, -NHLeu].

BOC-Phe-Pro-OCH₃: ¹HNMR (300 MHz, Varian) inCDCl₃δ (ppm) = 1.37 [s, 9H, -(CH₃)₃BOC], 1.92-2.20 [m, 3H, C_βH₁-C_γH₂Pro], 2.04-2.20 [m, 1H, C_βH₁Pro], 3.00-

3.15 [m, 2H, C β H $_2$ Phe], 3.60 [m, 2H, C δ H $_2$ Pro], 3.64 [s, 3H, OCH $_3$], 4.65 [m, 1H, C α H $_1$ Phe], 4.49 [dd, 1H, J = 4.1, 8.4 Hz, C α H $_1$ Pro], 5.26 [d, br, 1H, -NH], 7.26-7.29 [m, 5H, -C $_6$ H $_5$ Phe].

BOC-Val-Phe-OCH $_3$: ^1H NMR (300 MHz, Varian) in CDCl $_3$ δ (ppm) = 0.92 [d, 6H, J = 6.8, -CH $_3$ Val], 1.44 [s, 9H, -(CH $_3$) $_3$ BOC], 2.04-2.14 [m, 1H, C β H $_1$ Val], 3.18 [m, 2H, C β H $_2$ Phe], 3.66 [s, 1H, C α H $_1$ Val], 3.77 [s, 3H, OCH $_3$], 3.86-3.91 [m, 1H, C α H $_1$ Phe], 5.00 [m, 1H, -NH Phe], 6.28 [s, br, 1H, -NH Val], 7.11-7.32 [m, 5H, -C $_6$ H $_5$ Phe].

BOC-Ala-Phe-OCH $_3$: ^1H NMR (300 MHz, Varian) in CDCl $_3$ δ (ppm) = 1.30-1.32 [d, 3H, J = 7.0, -CH $_3$ Ala], 1.43 [s, 9H, (CH $_3$) $_3$ BOC], 3.12 [dq, 2H, J =5.8, 13.8 Hz, C β H $_2$ Phe], 3.77 [s, 3H, OCH $_3$], 4.12 [q, 1H, J = 7.1, 14.3 Hz, C α H $_1$ Ala], 4.87 [q, 1H, C α H $_1$ Phe], 6.49 [s, 1H, -NH Ala], 7.11-7.28 [m, 5H, -C $_6$ H $_5$ Phe].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΕΣ ΕΛΙΕΣ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

9.1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Ο χημικός χαρακτηρισμός των αρωματικών 2,5-δικετοποπεραζινών επιτεύχθηκε μέσω της ανάπτυξης μεθοδολογίας υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, με χρήση ιοντισμού ηλεκτροδιάχυσης (LC-ESI-MSⁿ). Η ανίχνευση έγινε στα θετικά ιόντα. Ο ιοντισμός ηλεκτροδιάχυσης ESI ανήκει στις ήπιες μεθόδους ιοντισμού, παράγει τα μητρικά ιόντα, από τα οποία μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια η μοριακή τους μάζα. Εφαρμόζεται ευρέως για την ανάλυση πολικών και ιοντικών ενώσεων, ανεξαρτήτου μοριακού βάρους. Η τεχνική της υψηλής διακριτικής ικανότητας, που επιτυγχάνεται με τον αναλυτή Orbitrap- (αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων), δίνει τη δυνατότητα να υπολογισθεί η μοριακή μάζα των ιόντων με ακρίβεια τετάρτου δεκαδικού ψηφίου, γεγονός που επιτρέπει τη διάκριση ιόντων ακόμα και αν οι μοριακές τους μάζες διαφέρουν σε τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.

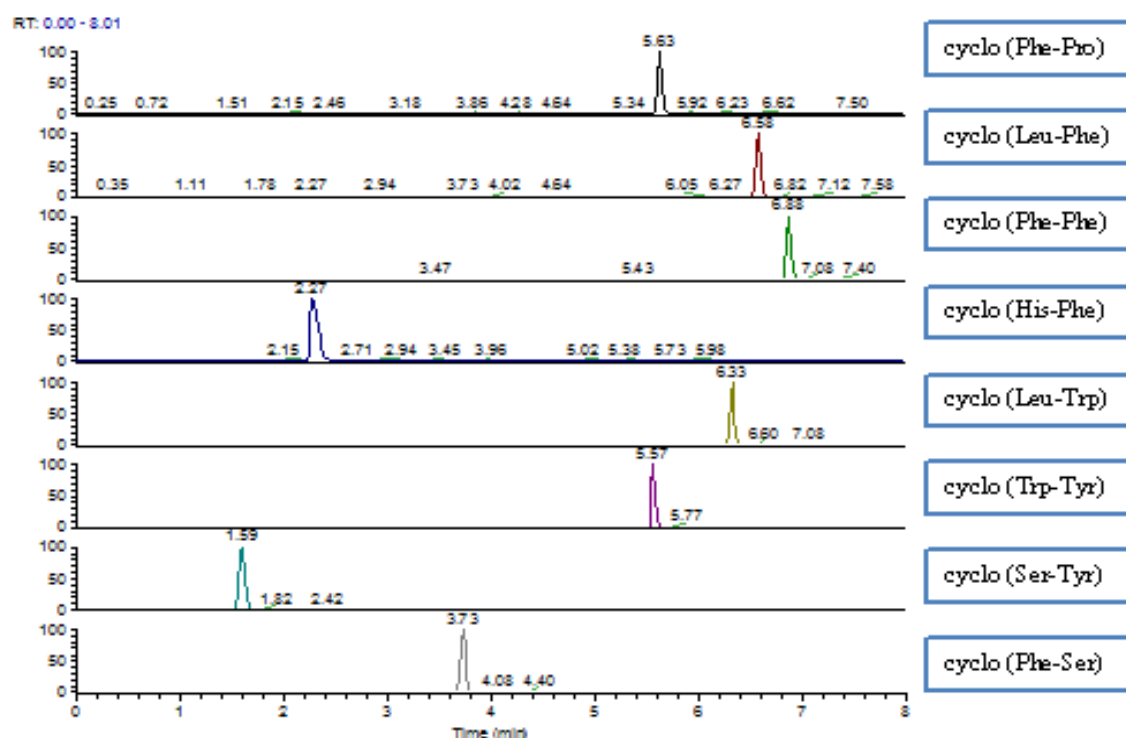
Για τον χαρακτηρισμό των αρωματικών 2,5-δικετοποπεραζινών, έγινε κατ' αρχήν καταγραφή των χρόνων έκλουσης των προτύπων DKPs από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων τους και σύγκριση των πειραματικών μοριακών μαζών των μητρικών ιόντων με τις θεωρητικώς υπολογιζόμενες. Στη συνέχεια εξηγήθηκε ο μηχανισμός θραυσματοποίησης των προτύπων DKPs από τη μελέτη των θραυσμάτων και της σχετικής αφθονίας τους όπως προέκυψαν από τα διαδοχικά φάσματα μάζας (MSⁿ). Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν θεωρητικές μελέτες υπολογιστικής χημείας με το πρόγραμμα Gaussian 09 suite (Frischetal., 2009), χρησιμοποιώντας τη θεωρία

συναρτησιοειδούς πυκνότητας DFT(DensityFunctionalTheory) με τη μέθοδο b3lyp(Leeetal., 1988; Stephensetal., 1994) σε συνδυασμό με το σύνολο βάσης 6-31G(d) για την εύρεση των σταθερότερων ενεργειακά παραγόμενων ιόντων. Τέλος καταγράφηκαν τα χαρακτηριστικά ιόντα για τις επιμέρους DKPs σε σχέση με τη δομή τους (αρωματική ή αλειφατική αλυσίδα, ύπαρξη συμμετρίας, κλπ.).

Από τη συγκριτική μελέτη των χρωματογραφημάτων δειγμάτων και προτύπων εντοπίστηκαν πιθανές δομές DKPs στις ποικιλίες των μελετώμενων ελιών. Οι δομές αυτές επαληθεύθηκαν από την συγκριτική ανάγνωση των διαδοχικών φασμάτων μάζας MSⁿ των ενώσεων αυτών σε πρότυπα και δείγματα.

9.2. ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

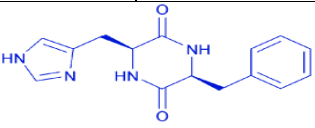
Μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οκτώ (8) πρότυπες 2,5-δικετοπιπεραζίνες (DKP) που περιείχαν αρωματικά αμινοξέα και συγκεκριμένα οι cyclo(His-Phe), cyclo(Phe-Ser), cyclo(Leu-Phe), cyclo(Phe-Phe), cyclo(Ser-Tyr), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Trp-Tyr) και cyclo(Leu-Trp). Η χρωματογραφική μέθοδος που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού των παραπάνω 8 ενώσεων σε λιγότερο από 7 min. Στο Σχήμα 9.2.1 παρατίθεται το χρωματογράφημα των οκτώ προτύπων αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών.

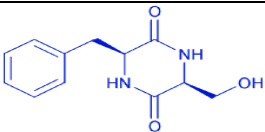
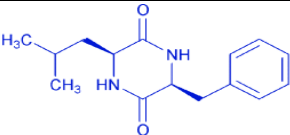
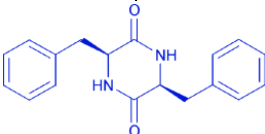


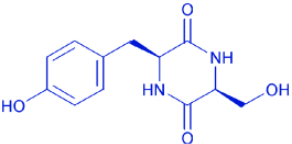
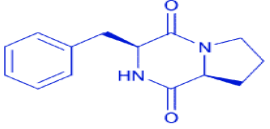
Σχήμα 9.2.1 LC χρωματογράφημα των αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

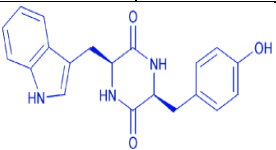
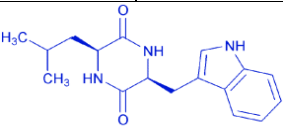
Οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων των προτύπων των αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών (DKPS) όπως προσδιορίστηκαν από το φάσμα ESI-MS¹ με υψηλή διακριτική ικανότητα καθώς και οι μοριακές μάζες των ιόντων με την μεγαλύτερη σχετική αφθονία που παράγονται κατά τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS²), παρατίθενται στον Πίνακα 9.2.1. Επίσης οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων των προτύπων των 2,5-δικετοπιπεραζινών (DKPS) όπως προσδιορίστηκαν από το φάσμα ESI-MS¹ με υψηλή διακριτική ικανότητα και επίσης εκφρασμένες σε μονο-ισοτοπική και φυσικής αφθονίας βάση, καθώς και οι μοριακές μάζες των ιόντων με την σχετική αφθονία τους που παράγονται κατά τις διαδοχικές θραυσματώσεις (MSⁿ), παρατίθενται στον Πίνακα 9.2.2. Για όλες τις πρότυπες ενώσεις οι πειραματικές μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων τους ήταν σε πολύ καλή συμφωνία με τις θεωρητικές μονο-ισοτοπικές μάζες, εμφανίζοντας σφάλμα ίσο ή μικρότερο των 2,1 ppm (Πίνακας 9.2.2), επιβεβαιώνοντας έτσι τη στοιχειακή τους σύσταση.

Πίνακας 9.2.1: ESI-MS και MS² δεδομένα των αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

	Μητρικό ιόν	A	B	C	D	F	E
2,5-DKP	MH ⁺	MH ⁺ - 28 (C=O) /(CH ₂ CH ₂)	MH ⁺ - 17 (NH ₃)	MH ⁺ - 45 (HCONH ₂)	MH ⁺ -28(C=O) - 45(HCONH ₂)	αμινοξύ- HO	αμινοξύ-CO ₂ H
Ομάδα 1							
Cyclo His-Phe C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₂						His	His
a	285.1346	257.2142 (100)	268.2142 (54)	240.1753 (10)	212.1779 (30)	138.0925 (3)	110.1199 (18)
b 284.3138	285.3218	257.3116	268.3144	240.2811	212.2710	138.1476	110.1374
c 284.1273	285.1351	257.1402	268.1324	240.1136	212.1188	138.0667	110.0718
							Phe
							120.1379 (2)
							120.1720
							120.0813

Cyclo Phe-Ser C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃							Phe
a	235.1077	207.1324 (100)	218.0464 (1)	190.1201 (1)	162.1047 (3)		120.1004 (3)
b 234.2517	235.2596	207.2495	218.2522	190.2189	162.2088		120.1720
c 234.1004	235.1082	207.1133	218.1055	190.0868	162.0919		120.0813
Cyclo Leu-Phe C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂						Phe	Phe
a	261.1598	233.1786 (100)	244.1782 (1)	216.1437 (31)	188.1208 (1)	148.1770 (1)	120.0578 (46)
b 260.3321	261.3400	233.3299	244.3327	216.2993	188.2892	148.1822	120.1720
c 260.1524	261.1603	233.1653	244.1575	216.1388	188.1439	148.0762	120.0813
							Leu
							86.0968 (9)
							86.1557
							86.0970
Cyclo Phe-Phe C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂							Phe

a	295.1441	267.2574 (100)	278.2380 (1)	250.2240 (6)	222.1727 (1)		120.1214 (48)
b 294.3484	295.3564	267.3462	278.3490	250.3157	222.3056		120.1720
c 294.1368	295.1446	267.1497	278.1419	250.1231	222.1283		120.0813
Cyclo Ser-Tyr C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄							Tyr
a	251.1026	223.1624 (100)	234.2054 (1)	206.1135 (1)	178.1202(2)		136.1216 (3)
b 250.2511	251.2590	223.2489	234.2517	206.2183	178.2082		136.1714
c 250.0953	251.1031	223.1083	234.1004	206.0817	178.0868		136.0762
Ομάδα 2							
Cyclo Phe-Pro C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂							Phe
a	245.1285	217.1558 (100)	228.0948 (2)	200.0919 (4)			120.0862 (61)
b 244.2896	245.2975	217.2874	228.2902	200.2568			120.1720
c 244.1211	245.1290	217.1340	228.1262	200.1075			120.0813
						Pro	Pro
						98.1401 (1)	70.1247 (10)

						98.1233	70.1132
						98.0606	70.0657
Ομάδα 3							
Cyclo Trp-Tyr C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃							Tyr
a	350.1499	322.2266 (3)	333.1894 (21)	305.2446 (6)			136.0539 (13)
b 349.3840	350.3919		333.3846	305.3512			136.1714
c 349.1426	350.1504		333.1477	305.1290			136.0762
Cyclo Leu-Trp C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₂							
a	300.1707	272.2537 (2)	283.2324 (6)	255.2095 (1)			
b 299.3683	300.3762	272.3661	283.3689	255.3355			
c 299.1633	300.1712	272.1762	283.1684	255.1497			

α: μοριακή μάζα πειραματική; β: μοριακή μάζα με βάση τη φυσική αφθονία; γ: μονο-ισοτοπική μοριακή μάζα. Η φυσική και μονο-ισοτοπική μοριακή μάζα υπολογίστηκαν με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος MolecularMassCalculator(http://www.bmr.b.wisc.edu/metabolomics/mol_mass.php).

Οι σχετικές αφθονίες των θετικών ιόντων δίνονται % μέσα σε παρένθεση.

Πίνακας 9.2.2: ESI-MSⁿδεδομένα των αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

2,5-DKP	Rt	ms ¹ (MH ⁺) πειραματικό m/z	ms ¹ (MH ⁺) θεωρητικό m/z	Σφάλμα (ppm)	ms ²	ms ³	ms ⁴
Cyclo His-Phe C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₂	1.94	285.1346	285.1351	1.8	268.2142 (54), 257.2142 (100) , 240.1753 (10), 224.1747 (2), 212.1779 (30), 166.0500 (27), 138.0925 (3), 120.1379 (2), 110.1199 (18).	240.1753 (78), 239.3858 (9), 212.1779 (100) , 175.1889 (10), 138.0925 (17), 120.1379 (6), 110.1199 (62), 83.2689 (2).	195.0721 (94), 185.1238 (14), 183.0926 (11), 130.0482 (63), 120.1379 (100) , 83.1260 (48).
Cyclo Phe-Ser C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃	3.59	235.1077	235.1082	2.1	218.0464 (1), 217.1461 (12), 207.1324 (100) , 190.1201 (1), 189.1138 (17), 167.1102 (3), 162.1047 (3), 120.1004 (3).	207.1105 (12), 190.0646 (7), 189.1050 (11),177.1141 (9), 162.1708 (86), 160.3000 (3), 144.2778 (22), 121.0335 (13), 120.3363 (100) , 88.0757 (24), 87.4081 (56).	-

Cyclo Leu-Phe C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	6.54	261.1598	261.1603	1.9	244.1782 (1), 233.1786 (100) , 216.1437 (31), 205.0758 (1), 188.1208 (1), 148.1770 (1), 120.0578 (46), 86.0968 (9).	216.1272 (2), 205.1228 (2), 188.1725 (100) , 177.1394 (5), 148.1770 (1), 132.1192 (8), 120.2131 (98), 105.2924 (1), 86.2793 (46).	171.0853 (26), 159.0783 (18), 146.0469 (11), 145.0730 (4), 143.0459 (19), 132.1192 (56), 129.0533 (18),120.0578 (17), 117.0749 (17), 105.1032 (100) , 96.1908 (3), 91.1076 (4), 84.1504(1).
Cyclo Phe-Phe C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂	6,85	295.1441	295.1446	1.7	278.2380 (1), 267.2574 (100) , 250.2240 (6), 222.1727 (1), 120.1214 (48).	250.2240 (2), 222.1727 (2), 130.1475 (17), 120.2656 (100) .	103.0847 (100).
Cyclo Ser-Tyr C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄	1.48	251.1026	251.1031	2.0	234.2054 (1), 233.1349 (10), 223.1624 (100) , 206.1135 (1), 205.1278 (13), 178.1202(2), 145.0716 (12),	206.0938 (6), 205.1278 (11), 193.1215 (9), 188.0735 (1), 178.1202 (80), 160.2467 (20),	119.0214 (100), 91.0941 (10).

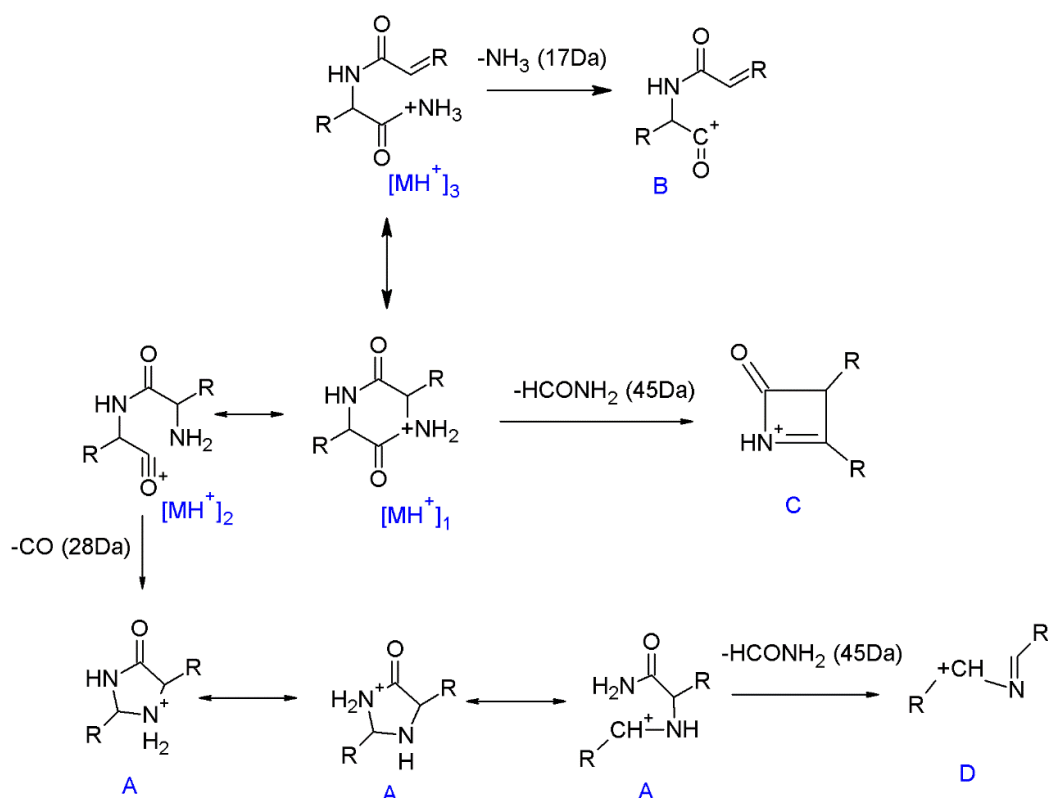
					136.1216 (3), 107.1013 (5).	137.0477 (6), 136.1216 (100) , 88.0399 (14), 87.3757 (29), 70.6184 (5).	
Cyclo Phe-Pro $C_{14}H_{16}N_2O_2$	5.59	245.1285	245.1290	2.0	217.1558 (100) , 228.0948 (2), 200.0919 (4), 189.1433 (2), 120.0862 (61), 98.1401 (1), 70.1247 (10).	172.10 (100).	157.1198 (10), 155.0533 (9), 144.0462 (100) , 143.0296 (15), 130.0653 (5), 129.0496 (20), 105.0946 (10), 91.0810 (2), 68.0275 (2).
Cyclo Trp-Tyr $C_{20}H_{19}N_3O_3$	5.55	350.1499	350.1504	1.4	333.1894 (21), 322.2266 (3), 305.2446 (6), 219.1049 (5), 191.0855 (5), 181.0931 (5), 170.0350 (14), 136.0539 (13), 132.0477 (38), 130.0844 (100) , 117.1609 (2).	-	-
Cyclo Leu-Trp	6.30	300.1707	300.1712	1.7	283.2324 (6), 272.2537 (2),	-	-

$C_{17}H_{21}N_3O_2$					255.2095 (1), 170.0391 (7), 169.1170(1), 132.0329 (28), 130.0727 (100).		
----------------------	--	--	--	--	--	--	--

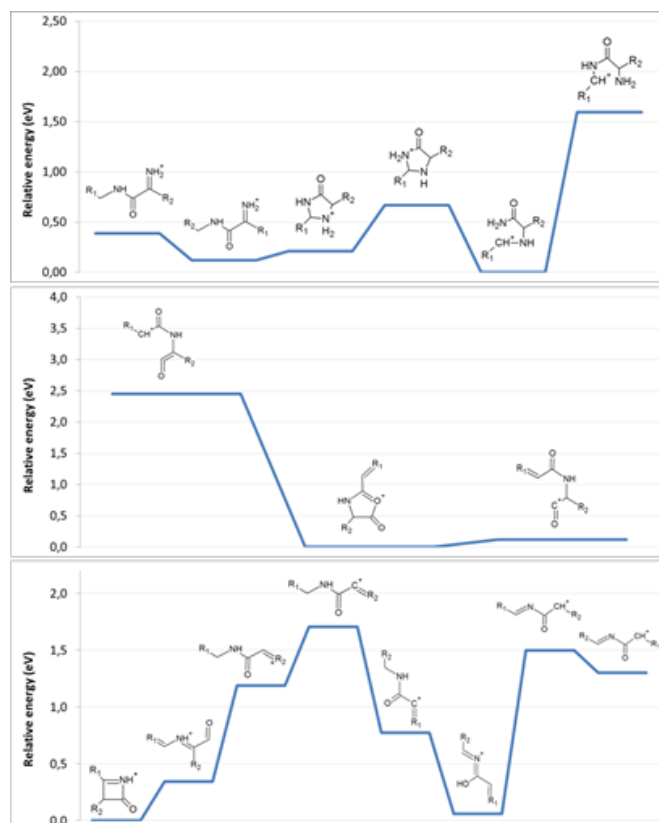
Τα κύρια θραύσματα σημειώνονται με στικτή γραμματοσειρά. Οι σχετικές αφθονίες των θετικών ιόντων δίνονται % μέσα σε παρένθεση.

Με βάση τη συγκριτική μελέτη των διαδοχικών φασμάτων μάζας (Παράρτημα Ι) προκύπτει ότι οι μελετώμενες πρότυπες ενώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες αναλόγως με τον μηχανισμό θραυσμάτωσης, ο οποίος φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με το είδος των αμινοξέων και συγκεκριμένα των πλευρικών ομάδων τους ως υποκαταστατών των δικετοπιπεραζινών. Η πρώτη ομάδα [πρότυπες ενώσεις 1-5: cyclo(His-Phe), cyclo(Phe-Ser), cyclo(Leu-Phe), cyclo(Phe-Phe), cyclo(Ser-Tyr)] περιλαμβάνει 2,5-δικετοπιπεραζίνες οι οποίες δεν περιέχουν θρυπτοφάνη ή προλίνη, η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ενώσεις που περιέχουν προλίνη [πρότυπη ένωση 6: cyclo(Phe-Pro)] και η τρίτη ομάδα ενώσεις που περιέχουν θρυπτοφάνη [πρότυπες ενώσεις 7-8: cyclo(Trp-Tyr) και cyclo(Leu-Trp)] (Bratakosetal., 2016a).

Ανεξαρτήτως ομαδοποίησης, όλες οι πρότυπες αρωματικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες ακολουθούν κοινό τρόπο θραυσμάτωσης, μέσω του σχηματισμού των προϊόντων ιόντων A [$MH^+ - 28$], B [$MH^+ - 17$] και C [$MH^+ - 45$] στο MS^2 φάσμα τους, τα οποία προέρχονται από τη θραυσμάτωση του μητρικού ιόντος (MH^+) (Σχήμα 9.2.2).



Σχήμα 9.2.2 Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσμάτωσης αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών (ενώσεις 1-5).



Σχήμα 9.2.3 Σχετικές ενέργειες DFT των προτεινόμενων θετικών ιόντων Α (πάνω), Β (μέση) και C (κάτω) σε σύγκριση με άλλες πιθανές δομές αυτών, όπως υπολογίστηκαν από τη βάση δεδομένων Mass Frontier.

Τα ιόντα Α, Β και C πιθανόν παράγονται μέσω της αποσπάσεως των ομάδων C=O, NH₃ και HCONH₂ από το μητρικό ιόν (MH⁺), αντιστοίχως (Σχήμα 9.2.2). Για να τεκμηριωθεί η δομή των παραπάνω ιόντων ως προς την ενεργειακή τους σταθερότητα πραγματοποιήθηκαν για κάθε στάδιο θραυσμάτωσης συγκριτικές μελέτες υπολογισμού της ενέργειας μεταξύ όλων των πιθανών ισομερών δομών όπως αυτές προέκυψαν με τη χρήση της βάσης δεδομένων του λογισμικού Mass Frontier. Ως εκ τούτου, οι δομές των ιόντων Α, Β και C όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.2.2, καθώς και οι αντίστοιχοι μηχανισμοί θραυσμάτωσης από τους οποίους προέκυψαν, επιβεβαιώνονται ενεργειακά ως οι πιθανότεροι από τα αποτελέσματα υπολογισμών DFT μέσω της βάσης δεδομένων Mass Frontier (Σχήμα 9.2.3) (Bratakosetal., 2016a).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αρχική πρωτονίωση του μορίου της 2,5-δικετοπιπεραζίνης μπορεί να γίνει ή στο καρβονυλικό οξυγόνο ή στο άτομο αζώτου

του ετεροκυκλικού δακτυλίου της, δίνοντας αντιστοίχως O- ή N-πρωτονιωμένα παράγωγα (Guo et al., 2009). Στην προκειμένη και με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς, η απόσπαση της μοριακής μάζας 28 Da (C=O) από το μητρικό ιόν [MH⁺] προϋποθέτει τη διάσπαση του αμιδικού δεσμού του δακτυλίου, οπότε η αρχική πρωτονίωση του μορίου της 2,5-δικετοπιπεραζίνης αποδεικνύεται ότι έγινε στο άτομο του αζώτου του ετεροκυκλικού δακτυλίου της και όχι στο καρβονυλικό οξυγόνο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενη έρευνα, στην οποία αναφέρεται ότι ο αμιδικός δεσμός των 2,5-δικετοπιπεραζινών είναι σημαντικά ασθενέστερος στο N-πρωτονιωμένο παράγωγο έναντι του ουδέτερου μορίου (Furtado et al., 2007). Επιπλέον, αυτός ο μηχανισμός θραυσμάτωσης πιθανώς να σχετίζεται με τη σταθερότητα των υποκατάστατων των δύο ατόμων άνθρακα, στις θέσεις (3) και (6) του ετεροκυκλικού δακτυλίου της δικετοπιπεραζίνης (Furtado et al., 2007).

Το ιόν A παρήχθη με σχετική αφθονία 100% μόνο στις ενώσεις 1-6 της πρώτης και δεύτερης ομάδας, ενώ στις ενώσεις 7 και 8 ανιχνεύθηκε με σχετική αφθονία $\leq 3\%$.

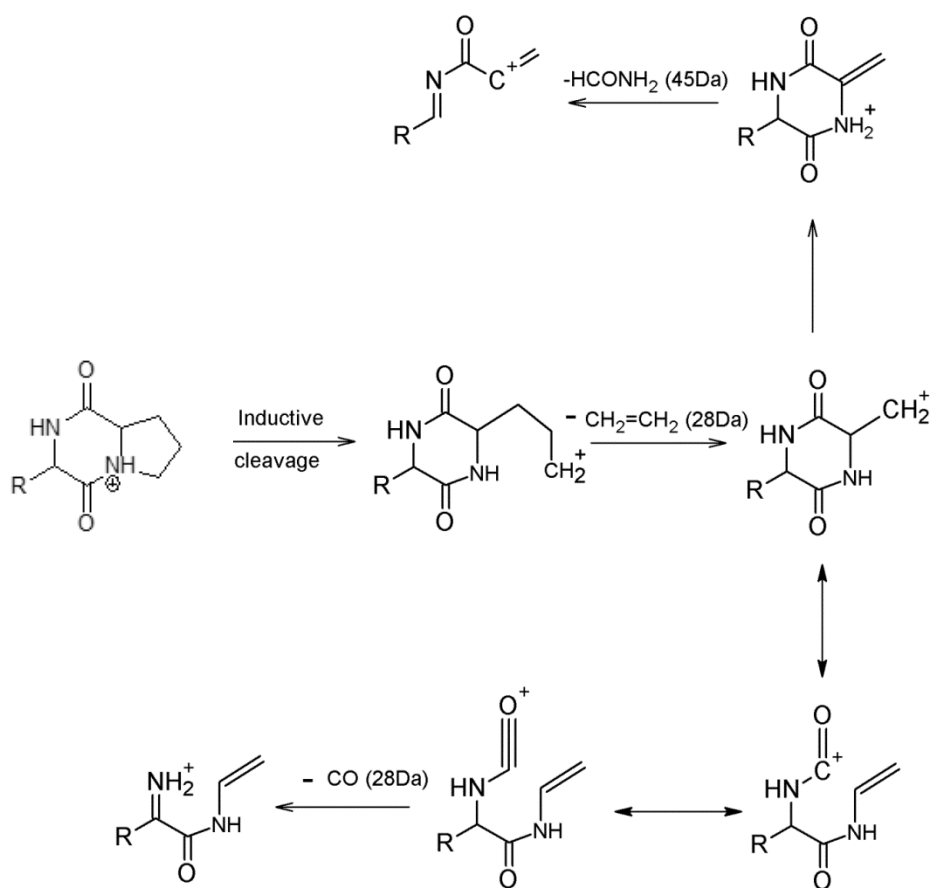
Το ιόν B παρήχθη από το μητρικό ιόν [MH⁺] μετά την απόσπαση ενός μορίου αμμωνίας μέσω ενός μηχανισμού αναδιάταξης (Σχήμα 9.2.2). Με βάση τον Πίνακα 9.2.1 η σχετική αφθονία του ιόντος B για τις ενώσεις cyclo(His-Phe) και cyclo(Tyr-Tyr) βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη (54 και 21%, αντιστοίχως) σε σχέση με τις υπόλοιπες δικετοπιπεραζίνες (Bratakosetal., 2016a).

Σύμφωνα με το Σχήμα 9.2.2 και όπως προαναφέρθηκε, το ιόν C παράγεται από το μητρικό ιόν απευθείας μέσω αποσπάσεως της ομάδας HCONH₂. Ειδικότερα για τις ενώσεις της πρώτης ομάδας (1-5), το ιόν C μπορεί να παραχθεί και μετά τη διαδοχική θραυσμάτωση του ιόντος A, μέσω αποσπάσεως ενός μορίου αμμωνίας, γεγονός που αποδεικνύει το φάσμα MS³ των ενώσεων (Πίνακας 9.2.2). Επιπροσθέτως, με βάση τον Πίνακα 9.2.1, η σχετική αφθονία του ιόντος C για τις ενώσεις cyclo(His-Phe) και cyclo(Leu-Phe) βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη (10 και 31%, αντιστοίχως) σε σχέση με τις υπόλοιπες δικετοπιπεραζίνες (Bratakosetal., 2016a).

Η απουσία της προλίνης και της θρυπτοφάνης από την δικετοπιπεραζίνη φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στο φάσμα μάζας, ως προς τον σχηματισμό του ιόντος D[MH⁺ - 73]. Ως εκ τούτου το ιόν D ανιχνεύθηκε στα διαδοχικά φάσματα MS² και

MS³ μόνο για τις ενώσεις της πρώτης ομάδας (1-5) και προέκυψε μέσω διαδοχικής αποσπάσεως των ομάδων C=O και HCONH₂ από το μητρικό ιόν [MH⁺] ή με απόσπαση της ομάδας HCONH₂ από ιόν A, αντιστοίχως (Σχήμα 9.2.2) (Bratakosetal., 2016a).

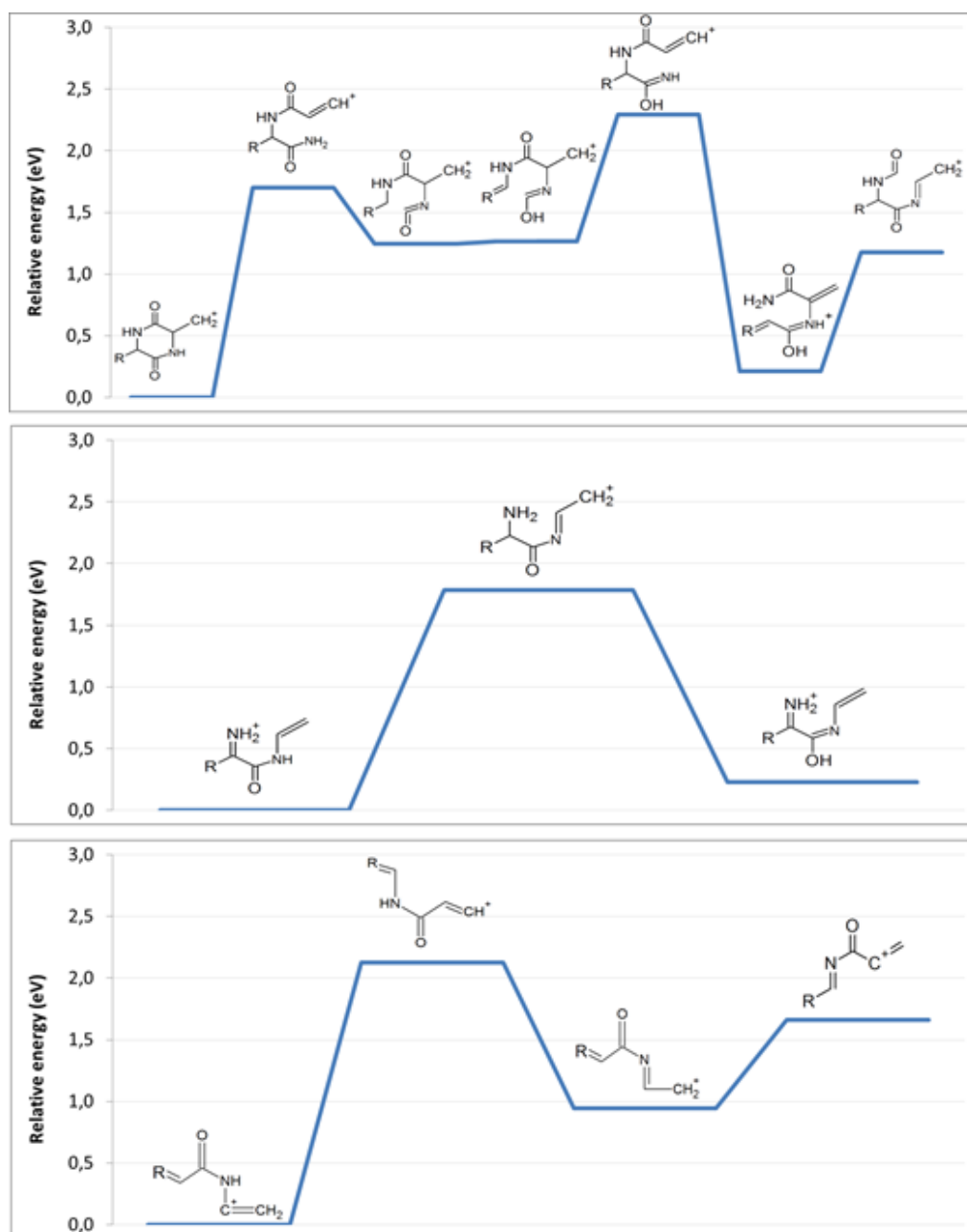
Όσον αφορά την cyclo(Phe-Pro) (ένωση 6) και σύμφωνα με το ESI-MS² φάσμα της, ο σχηματισμός του ιόντος A (σε σχετική αφθονία 100%) θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα δύο διαφορετικών μηχανισμών θραυσμάτωσης. Ο ένας είναι σε απόλυτη συμφωνία με τον μηχανισμό που προτείνεται για τις ενώσεις 1-5, δηλαδή μέσω της αποσπάσεως ενός C=O από το μητρικό ιόν [MH⁺]. Σύμφωνα με τον άλλο προτεινόμενο μηχανισμό, το ιόν A θα μπορούσε να παραχθεί μέσω της αποσπάσεως αιθενίου (C₂H₄) από το δακτύλιο της προλίνης του MH⁺ (Σχήμα 9.2.4) (Bratakosetal., 2016a).



Σχήμα 9.2.4 Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσμάτωσης αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν υποκαταστάτη προλίνη (ένωση 6).

Προκειμένου να διερευνηθεί καλύτερα ο παραπάνω προβληματισμός μελετήθηκε ο σχηματισμός του ιόντος D στην ένωση 6. Έτσι ενώ το ιόν D [$MH^+ - 73$] ανιχνεύθηκε στο ESI-MS³ της cyclo(Phe-Pro) ως η βασική και μοναδική κορυφή (με 100% σχετική αφθονία), δεν ανιχνεύθηκε καθόλου στο ESI-MS² φάσμα της ένωσης, σε πλήρη αντίθεση με τα ανάλογα ευρήματα για τις ενώσεις 1-5 (Πίνακες 9.2.1 και 9.2.2). Αν στην ένωση 6, το ιόν D προέκυπτε μέσω διαδοχικής αποσπάσεως των ομάδων C=O και HCONH₂ από το μητρικό ιόν [MH^+], τότε στο φάσμα ESI-MS² της ένωσης 6 θα έπρεπε να ανιχνευθούν όχι μόνο τα ιόντα A και C αλλά και το D. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στην διαπίστωση ότι το ιόν A, στην περίπτωση της ένωσης 6, είναι πολύ πιθανότερο να έχει προκύψει μέσω του μηχανισμού της επαγωγικής αποσπάσεως της ομάδας (C₂H₄) από το δακτύλιο της προλίνης, παρά του C=O από τον ετεροκυκλικό δακτύλιο της δικετοπιπεραζίνης. Στη συνέχεια το A [$MH^+ - 28(C_2H_2)$] χάνει μοριακή μάζα 45 Da (HCONH₂) και δίνει το ιόν D στο φάσμα ESI-MS₃. Έτσι το ιόν Δ για την ένωση 6 προκύπτει με διαφορετικό μηχανισμό (Σχήμα 9.2.4) σε σχέση με αυτόν που προτάθηκε για τις ενώσεις 1-5 (Σχήμα 9.2.2).

Ως εκ τούτου το μητρικό ιόν [MH^+] της ένωσης 6 φαίνεται ότι δεν μπορεί να παράγει το ιόν D κατά τη θραυσμάτωσή του, στις συνθήκες ιονισμού του πειράματος. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι στο φάσμα ESI-MS₂ της ένωσης 6 ανιχνεύθηκε ένα επιπλέον ιόν με μοριακή μάζα [$MH^+ - 56$], το οποίο προκύπτει από την διαδοχική απόσπαση των ομάδων (C₂H₄) και C=O από το μητρικό ιόν (Σχήμα 9.2.4). Το εύρημα αυτό αποτελεί μια επιπλέον επιβεβαίωση της αποσπάσεως του αιθενίου (C₂H₄) από το δακτύλιο της προλίνης του MH^+ . Και αυτό διότι αν το ιόν A προερχόταν από το μητρικό ιόν [MH^+] μέσω της αποσπάσεως ενός C=O, θα ήταν ενεργειακώς μη επιτρεπτή η διαδοχική απόσπαση και του δεύτερου C=O του ετεροκυκλικού δακτυλίου της δικετοπιπεραζίνης. Όλοι οι παραπάνω προτεινόμενοι μηχανισμοί όπως και οι δομές των ιόντων κατά τη διαδοχική θραυσμάτωση της ένωσης 6 (Σχήμα 9.2.4) επαληθεύονται πλήρως και από τα αποτελέσματα DFT (Σχήμα 9.2.5) (Bratakosetal., 2016a).

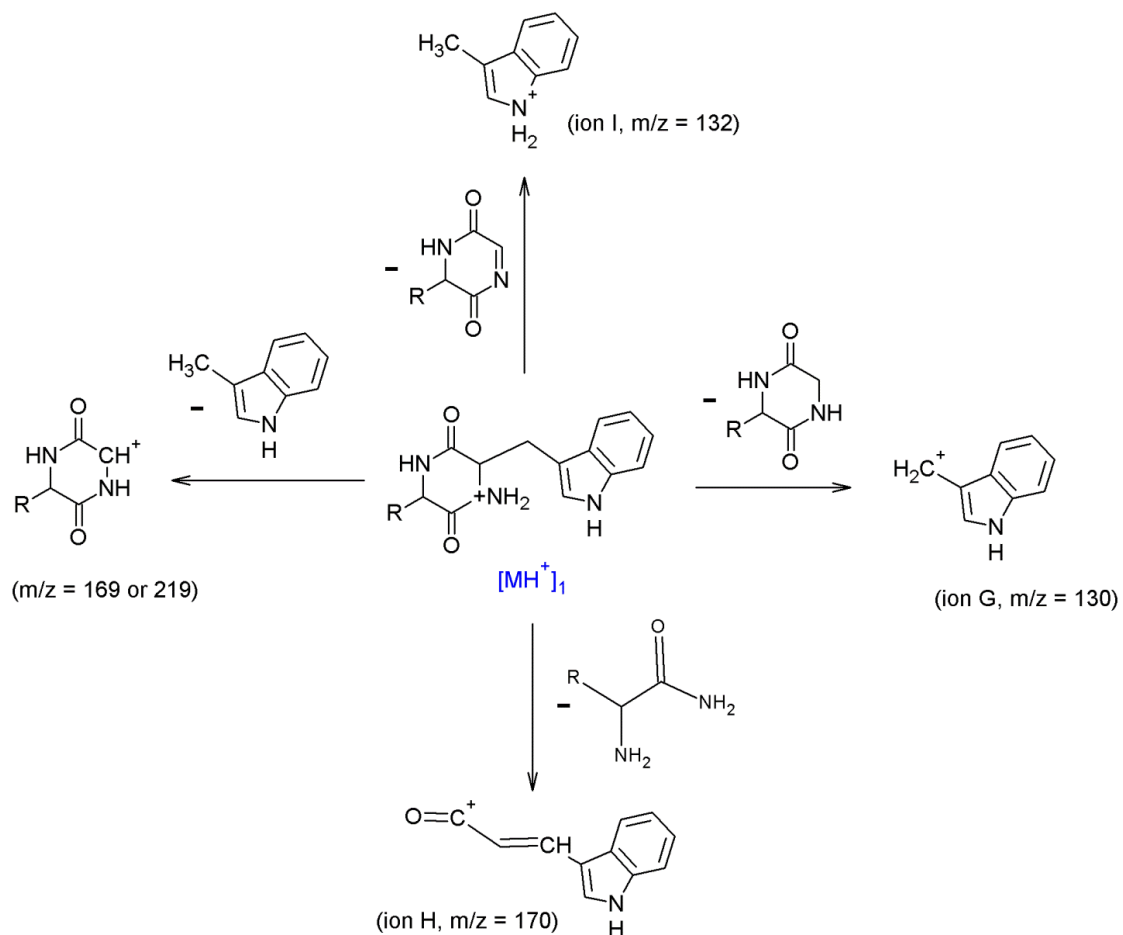


Σχήμα 9.2.5 Σχετικές ενέργειες από υπολογισμούς DFT των προτεινόμενων θετικών ιόντων αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν το αμινοξύ προλίνη σε σύγκριση με άλλες πιθανές δομές αυτών, όπως προέκυψαν από τη βάση δεδομένων Mass Frontier.

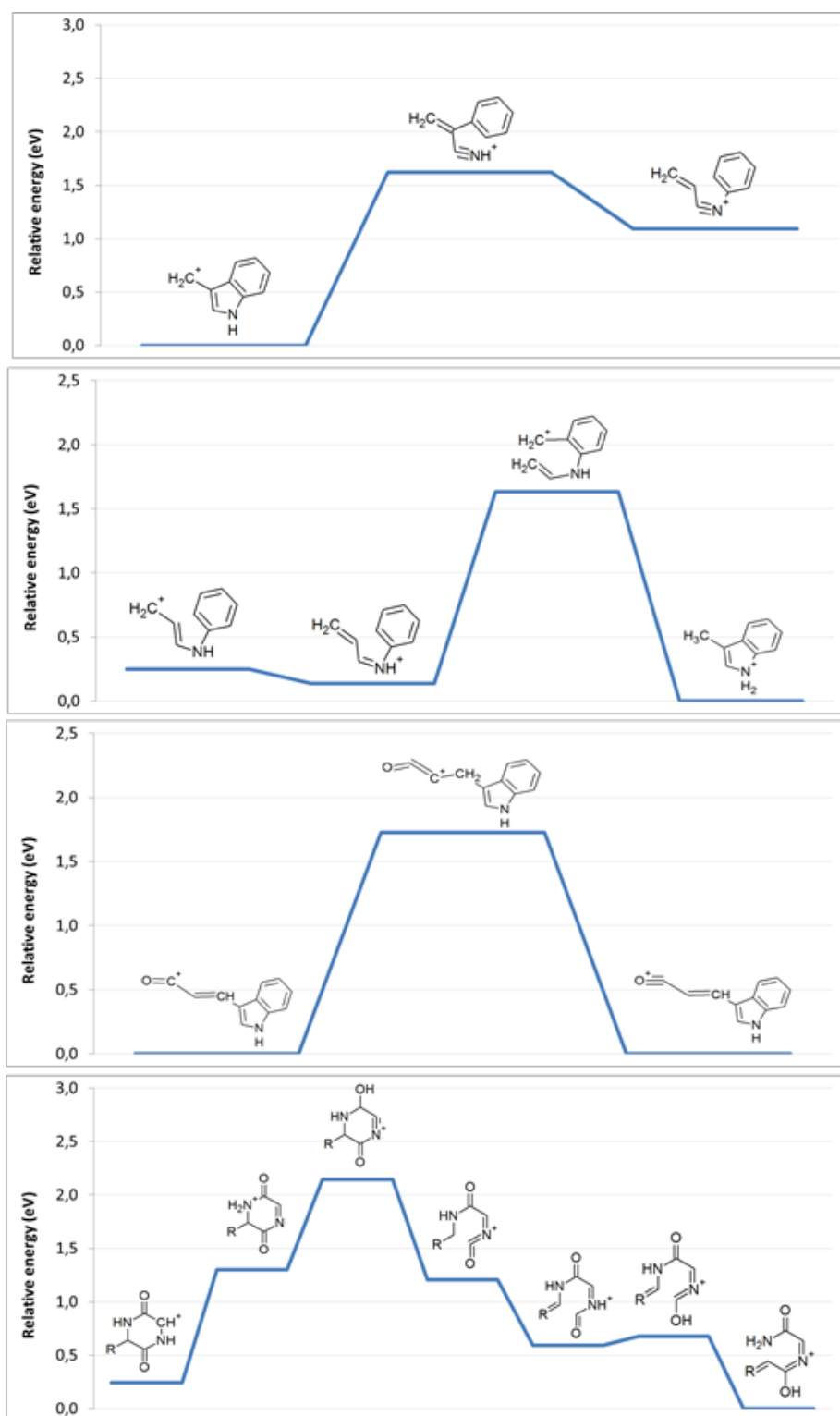
Από τη μελέτη των φασμάτων ESI-MS₂ των ενώσεων 7 και 8, φαίνεται ότι η παρουσία της θρυπτοφάνης επηρεάζει σημαντικά το μηχανισμό θραυσμάτωσής τους. Συγκεκριμένα, και σύμφωνα με το φάσμα ESI-MS² της cyclo(Leu-Trp) και της cyclo(Trp-Tyr), το ιόν A ανιχνεύθηκε σε πολύ μικρή σχετική αφθονία ($\leq 3\%$), σε σχέση με τις ενώσεις 1-6. Από το αποτέλεσμα αυτό απορρέει το συμπέρασμα ότι δεν ευνοείται η απόσπαση C=O από το μητρικό ιόν [MH⁺] των ενώσεων 7 και 8. Ως ιδιαίτερος σημαντικό εύρημα αναφέρεται η παραγωγή του ιόντος G (θετικό ιόν της 3-μεθυλενο-ινδόλης) με m/z 130 σε σχετική αφθονία 100% στο ESI-MS² φάσμα των ενώσεων 7 και 8, το οποίο προκύπτει από την απόσπαση της πλευρικής αλυσίδας της θρυπτοφάνης (Πίνακας 9.2.2). Επιπλέον το ιόν G προέρχεται από μητρικό ιόν [MH⁺] των ενώσεων 7 και 8 μέσω της απώλειας του υπόλοιπου σκελετού της DKP ως ουδετέρου μορίου (Σχήμα 9.2.6). Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα οι Guoetal. (2009) αναφέρουν ότι από την θραυσμάτωση της cyclo(Trp-Trp) παράγεται το θετικό ιόν της 3-μεθυλενο-ινδόλης με m/z 130 μέσω διαδοχικών αποσπάσεων ομάδων, το οποίο στη συνέχεια αναδιατάσσεται στο σταθερότερο ενεργειακά πρωτονιομένο ιόν της κινολίνης. Παράλληλα, αποσπάσθηκε η μοριακή μορφή του ιόντος G, δηλαδή η 3-μεθυλενο-ινδόλη, από τα μητρικά ιόντα [MH⁺] των ενώσεων 7 και 8, παράγοντας σε πολύ μικρότερη σχετική αφθονία (< 6%) τα ιόντα με m/z 219 και 169, για τις cyclo(Trp-Tyr) και cyclo(Leu-Trp) αντιστοίχως (Σχήμα 9.2.6). Επιπλέον στα φάσματα ESI-MS² των ενώσεων 7 και 8, ανιχνεύθηκαν τα χαρακτηριστικά ιόντα H (m/z 170) και I (m/z 132) σε μεγάλη σχετική αφθονία, τα οποία προέκυψαν από την απόσπαση ουδετέρων μοριακών ομάδων από το N-πρωτονιωμένο ιόν [MH⁺]. Το ιόν H αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο ιόν της 3-(3-ινδολ)-προπενόλης, ενώ το ιόν I στο πρωτονιωμένο ιόν της 3-μεθυλο-ινδόλης (Σχήμα 9.2.6). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα επαληθεύονται πλήρως και από τα αποτελέσματα DFT (Σχήμα 9.2.7), υποδεικνύοντας ότι οι DKP που περιέχουν θρυπτοφάνη ακολουθούν ένα συγκεκριμένο μηχανισμό θραυσμάτωσης, σύμφωνα με τον οποίο ευνοείται η απόσπαση της πλευρικής αλυσίδας της θρυπτοφάνης απ' ευθείας από το μητρικό ιόν (Bratakosetal., 2016a).

Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι οι ενώσεις 7 και 8, σε αντίθεση με όλες τις άλλες, δεν έδωσαν φάσματα MS³ και MS⁴. Το εύρημα αυτό αιτιολογείται από το

γεγονός ότι το κύριο θραύσμα G το οποίο είναι η πλευρική αλυσίδα της θρυπτοφάνης, δεν μπορεί να θραυσματοποιηθεί περαιτέρω.

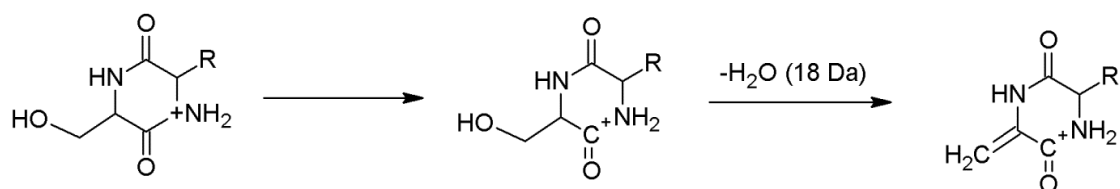


Σχήμα 9.2.6 Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσμάτωσης αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν το αμινοξύ θρυπτοφάνη (ενώσεις 7 και 8).

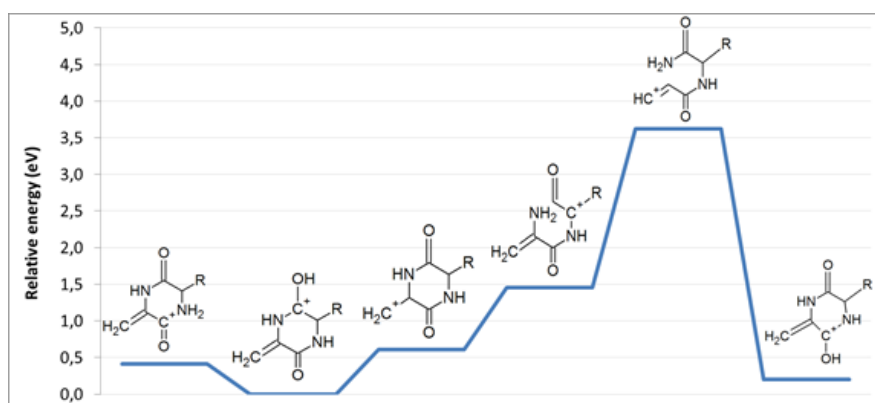


Σχήμα 9.2.7 Σχετικές ενέργειες από υπολογισμούς DFT των προτεινόμενων θετικών ιόντων αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν υποκαταστάτη θρυπτοφάνη σε σύγκριση με άλλες πιθανές δομές αυτών, όπως προέκυψαν από τη βάση δεδομένων Mass Frontier.

Πέρα από τα αποτελέσματα που αφορούν τις τρεις κύριες ομάδες των αρωματικών DKP που μελετήθηκαν, προέκυψαν και κάποιες ειδικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με την παρουσία συγκεκριμένων αμινοξέων. Έτσι ανιχνεύθηκε θετικό ιόν, το οποίο προέκυψε από την απόσπαση ενός μορίου H_2O από το μητρικό ιόν $[\text{MH}^+]$ των DKP που περιέχουν το αμινοξύ σερίνη (ενώσεις 2 και 5). Το εύρημα αυτό πιθανόν σχετίζεται με την απόσπαση μορίου H_2O μετά την πρωτονίωση της ομάδας υδροξυλίου της σερίνης (Σχήματα 9.2.8 και 9.2.9). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό διότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της σερίνης ως τμήμα ενός μορίου DKP.

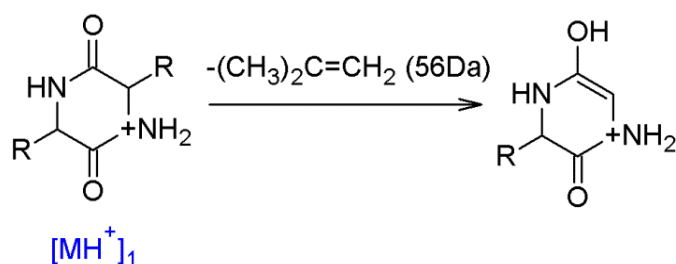


Σχήμα 9.2.8 Προτεινόμενος μηχανισμός αποσπάσεως μορίου νερού από το μητρικό ιόν αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν υποκαταστάτη σερίνη.

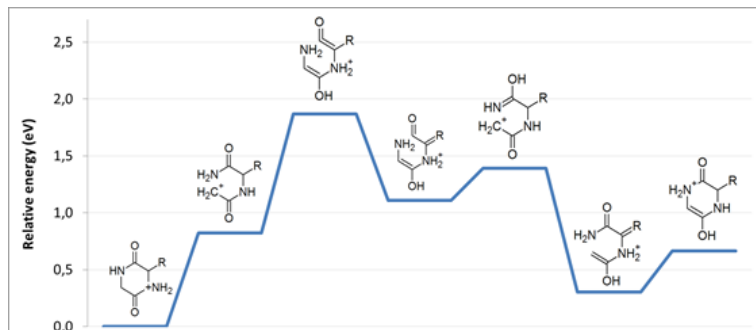


Σχήμα 9.2.9 Σχετικές ενέργειες από υπολογισμούς DFT του προτεινόμενου θετικού ιόντος αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν υποκαταστάτη σερίνη σε σύγκριση με άλλες πιθανές δομές αυτών, όπως προέκυψαν από τη βάση δεδομένων Mass Frontier.

Επίσης ανιχνεύθηκε θετικό ιόν, το οποίο προέκυψε από την απώλεια μοριακής μάζας 56Da από το μητρικό ιόν $[MH^+]$ της DKP που περιέχει το αμινοξύ λευκίνη (ένωση 3). Η παραπάνω μοριακή μάζα των 56Da αντιστοιχεί στο ακόρεστο μοριακό ανάλογο της λευκίνης $((CH_3)_2C=CH_2)$ (Σχήματα 9.2.10 και 9.2.11) και ως εύρημα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της λευκίνης ως υποκαταστάτη μορίου DKP.



Σχήμα 9.2.10 Προτεινόμενος μηχανισμός αποσπάσεως του ακόρεστου μοριακού αναλόγου της λευκίνης από το μητρικό ιόν αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν υποκαταστάτη λευκίνη.



Σχήμα 9.2.11 Σχετικές ενέργειες από υπολογισμούς DFT του προτεινόμενου θετικού ιόντος αρωματικών 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν το αμινοξύ λευκίνη σε σύγκριση με άλλες πιθανές δομές αυτών, όπως προέκυψαν από τη βάση δεδομένων Mass Frontier.

Από τη μελέτη όλων των φασμάτων μάζας ESI-MSⁿ των DKP (Πίνακες 9.2.1 και 9.2.2) και ειδικά των ενώσεων 1-5 και 6 προέκυψαν χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα επιμέρους αμινοξέα τους. Αυτά τα ιόντα θα μπορούσαν να

χρησιμοποιηθούν ως χαρακτηριστικά ιόντα (διαγνωστικά ιόντα) για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης συγκεκριμένων αμινοξέων υποκαταστατών σε μόριο DKP. Έτσι στα φάσματα ESI-MS² ή / και ESI-MS³ των DKP ανιχνεύθηκαν θετικά ιόντα που αντιστοιχούν στις δομές των ιόντων E [αμινοξύ - 45 (CO₂H)] (ανιχνεύθηκε σε όλες τις περιπτώσεις) και F [αμινοξύ - 17 (OH)].

Προκειμένου για τις ενώσεις 1-5, το ιόν E παράγεται είτε από το ιόν A μέσω της διάσπασης του δεσμού του καρβονυλικού άνθρακα και του διαδοχικού ατόμου άνθρακα στον δακτύλιο της δικετοπιπεραζίνης, αποτέλεσμα που είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα των Guo et al. (2009), είτε από το μητρικό ιόν [MH⁺] αφού πρώτα αποσπασθεί η ομάδα C=O. Το ιόν E αντιστοιχεί στο θετικό ιόν του υποκαταστάτη αμινοξέος της DKP μετά από την απώλεια της ομάδας του COOH. Ο παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός επιβεβαιώνεται από τις ακόλουθες επισημάνσεις: α) το ιόν E ανιχνεύεται και στο φάσμα ESI-MS² και στο ESI-MS³ σε σχετικά υψηλές αφθονίες, β) στο φάσμα ESI-MS² το ιόν E προέρχεται από το μητρικό ιόν [MH⁺] και γ) στο φάσμα ESI-MS³ το ιόν E προέρχεται από το μέγιστης αφθονίας θυγατρικό ιόν A (Bratakosetal., 2016a).

Το ιόν F αντιστοιχεί στο θετικό ιόν του αμινοξέος της DKP μετά από την απώλεια της ομάδας του OH και πιθανώς παράγεται από το μητρικό ιόν [MH⁺], μέσω της διάσπασης και των δύο πεπτιδικών δεσμών της DKP με την ταυτόχρονη απώλεια του μοριακού υπολείμματος του άλλου υποκαταστάτη αμινοξέος. Ο προτεινόμενος αυτός μηχανισμός συμφωνεί με τα ευρήματα των Guo et al. (2009). Επιπλέον ο μηχανισμός αυτός επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση ότι το ιόν F ανιχνεύεται μόνο σε ESI-MS² φάσματα και μόνο σε μερικές περιπτώσεις. Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση, που επιβεβαιώνει τον παραπάνω μηχανισμό, είναι ότι ενώ για κάθε DKP μπορούν να προκύψουν δύο ιόντα E και για τα δύο αντίστοιχα αμινοξέα της, ανιχνεύεται μόνο ένα ιόν F. Επιπλέον στην περίπτωση των DKP που περιέχουν σερίνη, το ιόν F δεν ανιχνεύεται πιθανώς εξαιτίας της απόσπασης ενός μορίου νερού που έχει προηγηθεί (Σχήμα 9.2.5) (Bratakosetal., 2016a).

Όσον αφορά την ένωση 6, το ιόν E προκύπτει μόνο από το μητρικό ιόν [MH⁺] μέσω της διαδοχικής απόσπασης του C=O και της διάσπασης του δεσμού του καρβονυλικού άνθρακα και του διαδοχικού ατόμου άνθρακα στον δακτύλιο της

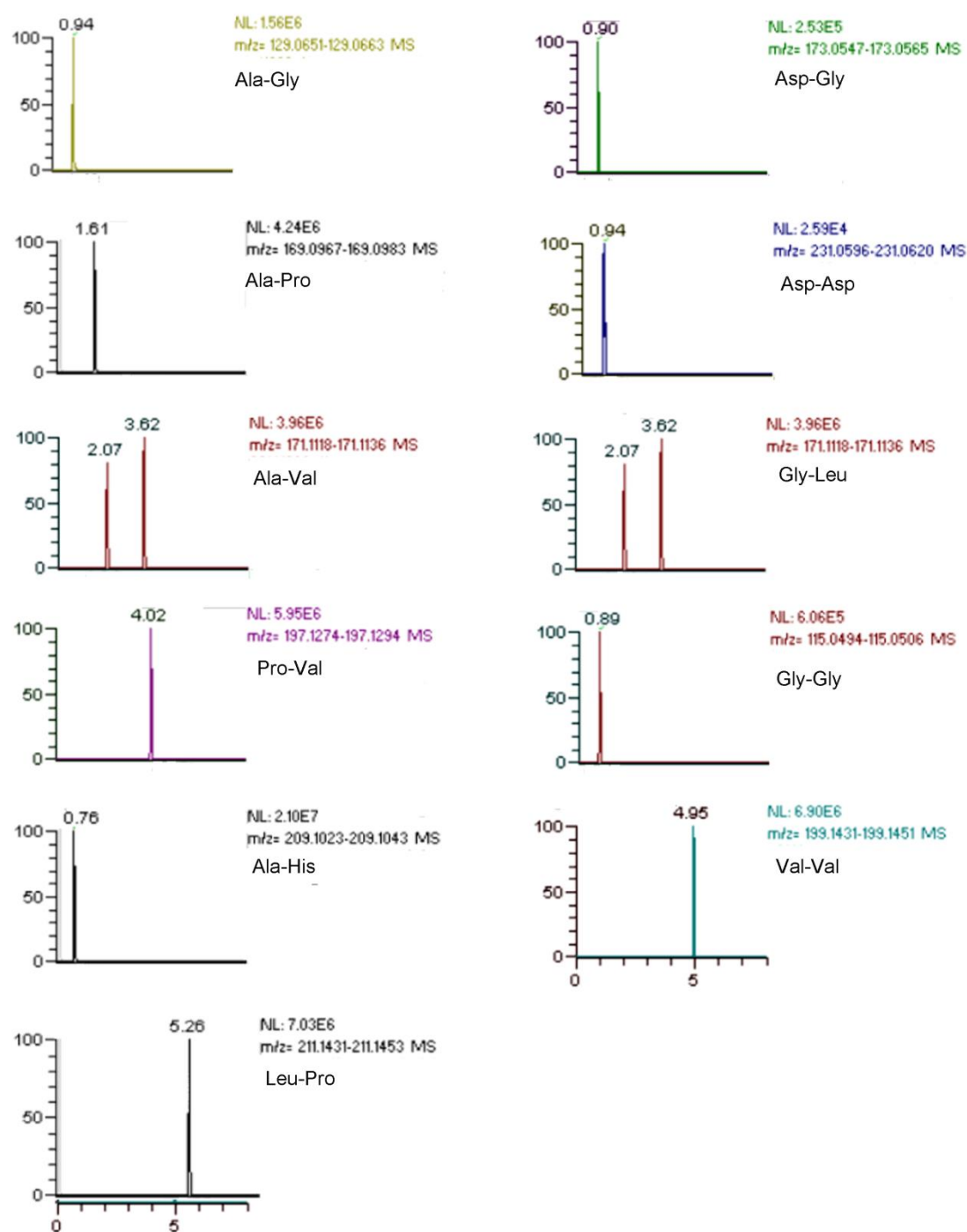
δικετοπιπεραζίνης. Το συμπέρασμα αυτό απορρέει από την ανίχνευση του ιόντος E μόνο στο ESI-MS² φάσμα και όχι στο ESI-MS³. Επίσης στην ένωση 6, ο σχηματισμός του ιόντος F περιγράφεται με τον ίδιο μηχανισμό που αναπτύχθηκε παραπάνω για τις ενώσεις 1-5.

Αναφορικά με την cyclo(Trp-Tyr) (ένωση 7), ο σχηματισμός του ιόντος E με m/z 136 [τυροσίνη- 45 (CO₂H)] περιγράφεται με τον ίδιο μηχανισμό που αναπτύχθηκε παραπάνω για τις ενώσεις 1-5.

Στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά παραδείγματα ανίχνευσης των ιόντων E και F. Έτσι στις DKP που περιέχουν ιστιδίνη ανιχνεύθηκαν μοριακές μάζες 138 και 110 Da, ενώ για τις DKP που περιέχουν φαινυλαλανίνη ανιχνεύθηκαν μοριακές μάζες 148 και 120 Da, για τα ιόντα F και E αντιστοίχως. Επίσης το θραύσμα σε m/z 86 (ιόν E) αντιστοιχεί στην λευκίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO₂H. Επιπλέον τα θραύσματα σε m/z 98 και 70 αντιστοιχούν στην προλίνη μετά από την απώλεια HO και CO₂H, αντιστοίχως. Η ανίχνευση των παραπάνω χαρακτηριστικών θραυσμάτων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα εξαιρετικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των αμινοξέων υποκαταστατών σε μόρια δικετοπιπεραζινών και κατ' επέκταση τη αναγνώριση αυτών (Bratakosetal., 2016a).

9.3. ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΟΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

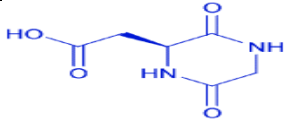
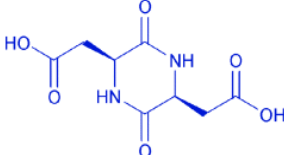
Χαρακτηρίστηκαν έντεκα (11) πρότυπες 2,5-δικετοπιπεραζίνες (DKP) που περιείχαν αλειφατικά αμινοξέα. Οι αλειφατικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες ήταν οι ακόλουθες: cyclo(Ala-Gly), cyclo-D-(Ala-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Pro-Val), cyclo(Ala-His), cyclo(Leu-Pro), cyclo(Asp-Gly), cyclo(Asp-Asp), cyclo(Val-Val), cyclo(Gly-Leu), και cyclo(Gly-Gly). Η χρωματογραφική μέθοδος που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού των παραπάνω 11 ενώσεων σε χρόνο λιγότερο από 7 min. Στο Σχήμα 9.3.1 παρατίθεται το χρωματογράφημα των έντεκα προτύπων αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών.

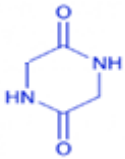
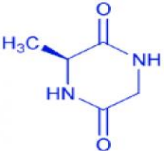
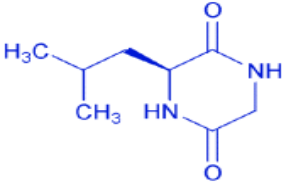


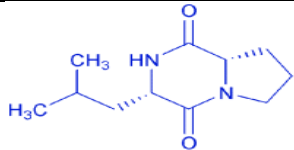
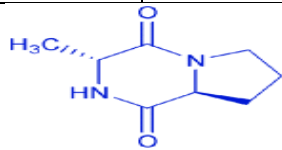
Σχήμα 9.3.1 LC χρωματογράφημα των αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

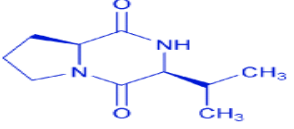
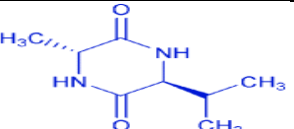
Οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων των προτύπων των αλειφατικών 2,5-δικοπιπεραζινών (DKPS) όπως προσδιορίστηκαν από το φάσμα ESI-MS¹ με υψηλή διακριτική ικανότητα καθώς και οι μοριακές μάζες των ιόντων με την μεγαλύτερη σχετική αφθονία που παράγονται κατά τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS²), παρατίθενται στον Πίνακα 9.3.1. Επίσης οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων των προτύπων των 2,5-δικοπιπεραζινών (DKPS) όπως προσδιορίστηκαν από το φάσμα ESI-MS¹ με υψηλή διακριτική ικανότητα και επίσης εκφρασμένες σε μονο-ισοτοπική και φυσικής αφθονίας βάση, καθώς και οι μοριακές μάζες των ιόντων με την σχετική αφθονία τους που παράγονται κατά τις διαδοχικές θραυσματώσεις (MSⁿ), παρατίθενται στον Πίνακα 9.3.2. Για όλες τις πρότυπες ενώσεις οι πειραματικές μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων τους ήταν σε πολύ καλή συμφωνία με τις θεωρητικές μονο-ισοτοπικές μάζες, εμφανίζοντας σφάλμα ίσο ή μικρότερο των 4.3 ppm (Πίνακας 9.3.2), επιβεβαιώνοντας έτσι τη στοιχειακή τους σύσταση.

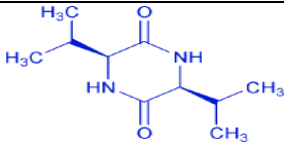
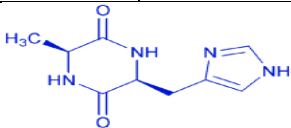
Πίνακας 9.3.1ESI-MS και MS² δεδομένα των αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

	Μητρικό τόν	A	B	C	D			F	E
2,5-DKP	MH ⁺	MH ⁺ - 28(C=O)	MH ⁺ - 17 (NH ₃)	MH ⁺ - 45(HCONH ₂)	MH ⁺ -28(C=O) - 45(HCONH ₂)	MH ⁺ - 2x28 (C=O)	MH ⁺ - 18(H ₂ O)	αμινοξύ- HO	αμινοξύ- CO ₂ H
Cyclo Asp-Gly C ₆ H ₈ N ₂ O ₄								Gly	
a	173.0557						155.0315 (100)	58.0322	
b 172.1390	173.1469						155.1317	58.0593	
c172.0484	173.0562						155.0457	58.0292	
Cyclo Asp-Asp C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₆									
a	231.0612						213.1090 (100)		
b230.1752	231.1831						213.1679		
c230.0538	231.0617						213.0511		

Cyclo Gly-Gly C ₄ H ₆ N ₂ O ₂									
a	115.0502	87.0672 (100)	98.1040 (8)	70.0013 (10)		59.1112 (8)	97.0712 (60)		
b114.1029	115.1108	87.1006	98.1034	70.0701		59.0905	97.0955		
c114.0429	115.0507	87.0558	98.0480	70.0292		59.0609	97.0402		
Cyclo Ala-Gly C ₅ H ₈ N ₂ O ₂								Ala	
a	129.0659	101.0613 (100)	112.0046 (10)	84.0611 (24)			111.0544 (3)	72.0859	
b128.1295	129.1374	101.1273	112.1301	84.0967			111.1222	72.0860	
c128.0586	129.0664	101.0714	112.0636	84.0449			111.0558	72.0449	
Cyclo Gly-Leu C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂								Leu	Leu
a	171.1128	143.1320 (62)	154.0612 (9)	126.0928 (100)	98.1434 (7)	115.0976 (45)	153.1334 (4)	114.1421 (11)	86.1315 (47)
b170.2093	171.2172	143.2071	154.2099	126.1765	98.1664	115.1970	153.2020	114.1658	86.1557

c170.1055	171.1133	143.1184	154.1106	126.0918	98.0970	115.12352	153.1028	114.0919	86.0970
Cyclo Leu-Pro $C_{11}H_{18}N_2O_2$								Pro	Pro
a	211.1441	183.1413 (100)	194.0910 (23)	166.0809 (5)	138.1223 (7)	155.0913 (11)		98.1514 (2)	70.0447 (35)
b 210.2733	211.2812	183.2711	194.2739		138.2304	155.2610		98.1233	70.1132
c 210.1368	211.1446	183.1497	194.1419		138.1283	155.1548		98.0606	70.0657
								Leu	Leu
								114.1499 (1)	86.0968 (61)
								114.1658	86.1557
								114.0919	86.0970
Cyclo D-Ala-Pro $C_8H_{12}N_2O_2$									Pro
a	169.0972	141.0882 (57)	152.0715 (19)	124.0725 (24)	96.1284 (1)	113.1010 (1)			70.0447 (100)
b168.1934	169.2014	141.1912	152.1940	124.1607	96.1506	113.1811			70.1132
c168.0898	169.0977	141.1027	152.0949	124.0762	96.0813	113.1079			70.0657

Cyclo Pro-Val C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂								Pro	Pro
a	197.1285	169.1190 (100)	180.0976 (11)	152.0709 (2)	124.1116 (4)	141.1104 (10)		98.1453 (1)	70.0441 (14)
b196.2467	197.2546	169.2445	180.2473		124.2038	141.2343		98.1233	70.1132
c 196.1211	197.1290	169.1340	180.1262		124.1126	141.1392		98.0606	70.0657
									Val
									72.1231
									72.1291
									72.0813
Cyclo-D-Ala-Val C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂								Ala	Val
a	171.1128	143.0985 (100)	154.0624 (2)	126.0907 (89)	98.1011 (2)	115.1476 (1)		72.0634 (41)	72.0634 (41)
b170.2093	171.2172	143.2071		126.1765	98.1664	115.1970		72.0860	72.1291
c170.1055	171.1133	143.1184		126.0919	98.0970	115.1235		72.0449	72.0813

Cyclo Val-Val C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₂									Val
a	199.1441	171.1223 (100)	182.1811 (1)	154.1027 (32)	126.1556 (7)	143.2778 (1)			72.0649 (12)
b198.2625	199.2705	171.2603		154.2298	126.2197	143.2502			72.1291
c198.1368	199.1446	171.1497		154.1231	126.1283	143.1548			72.0813
Cyclo Ala-His C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₂								His	His
a	209.1033	181.0961 (100)	192.0390 (54)	164.0602 (20)	136.1273 (12)			138.0374 (3)	110.0842 (7)
b208.2177	209.2256	181.2155	192.2183	164.1849	136.1748			138.1476	110.1374
c 208.0960	209.1038	181.1089	192.1011	164.0824	136.0875			138.0667	110.0718

α: μοριακή μάζα πειραματική; β: μοριακή μάζα με βάση τη φυσική αφθονία; γ: μονο-ισοτοπική μοριακή μάζα. Η φυσική και μονο-ισοτοπική μοριακή μάζα υπολογίσθηκαν με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος MolecularMassCalculator (http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol_mass.php). Οι σχετικές αφθονίες των θετικών ιόντων δίνονται % μέσα σε παρένθεση.

Πίνακας 9.3.2ESI-MSⁿδεδομένα των αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

2,5-DKP	Rt	ms ¹ (MH ⁺) πειραματικό m/z	ms ¹ (MH ⁺) θεωρητικό m/z	Σφάλμα (ppm)	ms ²	ms ³	ms ⁴
Cyclo Asp-Gly C ₆ H ₈ N ₂ O ₄	0.90	173.0557	173.0562	2.9	155.0346 (100) , 150.0706 (1), 131.9429 (16).	127.0326 (95), 113.0309 (100) , 99.1152 (15), 85.0943 (89).	85.0157 (100).
Cyclo Asp-Asp C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₆	0.94	231.0612	231.0617	1.6	213.1090 (100) , 195.1009 (1), 188.9608 (2), 171.9804 (1), 170.9812 (7).	195.0423 (100) , 171.1012 (1).	167.0123 (39), 153.0367 (19), 125.0552 (100) , 124.1182 (41), 98.1082 (23).
Cyclo Gly-Gly C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	0.89	115.0502	115.0507	4.3	98.0334 (8), 97.0712 (60), 94.3567 (16), 91.0116 (8), 87.0457 (100) , 80.1424 (6), 73.0671 (9), 70.9500 (10), 70.0013 (10), 69.0569 (13), 59.1112 (8)	59.0034 (100).	
Cyclo Ala-Gly C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	0.94	129.0659	129.0664	3.9	112.0046 (10), 111.0544 (3), 101.0724 (100) , 100.1613	83.9935 (100).	

					(1),84.0611 (24), 83.1568 (1).		
Cyclo Gly-Leu C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	3.62	171.1128	171.1133	2.9	154.0612 (9), 153.1334 (4), 143.1320 (62), 126.0928 (100) , 115.0976 (45), 114.1421 (11), 98.1434 (7), 87.0809 (19), 86.1315 (47).	108.0710 (33), 98.0099 (100) , 95.0734 (28), 81.1217 (25), 69.1115 (8).	83.1423 (43), 81.0718 (36), 70.1710 (31), 69.0567 (65), 67.1443 (42), 55.9808 (100) .
Cyclo Leu-Pro C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	5.26	211.1441	211.1446	2.4	194.0910 (23), 183.1413 (100) , 166.0809 (5), 155.0913 (11), 138.1223 (7), 127.0902 (4), 114.1499 (1), 98.1514 (2), 86.0968 (61), 70.0447 (35).	166.1104 (1), 165.1234 (4), 156.0789 (3), 155.0913 (94), 138.1223 (100) , 127.0902 (41), 110.2324 (1), 98.2212 (2), 86.0968 (11), 70.0447 (2).	123.0332 (74), 110.2324 (1), 108.0232 (25), 96.1112 (42), 95.1807 (10), 82.1414 (74), 70.0447 (100) .
Cyclo D-Ala-Pro C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	1.61	169.0972	169.0977	3.0	152.0715 (19), 141.0882 (57), 124.0725 (24), 113.1010 (1), 96.1284 (1), 70.0447 (100) .	-	-
Cyclo Pro-Val C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	4.02	197.1285	197.1290	2.5	180.0976 (11), 169.1190 (100) , 155.9611 (6), 152.0709 (2), 141.1104 (10), 124.1116 (4),	152.1009 (1), 141.1113 (100) , 124.1116 (92), 72.0719 (4), 70.0441 (4).	124.1116 (100) , 112.2508 (4), 70.0441 (5).

					98.1453 (1), 72.0719 (6), 70.0441 (14).		
Cyclo-D-Ala-Val $C_8H_{12}N_2O_2$	2.07	171.1128	169.0977	2.9	154.0624 (2), 143.0985 (100) , 126.0907 (89), 115.1476 (1), 98.1011 (2), 72.0634 (41).	126.0007 (1), 115.0520 (11), 98.1096 (39), 72.1565 (100) .	54.9810 (100).
Cyclo Val-Val $C_{10}H_{18}N_2O_2$	4.95	199.1441	199.1446	2.5	182.1811 (1), 171.1223 (100) , 154.1027 (32), 143.2778 (1), 126.1556 (7), 72.0649 (12).	154.1205 (2), 126.1556 (100) , 72.0649 (91).	109.1594 (100) , 83.1121 (7), 70.0998 (85), 96.1712 (22), 67.1334 (27), 58.1351 (24).
Cyclo Ala-His $C_9H_{12}N_4O_2$	0.76	209.1033	209.1038	2.4	192.0390 (54), 181.0961 (100) , 166.0396 (37), 164.0602 (20), 138.0374 (3), 136.1273 (12), 110.0842 (7), 83.1900 (1).	164.0850 (97), 138.1143 (35), 136.2480 (100) , 111.0262 (5), 110.3331 (58),	-

Τα κύρια θραύσματα σημειώνονται με στικτή γραμματοσειρά. Οι σχετικές αφθονίες των θετικών ιόντων δίνονται % μέσα σε παρένθεση

Με βάση τη συγκριτική μελέτη των διαδοχικών φασμάτων μάζας (Παράρτημα II) προκύπτει ότι και οι πρότυπες αλειφατικές δικετοπιπεραζίνες ταξινομούνται σε κατηγορίες αναλόγως με τον μηχανισμό που γίνεται η θραυσμάτωση, ο οποίος σχετίζεται άμεσα με το είδος των αμινοξέων που αποτελούν τις δικετοπιπεραζίνες, γεγονός που είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα ευρήματα για τις αρωματικές δικετοπιπεραζίνες. Ως εκ τούτου, μια κατηγορία περιλαμβάνει 2,5-δικετοπιπεραζίνες οι οποίες περιέχουν D-ασπαρτικό οξύ [πρότυπες ενώσεις: cyclo(Asp-Gly), cyclo(Asp-Asp)], μία δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες περιέχουν γλυκίνη [πρότυπες ενώσεις: cyclo(Ala-Gly), cyclo(Gly-Leu), cyclo(Gly-Gly)] και όλες οι υπόλοιπες αρχικώς εντάσσονται σε μία τρίτη κατηγορία [πρότυπες ενώσεις: cyclo-D-(Ala-Pro), cyclo(Pro-Val), cyclo(Leu-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Val-Val), cyclo(Ala-His)].

Όλες οι πρότυπες αλειφατικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες, εκτός αυτών που περιέχουν D-ασπαρτικό οξύ, ακολουθούν κοινό τρόπο θραυσμάτωσης, τόσο μεταξύ τους όσο και με τις αρωματικές ενώσεις cyclo(His-Phe), cyclo(Phe-Ser), cyclo(Leu-Phe), cyclo(Phe-Phe), cyclo(Ser-Tyr) και cyclo(Phe-Pro), μέσω του σχηματισμού των προϊόντων ιόντων A [$MH^+ - 28$], B [$MH^+ - 17$] και C [$MH^+ - 45$] στο MS^2 φάσμα τους, τα οποία προέρχονται από τη θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος (MH^+) (Σχήματα 9.2.2 και 9.2.3).

Το ιόν A παρήχθη με σχετική αφθονία 100% στις ενώσεις cyclo(Ala-Gly), cyclo(Gly-Gly), cyclo(Pro-Val), cyclo(Leu-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Val-Val) και cyclo(Ala-His), ενώ στις ενώσεις cyclo(Gly-Leu) και cyclo-D-(Ala-Pro) ανιχνεύθηκε με σχετική αφθονία 62 και 57%, αντιστοίχως.

Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα ως προς την σχετική αφθονία του ιόντος B, το οποίο προκύπτει από το μητρικό ιόν [MH^+] μετά την απόσπαση ενός μορίου αμμωνίας μέσω ενός μηχανισμού αναδιάταξης βήτα υδρογόνου (Σχήμα 9.2.2). Με βάση τον Πίνακα 9.3.1 η σχετική αφθονία του ιόντος B για τις ενώσεις cyclo(Gly-Leu) και cyclo-D-(Ala-Pro) βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη (23 και 19%, αντιστοίχως) σε σχέση με τις υπόλοιπες δικετοπιπεραζίνες. Επίσης τη μέγιστη αφθονία για το ιόν B (54%) την έδωσε η cyclo(Ala-His).

Το ιόν C το οποίο παράγεται απευθείας από το μητρικό ιόν μέσω αποσπάσεως της ομάδας HCONH_2 (Σχήμα 9.2.2), παρήχθη με σχετική αφθονία 100% για την ένωση $\text{cyclo}(\text{Gly-Leu})$, ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις ανιχνεύθηκε σε μικρότερες σχετικές αφθονίες. Ειδικότερα για τις ενώσεις $\text{cyclo}(\text{Ala-Gly})$, $\text{cyclo}(\text{Pro-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Leu-Pro})$, $\text{cyclo-D}-(\text{Ala-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Val-Val})$ και $\text{cyclo}(\text{Ala-His})$, των οποίων το ιόν A παράχθηκε με σχετική αφθονία 100%, το ιόν C μπορεί να παραχθεί και μετά τη διαδοχική θραυσμάτωση του ιόντος A, μέσω αποσπάσεως ενός μορίου αμμωνίας, γεγονός που αποδεικνύεται από το φάσμα MS_3 των ενώσεων αυτών (Πίνακες 9.3.1 και 9.3.2). Εξάιρεση αποτελεί η $\text{cyclo}(\text{Gly-Gly})$, για την οποία δεν ανιχνεύθηκε το ιόν C στο MS^3 φάσμα της (Πίνακας 9.3.2). Επιπροσθέτως, με βάση τον Πίνακα 9.3.2, η σχετική αφθονία του ιόντος C στο MS^3 φάσμα της ένωσης $\text{cyclo}(\text{Ala-His})$ βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη (97%) σε σχέση με τις υπόλοιπες δικετοπιπεραζίνες ($\leq 2\%$).

Το ιόν D [$\text{MH}^+ - 73$] ανιχνεύθηκε στα διαδοχικά φάσματα MS^2 και MS^3 μόνο για τις ενώσεις $\text{cyclo}(\text{Pro-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Leu-Pro})$, $\text{cyclo-D}-(\text{Ala-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Val-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Ala-His})$, $\text{cyclo}(\text{Gly-Leu})$ και $\text{cyclo-D}-(\text{Ala-Pro})$ και προέκυψε μέσω διαδοχικής αποσπάσεως των ομάδων C=O και HCONH_2 από το μητρικό ιόν [MH^+] ή με απόσπαση της ομάδας HCONH_2 από ιόν A, αντιστοίχως (Σχήμα 9.2.2). Αξιοσημείωτο είναι το ότι στο MS^3 φάσμα των ενώσεων $\text{cyclo}(\text{Leu-Pro})$, $\text{cyclo}(\text{Val-Val})$, $\text{cyclo}(\text{Ala-His})$ και $\text{cyclo}(\text{Gly-Leu})$ η σχετική αφθονία του ιόντος D ήταν 100%. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι το ιόν D δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα διαδοχικά φάσματα MS^2 και MS^3 των ενώσεων $\text{cyclo}(\text{Ala-Gly})$, $\text{cyclo}(\text{Gly-Gly})$, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με το είδος των αμινοξέων, δηλαδή τη γλυκίνη και την αλανίνη.

Όσον αφορά τα φάσματα MS^2 των 2,5-δικετοπιπεραζινών που περιέχουν D-ασπαργινικό οξύ ως αμινοξύ υποκαταστάτη [πρότυπες ενώσεις: $\text{cyclo}(\text{Asp-Gly})$, $\text{cyclo}(\text{Asp-Asp})$], δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα προαναφερθέντα ιόντα A, B, C και D. Αντιθέτως ανιχνεύθηκε θετικό ιόν, το οποίο προέκυψε από την απόσπαση ενός μορίου H_2O από το μητρικό ιόν [MH^+]. Το εύρημα αυτό πιθανόν σχετίζεται με την απόσπαση μορίου H_2O μετά την πρωτονίωση της ομάδας υδροξυλίου του D-ασπαργινικού οξέος. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικός διότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του D-ασπαργινικού οξέος ως τμήμα του μορίου της DKP.

Από τη μελέτη όλων των θετικών φασμάτων ESI-MS_n των αλειφατικών DKP (Πίνακες 9.3.1 και 9.3.2) προέκυψαν χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα επιμέρους αμινοξέα τους. Ως εκ τούτου και σε πλήρη συμφωνία μετααποτελέσματα αρωματικών δικετοπιπεραζινών, στα φάσματα ESI-MS² ή / και ESI-MS³ των αλειφατικών DKP ανιχνεύθηκαν θετικά ιόντα που αντιστοιχούν στις δομές των ιόντων E [αμινοξύ - 45 (CO₂H)] και F [αμινοξύ - 17 (OH)].

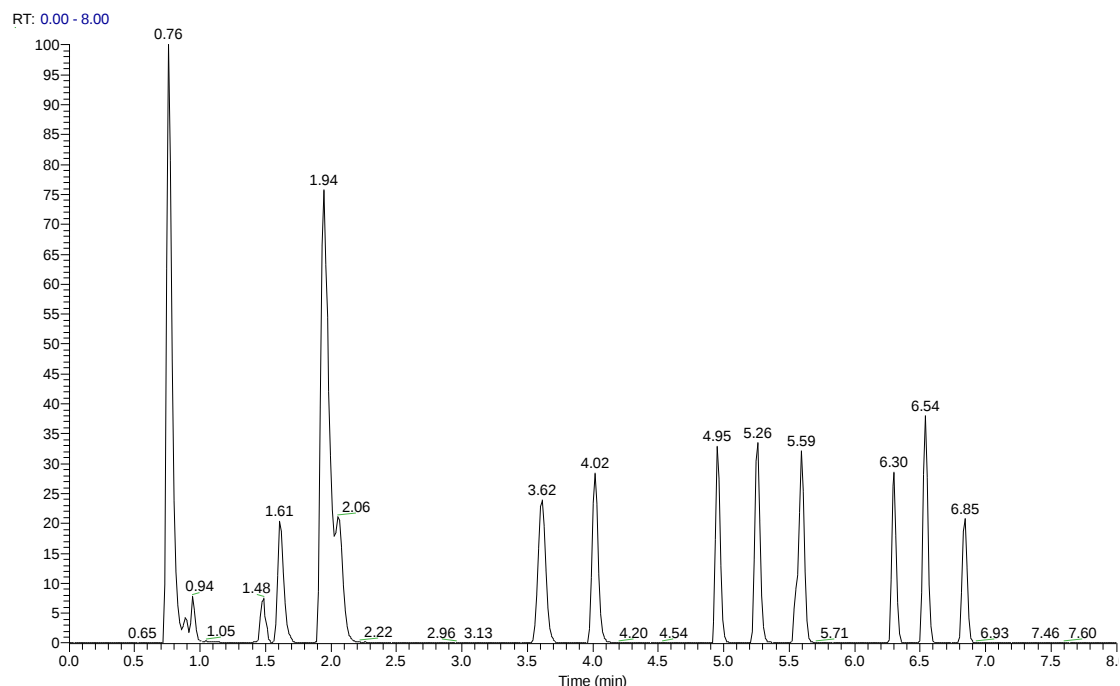
Στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά παραδείγματα ανίχνευσης των ιόντων E και F. Έτσι στα φάσματα μάζας DKP που περιέχουν ιστιδίνη ανιχνεύθηκαν μοριακές μάζες 138 και 110 Da, ενώ στα φάσματα μάζας DKP που περιέχουν προλίνη ανιχνεύθηκαν μοριακές μάζες 98 και 70 Da, για τα ιόντα F και E αντιστοίχως. Επιπλέον τα θραύσματα σε m/z 114 και 86 αντιστοιχούν στην λευκίνη μετά από την απώλεια HO και CO₂H, αντιστοίχως. Επίσης τα θραύσματα σε m/z 58 και σε m/z 72 (ión F) αντιστοιχούν στην γλυκίνη και αλανίνη αντιστοίχως μετά από την απώλεια της ομάδας του OH. Τέλος το θραύσμα σε m/z 72 (ión E) αντιστοιχεί στην βαλίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO₂H.

9.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΕΣ ΕΛΙΕΣ

Η παρουσία των DKPs στα δείγματα ελιών (Πίνακας 9.4.1) που μελετήθηκαν είναι το αποτέλεσμα της ζύμωσης από μικροοργανισμούς. Η παρουσία τους αυξάνει τη θρεπτική αξία των ελιών και συμβάλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, προσδίδοντας πικρή και μεταλλική γεύση. Ο προσδιορισμός των 2,5-δικετοπιπεραζινών (2,5-DKPs) διεξήχθη στα εκχυλίσματα των ελιών που προέκυψαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 8.4.1 «Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τα δείγματα των ελιών» της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι».

Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης συζευγμένης με αναλυτή μαζών τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap analyzer) και η ανίχνευση των 2,5-δικετοπιπεραζινών προέκυψε από τη σύγκριση των χρόνων εκλούσεώς τους, των πειραματικών μοριακών μαζών των πρωτονιωμένων ιόντων

τους, όπως και των διαδοχικών φασμάτων μάζας τους με τα αντίστοιχα προτύπων ενώσεων αναφοράς. Στο Σχήμα 9.4.1 παρατίθεται το συνολικό χρωματογράφημα και των 19 προτύπων 2,5-δικετοπιπεραζινών, με τους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης, στους οποίους βασίστηκε η αναγνώριση των μοριακών δομών των δειγμάτων των ελιών.

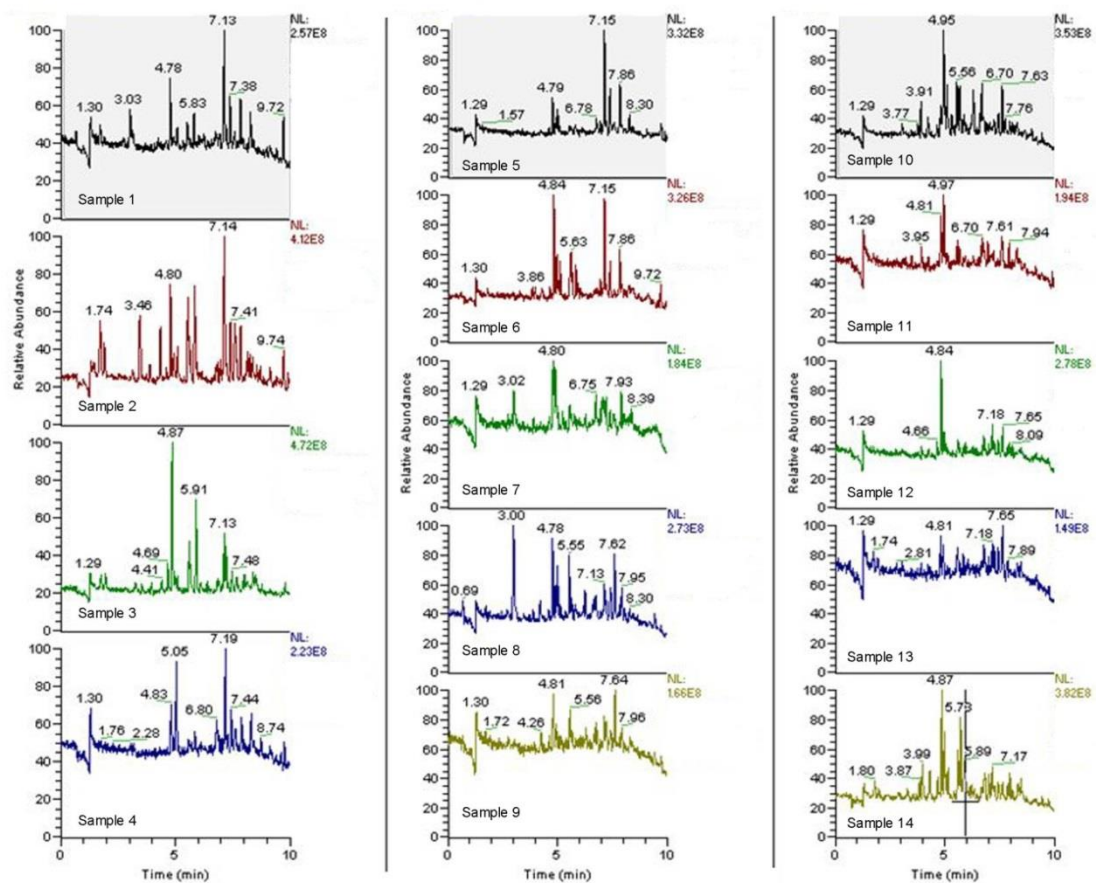


Σχήμα 9.4.1 Συνολικό χρωματογράφημα των 19 προτύπων 2,5-δικετοπιπεραζινών με συγκέντρωση προτύπων 10 ppm.

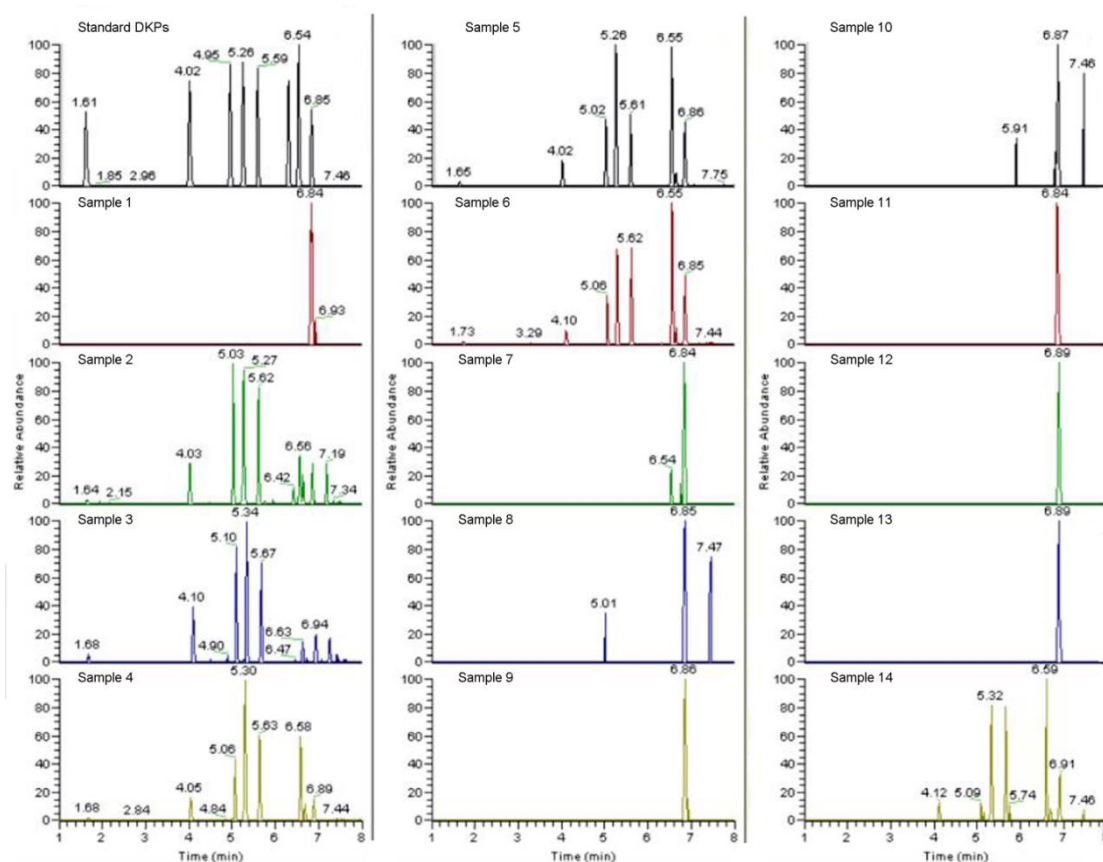
Στον Πίνακα 9.4.2, παρατίθενται οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικούς τύπους Ελληνικών ποικιλιών ελιών, ενώ στο Σχήμα 9.4.2 παρατίθενται τα χρωματογραφήματα ιόντων των εκχυλισμάτων των ελιών. Επίσης στο Σχήμα 9.4.3 παρατίθενται τα χρωματογραφήματα και οι αντίστοιχες κορυφές των 8 προτύπων DKP που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα των δειγμάτων των ελιών.

Πίνακας 9.4.2 DKPs που προσδιορίστηκαν στις Ελληνικές ποικιλίες ελιών

DKP	Αριθμός δειγμάτων	Δείγματα													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Phe-Phe	14	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Leu-Phe	7		√	√	√	√	√	√							√
Pro-Val	6		√	√	√	√	√								√
Phe-Pro	6		√	√	√	√	√								√
Leu-Pro	6		√	√	√	√	√								√
D-Ala-Pro	5		√	√	√	√	√								√
Leu-Trp	2		√					√							
Val-Val	1				√										



Σχήμα 9.4.2 Χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων των ελιών



Σχήμα 9.4.3 Χρωματογραφήματα των 8 προτύπων DKP που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα των δειγμάτων των ελιών.

Οι χρόνοι εκλούσεως, οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων DKP των εκχυλισμάτων των ελιών, όπως προσδιορίστηκαν πειραματικά από τα φάσματα ESI-MS¹ και οι θεωρητικώς εκφρασμένες μοριακές μάζες σε μονο-ισοτοπική βάση παρατίθενται στον Πίνακα 9.4.3. Οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων DKP, των εκχυλισμάτων των ελιών όπως προσδιορίστηκαν πειραματικά από τα φάσματα ESI-MS¹ επιβεβαίωσαν τη μοριακή τους σύνθεση δίνοντας συγκριτικά με τις θεωρητικές μοριακές μάζες σφάλμα μικρότερο των 4,7 ppm (Πίνακας 9.4.3)

Πίνακας 9.4.3 DKPs που ανιχνεύθηκαν στις Ελληνικές ποικιλίες ελιών

Δείγμα	DKPs	θεωρητικό m/z	πειραματικό m/z	Αναμενόμενος RT	Πειραματικός RT	Delta mDa	Delta ppm	Αφθονία ιόντος
1	Phe-Phe	295.1441	295.14340	6.85	6.84	-0.7	-2.4	61875
2	D-Ala-Pro	169.0972	169.097	1.61	1.64	-0.2	-1.2	21567
	Pro-Val	197.1285	197.12849	4.02	4.03	0.0	0.0	193204
	Leu-Pro	211.1441	211.1442	5.26	5.27	0.1	0.5	647370
	Phe-Pro	245.1285	245.12814	5.59	5.62	-0.4	-1.5	563572
	Leu-Trp	300.1707	300.16977	6.3	6.42	-0.9	-3.1	81708
	Leu-Phe	261.1598	261.15961	6.54	6.56	-0.2	-0.7	228411
	Phe-Phe	295.1441	295.14377	6.85	6.85	-0.3	-1.1	193890
3	D-Ala-Pro	169.0972	169.09682	1.61	1.68	-0.4	-2.3	26174
	Pro-Val	197.1285	197.12852	4.02	4.1	0.0	0.1	175677
	Leu-Pro	211.1441	211.1441	5.26	5.34	0.0	0.0	441283
	Phe-Pro	245.1285	245.12831	5.59	5.67	-0.2	-0.8	312225
	Leu-Phe	261.1598	261.15961	6.54	6.63	-0.2	-0.7	65427
	Phe-Phe	295.1441	295.14352	6.85	6.94	-0.6	-2.0	87246
4	D-Ala-Pro	169.0972	169.09705	1.61	1.68	-0.2	-0.9	39764
	Pro-Val	197.1285	197.12849	4.02	4.05	-0.0	-0.0	286386

	Val-Val	199.1441	199.1441	4.95	5.01	0.0	0.0	24917
	Leu-Pro	211.1441	211.1441	5.26	5.3	0.0	0.0	1715003
	Phe-Pro	245.1285	245.12825	5.59	5.63	-0.2	-1.0	1043307
	Leu-Phe	261.1598	261.15961	6.54	6.58	-0.2	-0.7	1024470
	Phe-Phe	295.1444	295.14383	6.85	6.89	-0.3	-0.9	265837
5	D-Ala-Pro	169.0972	169.09686	1.61	1.65	-0.3	-2.0	22418
	Pro-Val	197.1285	197.12863	4.02	4.02	0.1	0.7	118060
	Leu-Pro	211.1441	211.14413	5.26	5.26	0.0	0.2	648795
	Phe-Pro	245.1285	245.12831	5.59	5.61	-0.2	-0.8	331521
	Leu-Phe	261.1598	261.15964	6.54	6.55	-0.2	-0.6	641009
	Phe-Phe	295.1441	295.14392	6.85	6.86	-0.2	-0.6	296654
6	D-Ala-Pro	169.0972	169.09715	1.61	1.73	-0.0	-0.3	23377
	Pro-Val	197.1285	197.12852	4.02	4.1	0.0	0.1	99863
	Leu-Pro	211.1441	211.14417	5.26	5.28	0.1	0.3	662646
	Phe-Pro	245.1285	245.12828	5.59	5.62	-0.2	-0.9	671771
	Leu-Trp	300.1707	300.17212	6.3	6.31	1.4	4.7	15331
	Leu-Phe	261.1598	261.1598	6.54	6.55	-0.2	-0.7	981456
	Phe-Phe	295.1441	295.14398	6.85	6.85	-0.1	-0.4	486008
7	Leu-Phe	261.1598	261.15961	6.54	6.54	-0.2	-0.7	17954
	Phe-Phe	295.1441	295.14365	6.85	6.84	-0.5	-1.5	73411
8	Phe-Phe	295.1441	295.14349	6.85	6.85	-0.6	-2.1	44665

9	Phe-Phe	295.1441	295.1438	6.85	6.86	-0.3	-1.0	77874
10	Phe-Phe	295.1441	295.1438	6.85	6.87	-0.3	-1.0	45481
11	Phe-Phe	295.1441	295.1434	6.85	6.84	-0.7	-2.4	77116
12	Phe-Phe	295.1441	295.14374	6.85	6.89	-0.4	-1.2	96764
13	Phe-Phe	295.1441	295.14359	6.85	6.89	-0.5	-1.7	101429
14	Pro-Val	197.1285	197.12849	4.02	4.12	-0.0	-0.0	27507
	Leu-Pro	211.1441	211.14406	5.26	5.32	-0.0	-0.2	177882
	Phe-Pro	245.1285	245.12827	5.59	5.66	-0.2	-1.0	176189
	Leu-Phe	261.1598	261.1597	6.54	6.59	-0.1	-0.4	217984
	Phe-Phe	295.1441	295.14377	6.85	6.91	-0.3	-1.1	72453

Τα χαρακτηριστικά θραύσματα των διαδοχικών φασμάτων μαζών παρατίθενται στον Πίνακα 9.4.4. Όσα θραύσματα μάζας είχαν σχετική αφθονία <5% σε σχέση με το κύριο θραύσμα αναφέρονται στον Πίνακα 9.4.4 μόνο εφ' όσον αποτελούν απαραίτητη πληροφορία για την αναγνώριση συγκεκριμένων μοριακών δομών δικετοπιπεραζινών. Οι μοριακές δομές των 2,5-δικετοπιπεραζινών παρουσίασαν παρόμοιο τρόπο θραυσμάτωσης, παράγοντας το μητρικό ιόν MH^+ στα φάσματα MS^1 και θυγατρικά ιόντα με μοριακές μάζες $[MH^+ - 28]$, $[MH^+ - 17]$ και $[MH^+ - 45]$ στα MS^2 φάσματά τους (Bratakos et al., 2016b), με διαφορετικές βέβαια σχετικές αφθονίες των θραυσμάτων αυτών.

Πίνακας 9.4.4ESI-MSⁿ δεδομένα των 2,5-δικετοπιπεραζινώνπου ανιχνεύθηκαν στις Ελληνικές ποικιλίες ελιών

2,5-diketopiperazines	Rt	ms ¹ (MH ⁺) experimental m/z	ms ²	ms ³	ms ⁴
Cyclo D-Ala-Pro C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	1.61	169.0972	152.0715 (19), 141.0882 (57), 124.0725 (24), 113.1010 (1), 70.0447 (100)	-	-
Cyclo Pro-Val C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	4.02	197.1285	180.0976 (11), 169.1190 (100) , 155.9611 (6), 141.1104 (10), 124.1116 (4), 72.0719 (6), 70.0441 (14)	141.1113 (100) , 124.1116 (92), 72.0719 (4), 70.0441 (4)	124.1116 (100) , 112.2508 (4), 70.0441 (5)
Cyclo Val-Val C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₂	4.95	199.1441	171.1223 (100) , 154.1027 (32), 126.1556 (7), 72.0649 (12)	126.1556 (100), 72.0649 (91)	109.1594 (100) , 83.1121 (7), 70.0998 (85), 96.1712 (22), 67.1334 (27), 58.1351 (24)
Cyclo Leu-Pro C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	5.26	211.1441	194.0910 (23), 183.1413 (100) , 166.0809 (5), 155.0913 (11),	165.1234 (4), 156.0789 (3), 155.0913 (94), 138.1223	123.0332 (74), 110.2324 (1), 108.0232 (25),

			138.1223 (7), 127.0902 (4), 86.0968 (61), 70.0447 (35)	(100) , 127.0902 (41), 110.2324 (1), 98.2212 (2), 86.0968 (11), 70.0447 (2)	96.1112 (42), 95.1807 (10), 82.1414 (74), 70.0447 (100)
Cyclo Phe-Pro C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	5.59	245.1285	217.1558 (100) , 228.0948 (2), 200.0919 (4), 189.1433 (2), 120.0862 (61), 98.1401 (*), 70.1247 (10)	172.10 (100)	157.1198 (10), 155.0533 (9), 144.0462 (100) , 143.0296 (15), 130.0653 (5), 129.0496 (20), 105.0946 (10), 91.0810 (2), 68.0275 (2)
Cyclo Leu-Trp C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₂	6.30	300.1707	283.2324 (6), 272.2537 (2), 255.2095 (1), 170.0391 (7), 169.1170(1), 132.0329 (28), 130.0727 (100)	-	-
Cyclo Leu-Phe C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	6.54	261.1598	244.1782 (1), 233.1786 (100) , 216.1437 (31), 205.0758 (1), 188.1208 (1), 148.1770 (*), 120.0578 (46), 86.0968 (9)	216.1272 (2), 205.1228 (2), 188.1725 (100) , 177.1394 (5), 148.1770 (1), 132.1192 (8), 120.2131 (98), 105.2924 (1), 86.2793 (46)	171.0853 (26), 159.0783 (18), 146.0469 (11), 145.0730 (4), 143.0459 (19), 132.1192 (56), 129.0533 (18), 120.0578 (17), 117.0749 (17), 105.1032 (100) , 96.1908 (3), 91.1076 (4),

					84.1504(1)
Cyclo Phe-Phe C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₂	6.85	295.1441	278.2380 (1), 267.2574 (100) , 250.2240 (6), 222.1727 (1), 120.1214 (48)	250.2240 (2), 222.1727 (2), 130.1475 (17), 120.2656 (100)	103.0847 (100)

9.4.1 Ταυτοποίηση αρωματικών 2,5-δικοτοπιπεραζινών

Η συμμετρική και αρωματική cyclo(Phe-Phe) ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα ελιάς, ανεξαρτήτως ποικιλίας (Πίνακας 9.4.2). Έχει επίσης ανιχνευθεί σε μεγάλη ποικιλία ποτών και τροφίμων όπως σε βόειο κρέας, τυρί τσένταρ, κακάο, λευκό κρασί, εκχύλισμα μαγιάς, κλπ. Είναι φυσικά απαντώμενη 2,5-δικοτοπιπεραζίνη και είναι διπλός αναστολέας του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT) και της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) *in vitro* (Chenetal., 2009).

Η cyclo(Phe-Phe) δίνει το πρωτονιωμένο μητρικό ιόν (MH^+) με m/z 295.1441 (Πίνακας 9.4.3), το οποίο κατά τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) παράγει ιόντα με m/z 267.2574, 278.2380, 250.2240 και 222.1727 (Πίνακας 9.4.4), τα οποία προκύπτουν μέσω της αποσπάσεως από αυτό των ομάδων ($C=O$), (NH_3), ($HCONH_2$) και ($C=O + HCONH_2$), αντιστοίχως. Το ιόν με m/z 120.1214 αντιστοιχεί στη φαινυλαλανίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H , δηλαδή στο ιόν $Ph-CH_2-CH(NH_2)-$. Επιπλέον, το θραύσμα με m/z 103.0847 στο διαδοχικό φάσμα MS_4 προκύπτει μέσω της αποσπάσεως ενός μορίου NH_3 από το ιόν $Ph-CH_2-CH(NH_2)-$ (Πίνακας 9.4.4).

Η μη συμμετρική αρωματική cyclo(Leu-Trp) ανιχνεύθηκε σε αρκετές από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 9.4.2). Έχει επίσης ανιχνευθεί σε κοτόπουλο, κακάο και εκχύλισμα μαγιάς, ενώ έχει απομονωθεί από το θαλάσσιο μύκητα *Acremonium strictum* και από το σπόγγο *Callyspongia* sp. Εμφανίζει σημαντική «αντιριζική» δράση ενάντια της ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τη βιταμίνη E (Borthwick & Da costa, 2015; Chen et al., 2009).

Η cyclo(Leu-Trp) δίνει το πρωτονιωμένο μητρικό ιόν (MH^+) με m/z 300.1707 (Πίνακας 9.4.3). Από την θραυσμάτωση του μοριακού ιόντος της cyclo(Leu-Trp) και μέσω διαδοχικών αποσπάσεων ομάδων, παράγεται το θετικό ιόν της 3-μεθυλενο-ινδόλης στο διαδοχικό φάσμα MS_2 (Πίνακας 9.4.4) με m/z 130 και σε σχετική αφθονία 100% (Bratakosetal., 2016b). Επιπλέον στο διαδοχικό φάσμα MS^2 της ένωσης αυτής, εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα της θρυπτοφάνης με m/z 132 και 170, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα ιόντα της 3-μεθυλο-ινδόλης και της 3-(3-ινδολ)-προπενόλης, αντιστοίχως (Bratakos et al., 2016b).

Η μη συμμετρική αρωματική cyclo(Leu-Phe) ανιχνεύθηκε σε αρκετές από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 9.4.2). Έχει επίσης ανιχνευθεί σε τυρί cheddar, κοτόπουλο, καφέ, κακάο, ψητό χοιρινό, κόκκινο κρασί, λευκό κρασί και ξύδι μπαλσάμικο. Εμφανίζει σημαντική αντιριζική δράση ενάντια της ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου αλλά μικρότερη αντιοξειδωτική δράση από τη βιταμίνη E (Borthwick & Da costa, 2015; Chen et al., 2009).

Η cyclo(Leu-Phe) δίνει το πρωτονιομένο μητρικό ιόν (MH^+) με m/z 261.1598 (Πίνακας 9.4.3). Από τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) του μοριακού ιόντος της cyclo(Leu-Phe) προκύπτουν προϊόντα ιόντα με m/z 233.1786, 244.1782, 216.1437 και 188.1208, τα οποία προκύπτουν μέσω της αποσπάσεως από αυτό των ομάδων ($C=O$), (NH_3), ($HCONH_2$) και ($C=O + HCONH_2$), αντιστοίχως (Πίνακας 9.4.4). Τα ιόντα με m/z 148.1770 και 120.0578, στο διαδοχικό φάσμα MS_2 , αντιστοιχούν στη φαινυλαλανίνη μετά από την απώλεια των ομάδων του OH και CO_2H , αντιστοίχως, ενώ το ιόν με m/z 86.0968 αντιστοιχεί στη λευκίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H (Πίνακας 9.4.4).

Η μη συμμετρική αρωματική cyclo(Phe-Pro) παράγεται στα τρόφιμα κυρίως από τη δράση του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* και ανιχνεύθηκε σε έξι από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 9.4.2). Η cyclo(Phe-Pro) προσδίδει στα τρόφιμα μεταλλική και πικρή γεύση και έχει ανιχνευθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως σε καβουρντισμένο καφέ, κοτόπουλο, βοδινό κρέας, μύρα, ξινή ζύμη και ψωμί (Borthwick & Da costa, 2015; Ryan et al., 2009; Chen et al., 2009).

Η cyclo(Phe-Pro) δίνει το πρωτονιομένο μητρικό ιόν (MH^+) με m/z 245.1285 (Πίνακας 9.4.3). Από τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) του μοριακού ιόντος της cyclo(Phe-Pro) προκύπτουν προϊόντα ιόντα με m/z 217.1558, 228.0948 και 200.0919, τα οποία προκύπτουν μέσω της αποσπάσεως από αυτό των ομάδων ($C=O$), (NH_3) και ($HCONH_2$), αντιστοίχως (Πίνακας 9.4.4). Σύμφωνα με τον άλλο προτεινόμενο μηχανισμό (παράγραφος 9.2.), το ιόν με m/z 217.1558 θα μπορούσε να παραχθεί μέσω της αποσπάσεως της ομάδας του αιθενίου (C_2H_4) από το δακτύλιο της προλίνης του MH^+ . Το μοναδικό ιόν στο διαδοχικό φάσμα MS^3 , με m/z 172.1002, προκύπτει μέσω του μηχανισμού της διαδοχικής αποσπάσεως της ομάδας (C_2H_4) από το δακτύλιο της προλίνης και μετά της ομάδας ($HCONH_2$) από τον

ετεροκυκλικόδακτύλιο της δικετοπιπεραζίνης (Πίνακας 9.4.4). Το ιόν με m/z 120.0862, στο διαδοχικό φάσμα MS_2 , αντιστοιχεί στη φαινυλαλανίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H (Πίνακας 9.4.4). Επιπλέον τα θραύσματα σε m/z 98.1401 και 70.1247 στο διαδοχικό φάσμα MS^2 αντιστοιχούν στην προλίνη μετά από την απώλεια HO και CO_2H , αντιστοίχως.

9.4.2 Ταυτοποίηση αλειφατικών 2,5-δικετοπιπεραζινών

Τα αλειφατικά ανάλογα της προλίνης που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα των ελιών (Πίνακας 9.4.2), cyclo(Leu-Pro), cyclo(Pro-Val) και cyclo(D-Ala-Pro) έχουν βρεθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ποτών, σε καλλιέργειες βακτηρίων και μυκήτων και σε μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων μικροοργανισμών (Borthwick, 2012; Park et al., 2006; Mitova, et al., 2004). Η cyclo(Leu-Pro) παράγεται στα τρόφιμα κυρίως από τη δράση του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum*. Έχει σημαντική αντιμυκητιακή δράση και είναι σημαντικός αναστολέας της παραγωγής των καρκινογόνων και μεταλλαξιγόνων αφλατοξινών από τον μύκητα *Aspergillus parasiticus* (Yan et al., 2004). Επίσης παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα έναντι αναερόβιων Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων και έχει ραδιοπροστατευτική επίδραση στους ανθρώπινους ινοβλάστες των πνευμονικών κύτταρων (Rhee, 2006). Η cyclo(Leu-Pro) είναι η κύρια 2,5-δικετοπιπεραζίνη του κακάο (Stark and Hofmann, 2005) και επίσης μία από τις σημαντικότερες δικετοπιπεραζίνες σε πολλά είδη μύρας (Gautschi et al., 1997). Η cyclo(Pro-Val) έχει απομονωθεί από τον μύκητα *Aspergillus fumigatus* και έχει ασθενή αντιβακτηριακή δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των *Staphylococcus aureus* και *Micrococcus luteus* (Furtado et al., 2005). Η cyclo(D-Ala-Pro) εμφανίζει κυτταροτοξικότητα έναντι διαφορετικών καρκινικών κυττάρων (Chen et al., 2007).

Οι δικετοπιπεραζίνες cyclo(Leu-Pro), cyclo(Pro-Val) and cyclo(D-Ala-Pro) δίνουν το πρωτονιομένο μητρικό ιόν τους (MH^+) σε m/z 211.1441, 197.1285 και 169.0972, αντιστοίχως (Πίνακας 9.4.3). Από τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) του μοριακού ιόντος των cyclo(Leu-Pro), cyclo(Pro-Val) και cyclo(D-Ala-Pro) προκύπτουν προϊόντα ιόντα με m/z 155,0913, 141,1104 και 113.1010, αντιστοίχως, τα οποία προκύπτουν από την απώλεια μοριακής μάζας 56 amu, δηλαδή μέσω

της διαδοχικής αποσπάσεως από αυτό των ομάδων του αιθενίου (C_2H_4) και του καρβονυλίου ($C=O$) (Πίνακας 9.4.4). Ο μηχανισμός αυτός θραυσμάτωσης φαίνεται να επιβεβαιώνει την παρουσία δικετοπιπεραζινών που είναι ανάλογα της προλίνης. Επίσης από τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) του μοριακού ιόντος των cyclo(Leu-Pro), cyclo(Pro-Val) και cyclo(D-Ala-Pro) προκύπτουν προϊόντα ιόντα μέσω της αποσπάσεως από αυτό των ομάδων ($C=O$) και (NH_3) με ταυτόχρονη απώλεια μοριακής μάζας 28 και 17 amu, αντιστοίχως (Πίνακας 9.4.4). Επιπλέον το θραύσμα σε m/z 70.0447 στο διαδοχικό φάσμα MS^2 αντιστοιχούν στην προλίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H .

Η cyclo(Val-Val) είναι η μόνη συμμετρική αλειφατική 2,5-δικετοπιπεραζίνη που ανιχνεύθηκε σε τρεις ποικιλίες (Πίνακας 9.4.2). Έχει επίσης ανιχνευθεί σε βόειο κρέας, ψωμί, κοτόπουλο, κακάο και εκχύλισμα μαγιάς. Έχει απομονωθεί από το θαλάσσιο μικροοργανισμό *Bacillus subtilis* και έχει αποδειχθεί ότι δρα εναντίον της ελονοσίας (Chen et al., 2009; Pérez-Picazo et al., 2012).

Η cyclo(Val-Val) δίνει το πρωτονιομένο μητρικό ιόν (MH^+) σε m/z 199.1441 (Πίνακας 9.4.3). Από τη δεύτερη διαδοχική θραυσμάτωση (MS^2) του μοριακού ιόντος της cyclo(Val-Val) προκύπτουν προϊόντα ιόντα με m/z 171.1223, 154.1027 και 126.1556, τα οποία προκύπτουν μέσω της αποσπάσεως από αυτό των ομάδων ($C=O$), ($HCONH_2$) και ($C=O + HCONH_2$), αντιστοίχως (Πίνακας 9.4.4). Το ιόν με m/z 72.0649 αντιστοιχεί στη βαλίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H (Πίνακας 9.4.4).

9.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την εξαιρετικά ευαίσθητη αναλυτική τεχνική LC-ESI- MS^n ταυτοποιήθηκαν συνολικά 8 αλειφατικές και αρωματικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες στα δείγματα των Ελληνικών ποικιλιών ελιών που μελετήθηκαν, αποτέλεσμα που αποτελεί πρωτότυπη αναφορά για τις μεταποιημένες ελιές (Bratakos et al., 2016b). Οι δύο πιο πλούσιες ποικιλίες ελιών σε DKP ήταν οι Κοθρεϊκές μεσαίου μεγέθους από την Άμφισσα (Δείγμα 2) και οι Χονδροελιές μεγάλου μεγέθους από την Άμφισσα (Δείγμα 6), όπου ανιχνεύθηκαν συνολικά επτά μοριακά είδη. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν υποδεικνύει

τη σημασία της γεωγραφικής προέλευσης σε σχέση με το μεταβολικό προφίλ του καρπού. Επίσης στις ελιές Καλαμών μεσαίου μεγέθους από την Ηλεία (Δείγμα 4), ανιχνεύθηκαν επτά μοριακά είδη DKP, ένα εκ των οποίων ήταν η cyclo(Val-Val), η οποία δεν εντοπίστηκε σε κανένα άλλο δείγμα. Η cyclo(Phe-Phe) ανιχνεύθηκε και στα 14 μελετούμενα δείγματα, οπότε θα μπορούσε να θεωρηθεί χαρακτηριστικό μοριακό είδος των επεξεργασμένων ελιών. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι από τις οκτώ διαφορετικές δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν οι τέσσερις αποτελούν μοριακά ανάλογα της προλίνης. Το προφίλ των 2,5-δικετοπιπεραζινών των επεξεργασμένων ελιών πιθανώς σχετίζεται με γενετικούς και γεωγραφικούς παράγοντες, τις συνθήκες καλλιέργειας, όπως επίσης τις μεθόδους, το χειρισμό και την αποθήκευση πριν και κατά τη διαδικασία της ζύμωσης.

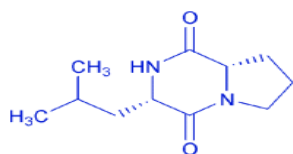
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟΥΣ ΕΓΧΩΡΙΟΥΣ ΚΑΙ ΜΗΕΓΧΩΡΙΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ / ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

10.1 ΣΥΝΘΕΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ

Η χημική σύνθεση των 2,5-δικετοπιπεραζινών, κρίθηκε αναγκαία, ώστε οι ενώσεις αυτές να αποτελέσουν τις αναγκαίες πρότυπες ουσίες. Η χημική σύνθεση των παραπάνω 2,5-δικετοπιπεραζινών επιτεύχθηκε με κυκλοποίηση των αντίστοιχων συνθετικών διπεπτιδίων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8.5. Η δομή των παραπάνω 2,5-δικετοπιπεραζινών που παρήχθησαν συνθετικά επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας $^1\text{H-NMR}$ και φασματοσκοπία μάζας.

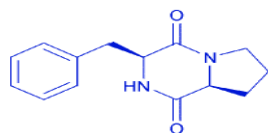
Στη συνέχεια αναφέρονται τα αποτελέσματα από την $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία για την επιβεβαίωση της δομής των 2,5-δικετοπιπεραζινών που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά.

Cyclo (Leu-Pro) (Adamczeskietal., 1995; Pedrasetal., 2005): (3S,6S)-3-[(2-Methylpropyl)]-hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazine-1,4-dione $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, Varian) in $\text{CDCl}_3\delta$ (ppm) = 0.94 [d, 3H, J = 6.6 Hz, $-\text{CH}_3\text{Leu}$], 0.99 [d, 3H, J = 6.6 Hz, $-\text{CH}_3\text{Leu}$], 1.50-1.76 [ddd, m, 2H, J = 5.0, 9.5, 14.4 Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_2\text{Leu}$], 1.88 [m, 1H, $\text{C}_\gamma\text{H}_1\text{Leu}$], 2.12 [m, 3H, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{-C}_\gamma\text{H}_2\text{Pro}$], 2.34 [dtd, 1H, J = 3.0, 6.9, 9.9 Hz, C_βH_1 , Pro], 3.56 [m,m, 2H, $\text{C}_\delta\text{H}_2$, Pro], 4.01 [dd, 1H, J = 3.0, 9.4 Hz, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Leu}$], 4.11 [t, 1H, J = 8.2 Hz, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Pro}$], 6.13 [s, br, 1H, NH].



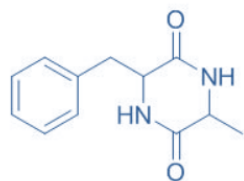
Cyclo (Leu-Pro)

Cyclo (Phe-Pro) (Adamczeski et al., 1995; Guanghua et al., 2010): (3S,6S)-3-(phenylmethyl)-(hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazine-1,4-dione ^1H NMR (300 MHz, Varian) in $\text{CDCl}_3\delta$ (ppm) = 1.93 [m, 3H, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{-C}_\gamma\text{H}_2\text{Pro}$], 2.31 [m, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Pro}$], 2.70 [dd, 1H, $J = 10.5, 14.4$ Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Phe}$], 3.53-3.66 [m, 3H, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{-C}_\delta\text{H}_2\text{Pro}$], 4.07 [dd, 1H, $J = 2.3, 10.2$ Hz, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Pro}$], 5.73 [s, br, 1H, NH], 7.26-7.29 [m, 5H, $\text{-C}_6\text{H}_5\text{Phe}$].



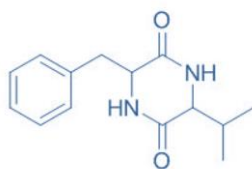
Cyclo (Phe-Pro)

Cyclo (Ala-Phe) (Stark and Hofmann, 2005): (3S,6S)-3-Methyl-6-(phenylmethyl)-piperazine-2,5-dione, ^1H NMR (300 MHz, Varian) in $\text{CDCl}_3\delta$ (ppm) = 0.15 [d, 3H, $J = 6.9$ Hz, $\text{-CH}_3\text{Ala}$], 2.87 [dd, 1H, $J = 5.0, 13.4$ Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Phe}$], 3.15 [dd, 1H, $J = 3.2, 13.0$ Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Phe}$], 3.63 [m, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Phe}$], 4.87- 4.81 [q, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Ala}$], 7.00-7.22 [m, 5H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Phe}$].



Cyclo (Ala-Phe)

Cyclo (Val-Phe) (Stark and Hofmann, 2005): (3S,6S)-3-(1-Methylethyl)-6-(phenylmethyl)-piperazine-2,5-dione ^1H NMR (300 MHz, Varian) in $\text{CDCl}_3\delta$ (ppm) = 1.01 [d, 3H, $J = 7.1$ Hz, $\text{-CH}_3\text{Val}$], 0.83 [d, 3H, $J = 6.8$ Hz, $\text{-CH}_3\text{Val}$], 1.50-1.55 [m, 1H, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Val}$], 2.89 [dd, 1H, $J = 10.0, 13.8$ Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Phe}$], 3.47 [dd, 1H, $J = 3.4, 13.0$ Hz, $\text{C}_\beta\text{H}_1\text{Phe}$], 3.89 [m, 1H, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Phe}$], 4.23 [d, 1H, $J = 9.9$ Hz, $\text{C}_\alpha\text{H}_1\text{Val}$], 5.82 [s, br, 1H, NH], 6.01 [s, br, 1H, NH], 7.26-7.29 [m, 5H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Phe}$].



Cyclo (Val-Phe)

10.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

Μελετήθηκαν 21 εμφιαλωμένοι οίνοι, εγχώριοι και μη, που παράγονται από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών, με σκοπό την ανίχνευση σε αυτούς 2,5-δικετοπιπεραζινών. Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες cyclo(Leu-Pro) και cyclo(Phe-Pro) ανιχνεύθηκαν σε όλα τα μελετούμενα δείγματα οίνων. Επίσης οι cyclo(Val-Phe) και cyclo(Ala-Phe) ανιχνεύθηκαν σε αρκετά δείγματα οίνων (Πίνακας 10.2.1). Οι δικετοπιπεραζίνες αυτές ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε οίνο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία των ενώσεων αυτών είναι ανεξάρτητη από την ποικιλία του σταφυλιού και την ποικιλία των οίνων δεδομένου ότι τα δείγματα προέρχονταν από εγχώριες και μη ποικιλίες. Επίσης, ένα πολύ σημαντικό εύρημα είναι ότι οι ουσίες αυτές ανιχνεύθηκαν κυρίως στους παλαιωμένους οίνους, γεγονός που θα μπορούσε να ληφθεί ως δείκτης παλαίωσης των οίνων. Στον Πίνακα 10.2.1, παρατίθενται οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικούς τύπους Ελληνικών και μη ποικιλιών εμφιαλωμένων οίνων.

Πίνακας 10.2.1 2,5-δικετοπιπεραζίνες που προσδιορίστηκαν στα δείγματα εμφιαλωμένων οίνων

Ποικιλίες οίνων	cyclo(Leu-Pro)	cyclo(Ala-Phe)	cyclo(Val-Phe)	cyclo(Phe-Pro)
Agiorgitiko TEI of Athens 2007	√	√	√	√
Agiorgitiko, Repanis Nemea 2007	√	√	√	√
Bourgogne Grand Ordinaire 2011	√	√	√	√
Boutaris Xinomauros 2005	√	√	√	√
Cabernet Sauvignon California 2001 Fetzner Vineyards	√	√	√	√
Cabernet Sauvignon 2004	√	√	√	√
Cabernet Sauvignon Hatzimichalis 2007	√	√	√	√
Cuvee' Argyro, Repanis Nemea 2007	√	√	√	√

DisenokoTokaji2009 Hungary	√	√	trace	√
Evelli, aged wine, Sampani 2002	√	√	√	√
Harveys Bristol, Sherry, 2000	√	√	√	√
Jerez, Real Tesoro, Fino, Sherry	√	√	√	√
Merlot-Agiorgitiko 2008	√	√	√	√
Pinot Grigio 2007, Italy	√	√	√	√
Porto Ruby	√	√	√	√
Pouilly Fume, Guy Saget, 2007, France	√	√	√	√
Pouilly Fume, 2010, France	√	√	√	√
Roditis TEI of Athens 2002	√	x	√	√
Roditis TEI of Athens 2011	√	x	√	√
Sauternes, Cordier1996, France	√	√	x	√
Vinsanto 2004	√	√	x	√

Η cyclo(Leu-Pro) η οποία ανιχνεύτηκε σε όλους τους εμφιαλωμένους οίνους είναι μία από τις σημαντικότερες δικετοπιπεραζίνες σε πολλά είδη μύρας (Gautschi et al., 1997).

Η cyclo(Phe-Pro), η οποία ανιχνεύτηκε σε όλους τους εμφιαλωμένους οίνους, παράγεται κυρίως από τη δράση του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum*. Η cyclo(Phe-Pro) προσδίδει στο κρασί μεταλλική γεύση και έχει ανιχνευθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων (Borthwick & Da costa, 2015; Ryan et al., 2009; Chen et al., 2009). Ο συνδυασμός των cyclo(Leu-Pro) και cyclo(Phe-Pro) φαίνεται να είναι συνεργιστική. Παρουσιάζουν ισχυρή δραστηριότητα έναντι αναερόβιων Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων (Rhee, 2006).

Η cyclo(Val-Phe) η οποία ανιχνεύτηκε σε 18 από τους εμφιαλωμένους οίνους, έχει επίσης ανιχνευθεί σε εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 24,3 ppm (Borthwick&Dacosta, 2015). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έχει επίσης ανιχνευθεί σε βαλσαμικό ξύδι, σε κόκκινο κρασί και σε λευκό κρασί (Borthwick, 2012).

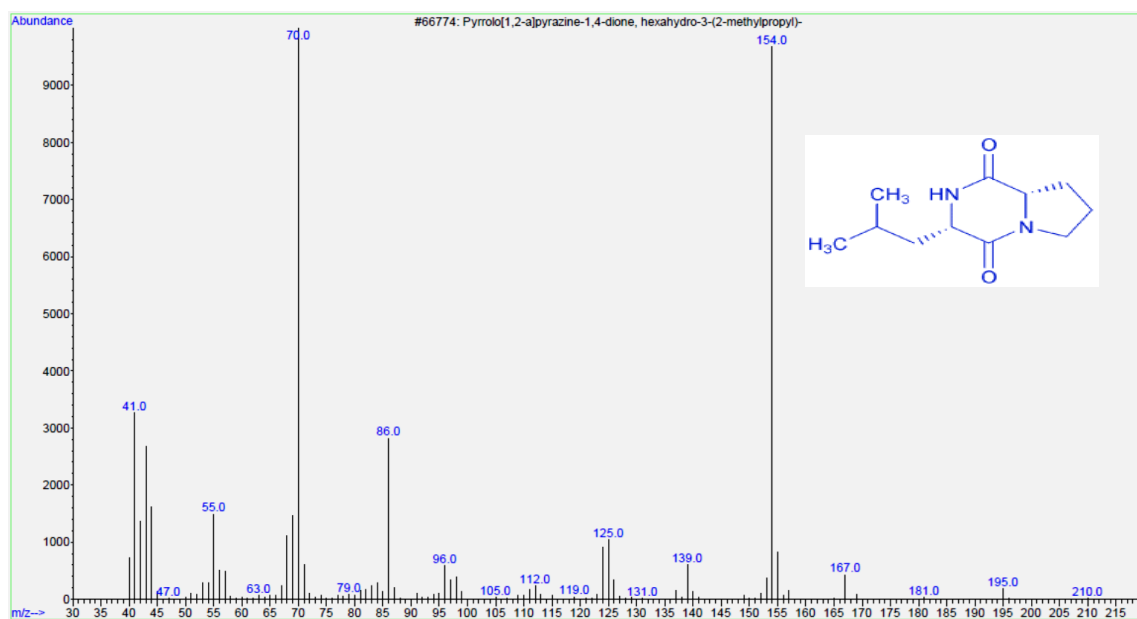
Η cyclo(Ala-Phe) η οποία ανιχνεύτηκε σε 19 από τους εμφιαλωμένους οίνους, έχει επίσης ανιχνευθεί σε κόκκινο κρασί και λευκό κρασί (Ryan et al., 2009). Θεωρείται

δευτερεύουσα 2,5-δικετοπιπεραζίνη σε ζυμομύκητες (4,2 ppm) (Da Costa et al., 2010).

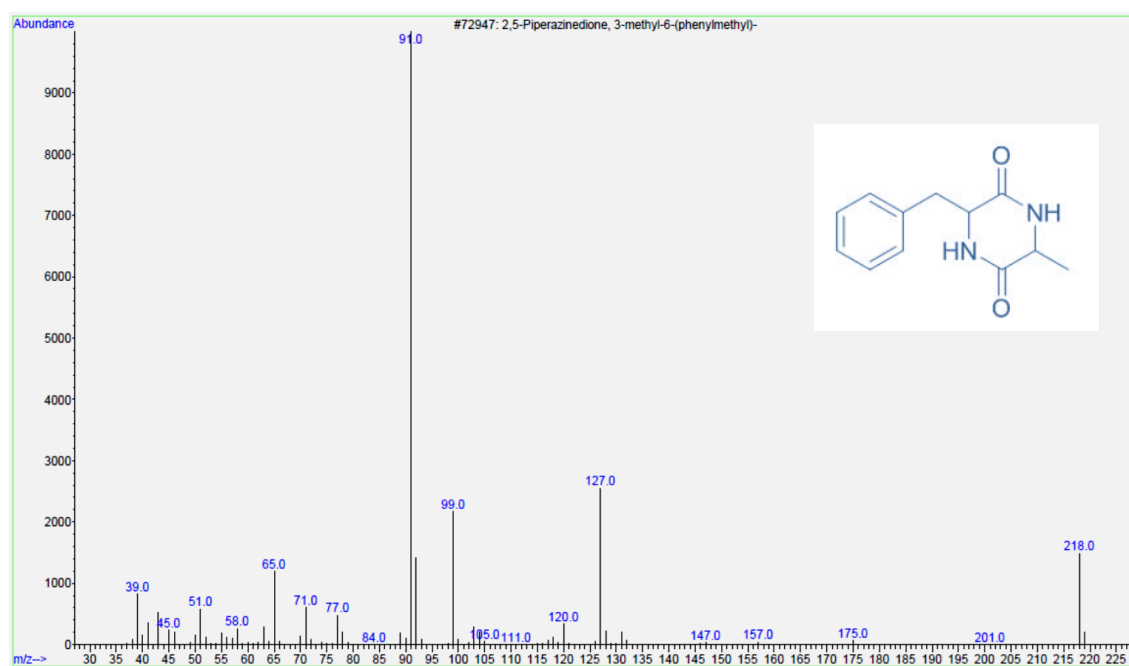
10.3 ΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΩΝ ΟΙΝΩΝ

Ο χημικός χαρακτηρισμός των cyclo(Leu-Pro), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Val-Phe) και cyclo(Ala-Phe) 2,5-δικετοπιπεραζινών επιτεύχθηκε μέσω της ανάπτυξης μεθοδολογίας αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, με χρήση ηλεκτρονιακού ιονισμού (GC-EI-MS). Η ανίχνευση έγινε στα θετικά ιόντα. Η μέθοδος βασίζεται στον ιονισμό ενός μορίου που προκαλείται από την σύγκρουσή του με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια. Η θραυσματοποίηση των ενώσεων που απαιτείται για να γίνει η ταυτοποίησή τους, προκαλείται από μια δέσμη ηλεκτρονίων με ενέργεια 70 eV. Αρχικά, δημιουργούνται θετικά ιόντα με την αφαίρεση ενός τουλάχιστον ηλεκτρονίου από το οργανικό μόριο, δηλαδή $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$. Το ιόν M^+ που παράγεται ονομάζεται μοριακό ή μητρικό ιόν, και έχει το ίδιο μοριακό βάρος με το αρχικό μόριο M. Σε δεύτερο στάδιο, τα μοριακά ιόντα υπόκεινται σε νέα διάσπαση παράγοντας θραύσματα ιόντα που είναι χαρακτηριστικά της μοριακής δομής της οργανικής ένωσης. Εφαρμόζεται ευρέως για την ανάλυση πτητικών χημικών ενώσεων, με πλεονεκτήματα την ευρύτητα εφαρμογής σε μεγάλη ποικιλία πτητικών ουσιών και την αναπαραγωγισιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας.

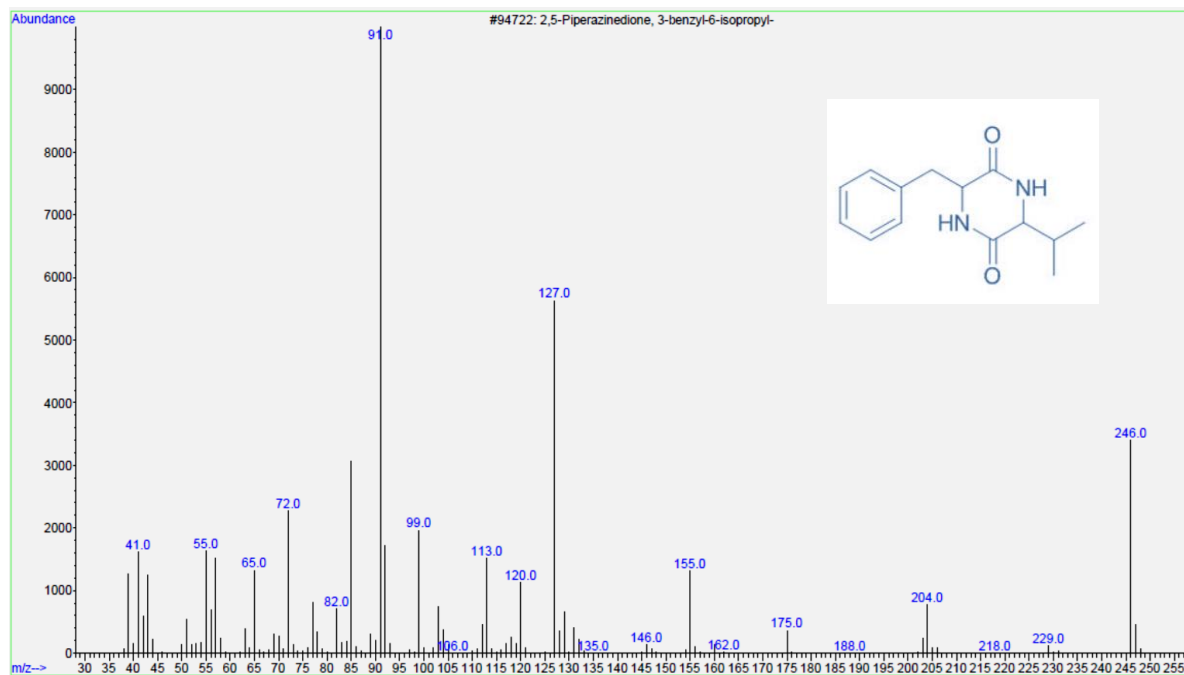
Στα σχήματα 10.3.1, 10.3.2, 10.3.3 και 10.3.4 παρατίθενται τα φάσματα μάζας των 2,5-δικετοπιπεραζινών που παρασκευάστηκαν εργαστηριακά.



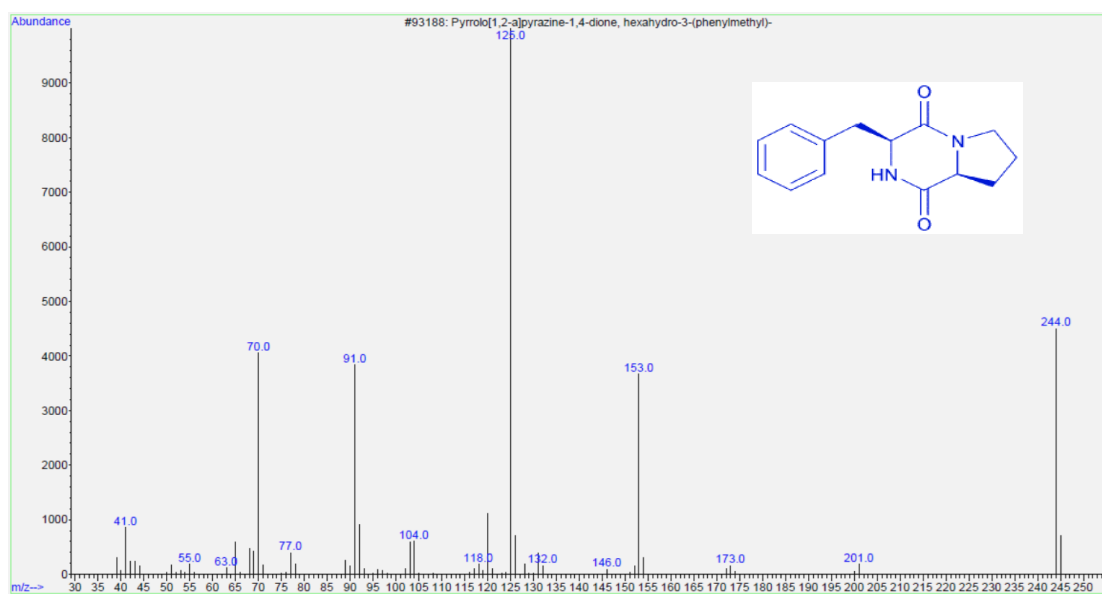
Σχήμα 10.3.1 Φάσμα μάζας cyclo-Leu-Pro



Σχήμα 10.3.2 Φάσμα μάζας cyclo-Ala-Phe

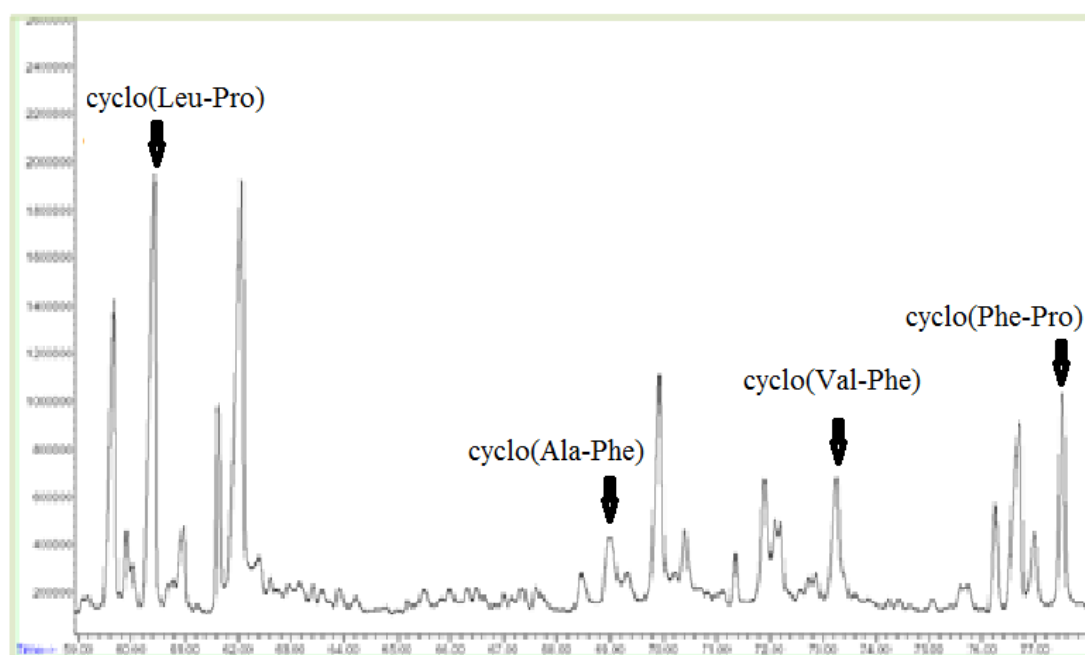


Σχήμα 10.3.3 Φάσμα μάζας cyclo-Val-Phe



Σχήμα 10.3.4 Φάσμα μάζας cyclo-Phe-Pro

Για τον χαρακτηρισμό των 2,5-δικετοπιπεραζινών, που παρασκευάστηκαν, έγινε κατ' αρχήν καταγραφή των χρόνων έκλουσής τους από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων τους και στη συνέχεια εξηγήθηκε ο μηχανισμός θραυσμάτωσής τους από τη μελέτη των θραυσμάτων τους όπως προέκυψαν από τα φάσματα μάζας (MS). Από τη συγκριτική μελέτη των χρωματογραφημάτων των 2,5-δικετοπιπεραζινών που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο και των δειγμάτων, εντοπίστηκαν πιθανές δομές DKPs στα δείγματα των εμφιαλωμένων κρασιών. Οι δομές αυτές επαληθεύθηκαν από την συγκριτική ανάγνωση των φασμάτων μάζας MS των ενώσεων αυτών σε πρότυπα και δείγματα. Στο σχήμα 10.3.5 παρατίθεται χρωματογράφημα δείγματος εμφιαλωμένου κρασιού με σημειωμένες τις 2,5-δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν.



Σχήμα 10.3.5 Χρωματογράφημα δείγματος εμφιαλωμένου κρασιού με σημειωμένες τις 2,5-δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν

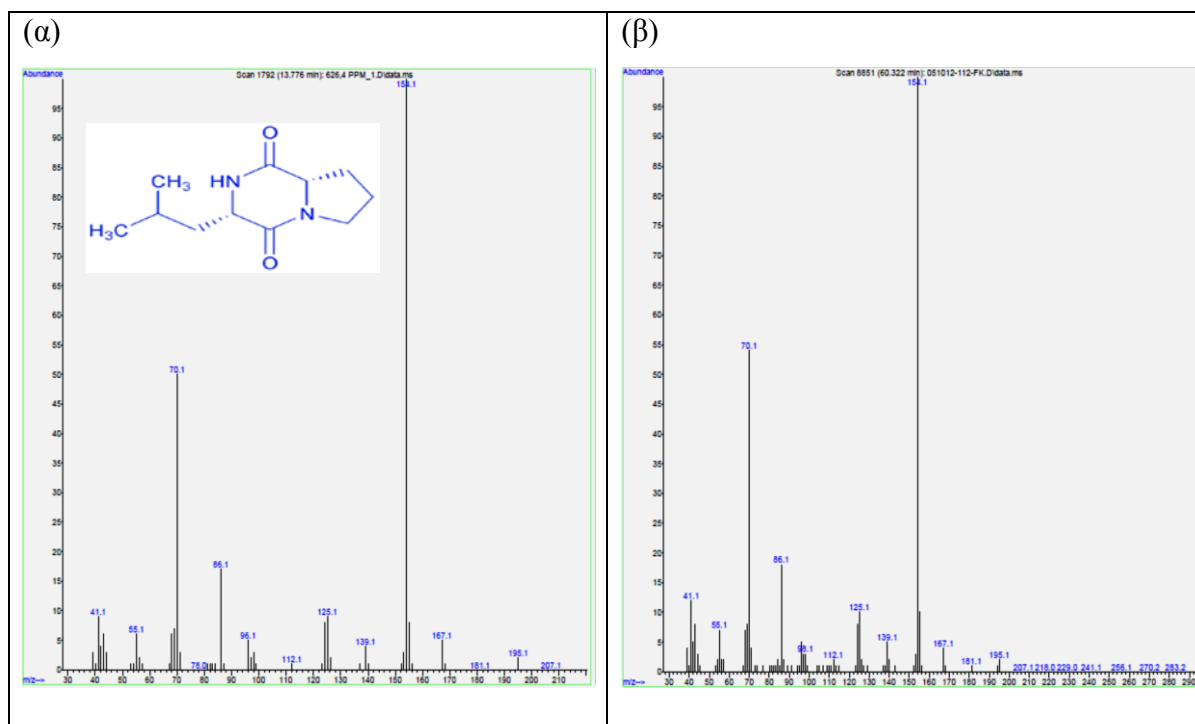
Συγκεκριμένα για την cyclo(Leu-Pro), στο GC-MS (EI) φάσμα της (Σχήμα 10.3.6), ανιχνεύθηκε θραύσμα σε m/z 210, το οποίο αντιστοιχεί στο θετικό μοριακό ιόν της $[M^+]$. Επίσης το θραύσμα σε m/z 195 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια

της πλευρικής ομάδας του μεθυλίου της λευκίνης [$M^+ - 15(CH_3)$]. Το θραύσμα σε m/z 154 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της προλίνης [$M^+ - 56(NCH_2CH_2CH_2)$]. Επίσης τα θραύσματα σε m/z 70 και σε m/z 86 αντιστοιχούν στην προλίνη και λευκίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H .

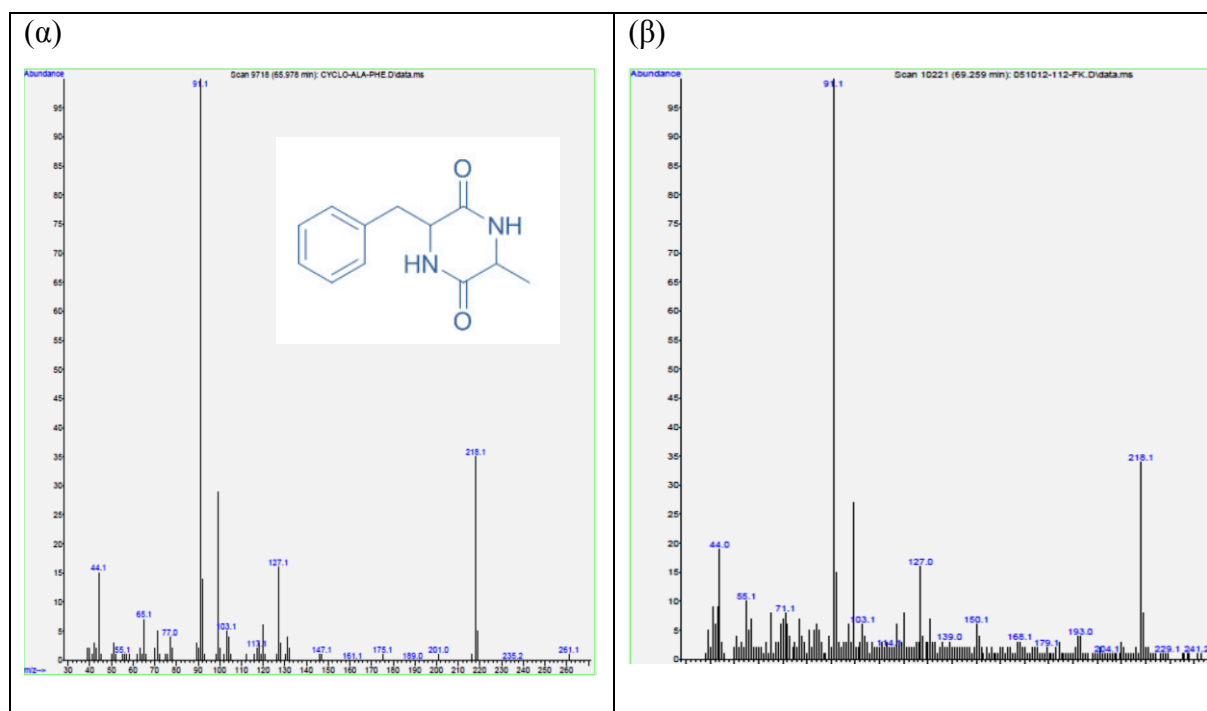
Για την *cyclo*(Ala-Phe), στο GC-MS (EI) φάσμα της (Σχήμα 10.3.7), ανιχνεύθηκε θραύσμα σε m/z 218, το οποίο αντιστοιχεί στο θετικό μοριακό ιόν της [M^+]. Το θραύσμα σε m/z 127 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της φαινυλαλανίνης [$M^+ - 91(C_7H_7)$]. Το θραύσμα σε m/z 99 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της φαινυλαλανίνης και της αλανίνης [$M^+ - 91(C_7H_7) - 28(C_2H_5)$]. Το θραύσμα σε m/z 91 αντιστοιχεί στην πλευρική ομάδα της φαινυλαλανίνης (C_7H_7). Το θραύσμα σε m/z 44 αντιστοιχεί στην αλανίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H .

Για την *cyclo*(Val-Phe), στο GC-MS (EI) φάσμα της (Σχήμα 10.3.8), ανιχνεύθηκε θραύσμα σε m/z 246, το οποίο αντιστοιχεί στο θετικό μοριακό ιόν της [M^+]. Το θραύσμα σε m/z 155 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της φαινυλαλανίνης [$M^+ - 91(C_7H_7)$]. Το θραύσμα σε m/z 127 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια τμήματος της φαινυλαλανίνης [$M^+ - 119(C_8H_9N)$]. Το θραύσμα σε m/z 112 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της φαινυλαλανίνης και της βαλίνης [$M^+ - 91(C_7H_7) - 43(C_3H_7)$]. Το θραύσμα σε m/z 91 αντιστοιχεί στην πλευρική ομάδα της φαινυλαλανίνης (C_7H_7). Επίσης τα θραύσματα σε m/z 120 και σε m/z 72 αντιστοιχούν στην φαινυλαλανίνη και βαλίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H .

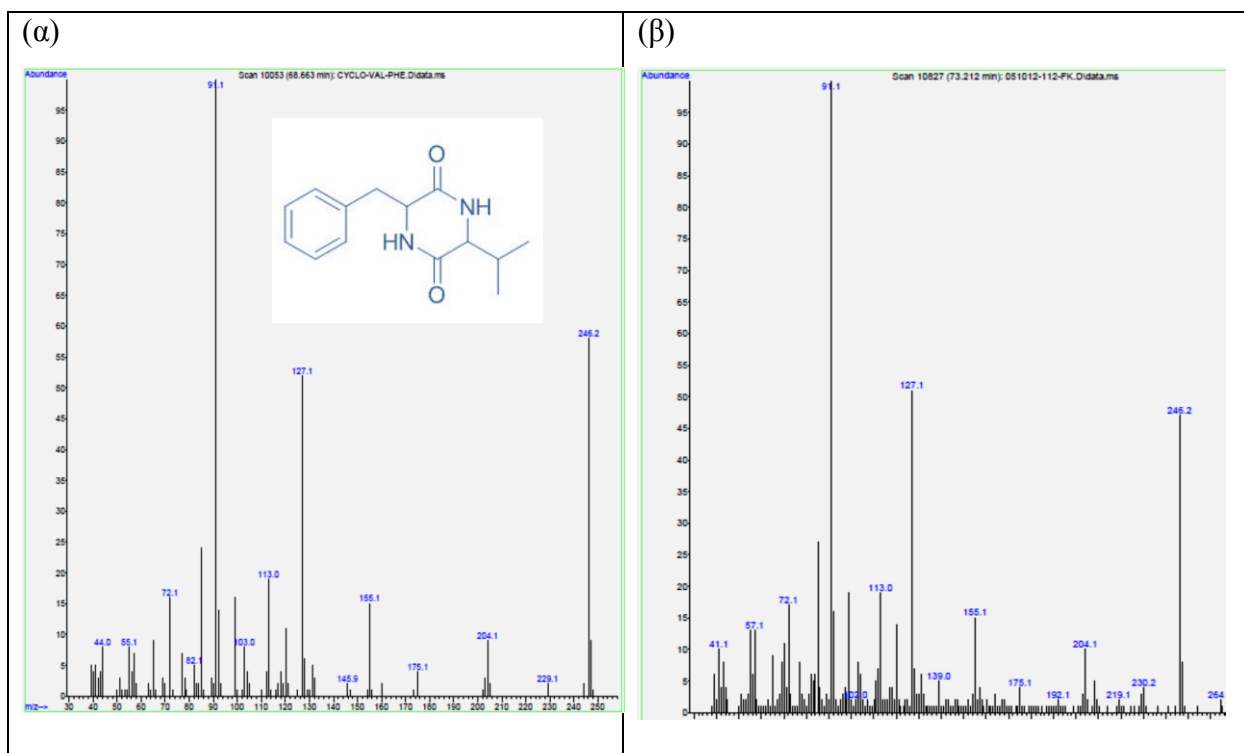
Για την *cyclo*(Phe-Pro), στο GC-MS (EI) φάσμα της (Σχήμα 10.3.9), ανιχνεύθηκε θραύσμα σε m/z 244, το οποίο αντιστοιχεί στο θετικό μοριακό ιόν της [M^+]. Το θραύσμα σε m/z 153 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια της πλευρικής ομάδας της φαινυλαλανίνης [$M^+ - 91(C_7H_7)$]. Το θραύσμα σε m/z 125 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μετά την απώλεια τμήματος της φαινυλαλανίνης [$M^+ - 119(C_8H_9N)$]. Το θραύσμα σε m/z 91 αντιστοιχεί στην πλευρική ομάδα της φαινυλαλανίνης (C_7H_7). Τα θραύσματα σε m/z 120 και σε m/z 70 αντιστοιχούν στην φαινυλαλανίνη και προλίνη μετά από την απώλεια της ομάδας του CO_2H .



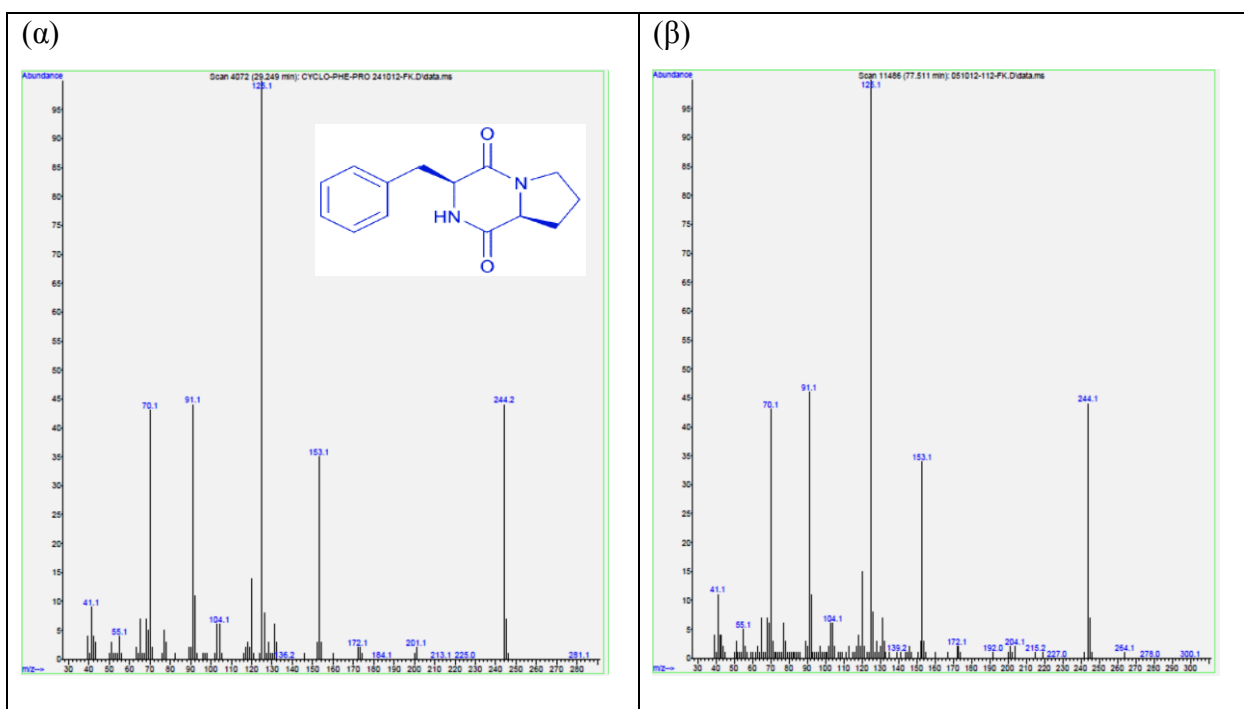
Σχήμα 10.3.6 Φάσμα μάζας της cyclo(Leu-Pro) α) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και β) που ανιχνεύθηκε σε δείγματα οίνου



Σχήμα 10.3.7 Φάσμα μάζας της cyclo(Ala-Phe) α) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και β) που ανιχνεύθηκε σε δείγματα οίνου



Σχήμα 10.3.8 Φάσμα μάζας της cyclo(Val-Phe) α) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και β) που ανιχνεύθηκε σε δείγματα οίνου



Σχήμα 10.3.9 Φάσμα μάζας της cyclo(Phe-Pro) α) που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και β) που ανιχνεύθηκε σε δείγματα οίνου

10.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 2,5-ΔΙΚΕΤΟΠΙΠΕΡΑΖΙΝΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΩΝ ΟΙΝΩΝ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών 2,5-δικετοπιπεραζινών έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της συνθετικής cyclo(Leu-Pro) με εσωτερικό πρότυπο την 1-(5.6.7.8-Tetrahydro-3.5.5.6.8.8-hexamethyl-2-naphthalenyl) ethanone. Τα ποσοτικά αποτελέσματα εκφράζονται σε mg δικετοπιπεραζινών ισοδυνάμων της cyclo(Leu-Pro) ανά L οίνου (Πίνακας 10.3.1).

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 10.3.1 τα δείγματα του οίνου PouillyFume, GuySagetFrance 2007 βρέθηκε ότι περιέχουν τη μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση 2,5-δικετοπιπεραζινών σε ισοδύναμα της cyclo(Leu-Pro).

Πίνακας 10.3.1Ολικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες που προσδιορίσθηκαν στα δείγματα εμφιαλωμένων κρασιών σε mg δικετοπιπεραζινών ισοδυνάμων της cyclo(Leu-Pro) ανά L οίνου

Ποικιλίες οίνων	cyclo(Leu-Pro) (mg/L)
Boutaris Xinomauros 2005	0,33±0,03a
Cabernet Sauvignon Hatzimichalis 2007	1,44±0,09b
Cabernet Sauvignon California 2001 Fetzer Vineyards	3,23±0,08c
DisenokoTokaji2009 Hungary	0,53±0,02d
Evelli, aged wine, Sampani 2002	0,86±0,06e
Harveys Bristol, Sherry, 2000	1,17±0,13f
Jerez, Real Tesoro, Fino, Sherry	1,01±0,11f
Malagouzia Antonopoulos Greece 2011	2,84±0,12g
Porto Ruby	0,49±0,03d
Pouilly Fume, Guy Saget France 2007	4,30±0,12h
Pouilly Fume, 2010, France	1,66±0,16b
Sauternes, Cordier France1996	2,13±0,09j
Savatiano, 2011	2,11±0,06j
Vinsanto 2004	0,61±0,02i

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Τα χαρακτηριστικά γεύσης που προσδίδουν οι δικετοπιπεραζίνες καθορίζονται από τη συγκέντρωσή τους στο τρόφιμο. Έτσι μπορούν να προσδώσουν αίσθηση πικρής γεύσης, αίσθηση ξηρότητας, αλμυρή ή μεταλλική γεύση, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 έως 50 mg/L (Borthwick&DaCosta, 2015). Ωστόσο, είναι αμφίβολο αν οι δικετοπιπεραζίνες που αναφέρθηκαν εδώ συμβάλουν σημαντικά είτε στο άρωμα ή στην γεύση των οίνων που μελετήθηκαν.

10.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την αεριοχρωματογραφική ανάλυση ταυτοποιήθηκαν συνολικά 4 2,5-δικετοπιπεραζίνες, η cyclo(Leu-Pro), η cyclo(Val-Phe), η cyclo(Ala-Phe) και η cyclo(Phe-Pro) στα δείγματα των εμφιαλωμένων οίνων που μελετήθηκαν,

αποτέλεσμα που αποτελεί πρωτότυπη αναφορά για τους οίνους αυτούς. Τα πιο πλούσια κρασιά σε DKP ήταν το Pouilly Fume, Guy Saget France 2007, το Cabernet Sauvignon California Fetzer Vineyards 2001 και το Malagouzia Antonopoulos Greece 2011, όπου ανιχνεύθηκαν και τα τέσσερα μοριακά είδη δικετοπιπεραζινών. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν υποδεικνύει τη σημασία της γεωγραφικής προέλευσης σε σχέση με το μεταβολικό προφίλ του κρασιού. Επίσης από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η χρονολογία πιθανόν να επηρεάζει το είδος και τη συγκέντρωση των δικετοπιπεραζινών. Αντιθέτως η ποικιλία του σταφυλιού δε φαίνεται να επηρεάζει το είδος και τη συγκέντρωση των δικετοπιπεραζινών. Τέλος η μέθοδος της οινοποίησης, οι ρυθμίσεις της οξύτητας και η παρουσία μικροοργανισμών όπως *Lactobacillus* sp., είναι πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την παρουσία των 2,5-δικετοπιπεραζινών στο κρασί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μεθοδολογία ανίχνευσης των 2,5-δικετοπιπεραζινών σε ποικιλίες επεξεργασμένων ελιών και σε ποικιλίες εγχώριων και μηεγχώριων εμφιαλωμένων οίνων. Οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες έχουν ανιχνευτεί σε αρκετά είδη τροφίμων και ποτών σε μικρές συγκεντρώσεις, συνεισφέρουν σημαντικά στη γεύση αυτών και επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως αντιμικροβιακή, αντιιική, αντιοξειδωτική, αντιυπεργλυκαιμική και αντιμεταλλαξιγόνο. Επιλέχθηκε να μελετηθούν οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες σε επεξεργασμένες ελιές και σε εμφιαλωμένους οίνους, δεδομένου ότι τα εν λόγω προϊόντα παρουσιάζουν μεγάλο διατροφικό, εμπορικό και οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα.

Αρχικώς αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν δύο τεχνικές εκχύλισης, μία για την παραλαβή των 2,5-δικετοπιπεραζινών από τις επεξεργασμένες ελιές και μία για την παραλαβή τους από τους εμφιαλωμένους οίνους. Η μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόστηκε στις επεξεργασμένες ελιές είναι μία τροποποίηση της μεθόδου των Ryan et al., (2009), η οποία θα μπορούσε να εφαρμοσθεί σε δείγματα τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα με τη μέθοδο αυτή απομακρύνεται το λίπος με εκχύλιση με εξάνιο, καταβυθίζονται οι πρωτεΐνες με ακετόνη-νερό και παραλαμβάνονται οι 2,5-δικετοπιπεραζίνες με διχλωρομεθάνιο. Η μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόστηκε στους εμφιαλωμένους οίνους βασίστηκε σε τροποποίηση της μεθόδου των Schneider et al. (1998).

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε μια μέθοδος HPLC–ESI–MSⁿ ανάλυσης με στόχο τον χημικό χαρακτηρισμό και την ανίχνευση των 2-5-δικετοπιπεραζινών. Για το σκοπό αυτόν, αναλύθηκε αρχικώς μίγμα 19 προτύπων 2-5-δικετοπιπεραζινών και αναπτύχθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας με κύριο κριτήριο το συνολικό χρόνο της ανάλυσης. Η χρωματογραφική μέθοδος που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού των παραπάνω 19 ενώσεων σε χρόνο λιγότερο από 7 min. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν οι μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων των

προτύπων 2,5-δικετοπιπεραζινών (DKPS) όπως προσδιορίστηκαν από το φάσμα ESI-MS¹ με υψηλή διακριτική ικανότητα και επίσης εκφρασμένες σε μονο-ισοτοπική βάση, καθώς και οι μοριακές μάζες των ιόντων με την σχετική αφθονία τους που παράγονται κατά τις διαδοχικές θραυσματώσεις (MSⁿ) και προτάθηκαν μηχανισμοί θραυσμάτωσης οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με το είδος των αμινοξέων που συνθέτουν τις δικετοπιπεραζίνες και με τη δομή τους (αρωματική ή αλειφατική αλυσίδα, ύπαρξη συμμετρίας). Για όλες τις πρότυπες ενώσεις οι πειραματικές μοριακές μάζες των πρωτονιωμένων ιόντων τους ήταν σε πολύ καλή συμφωνία με τις θεωρητικές μονο-ισοτοπικές μάζες, εμφανίζοντας σφάλμα ίσο ή μικρότερο των 2,1 ppm, επιβεβαιώνοντας έτσι τη στοιχειακή τους σύσταση. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με την υψηλή διακριτική ικανότητα που επιτυγχάνεται με τον αναλυτή Orbitrap, δίνουν τη δυνατότητα να ταυτοποιηθούν με την μέθοδο αυτή, πέρα από τις δεκαεννέα (19) 2,5-δικετοπιπεραζίνες και άλλες δομές αναλόγων ενώσεων, χωρίς την ύπαρξη προτύπων ενώσεων και βιβλιοθηκών μοριακών μαζών.

Όσο αφορά την ανίχνευση των 2,5-δικετοπιπεραζινών στα επεξεργασμένα δείγματα ελιάς, τα εκχυλίσματα από τα δείγματα ελιάς αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης συζευγμένης με αναλυτή μαζών τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap analyzer) και η ανίχνευση των 2,5-δικετοπιπεραζινών προέκυψε από τη σύγκριση των χρόνων εκλούσεώς τους, των πειραματικών μοριακών μαζών των πρωτονιωμένων ιόντων τους, όπως και των διαδοχικών φασμάτων μάζας τους με τα αντίστοιχα των προτύπων ενώσεων. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 8 αλειφατικές και αρωματικές 2,5-δικετοπιπεραζίνες στα δείγματα των Ελληνικών ποικιλιών ελιών που μελετήθηκαν, αποτέλεσμα που αποτελεί πρωτότυπη αναφορά για τις μεταποιημένες ελιές (Bratakos et al., 2016b). Στις ποικιλίες Κοθρέϊκες μεσαίου μεγέθους από την Άμφισσα (Δείγμα 2), Καλαμών μεσαίου μεγέθους από την Ηλεία (Δείγμα 4) και Χονδροελιές μεγάλου μεγέθους από την Άμφισσα (Δείγμα 6), ανιχνεύθηκαν συνολικά επτά 2,5-δικετοπιπεραζίνες. Η cyclo(Phe-Phe) ανιχνεύθηκε και στα 14 δείγματα επεξεργασμένων ελιών, οπότε θα μπορούσε να θεωρηθεί χαρακτηριστικό μοριακό είδος των ελιών αυτών. Από τις οκτώ διαφορετικές δικετοπιπεραζίνες που ανιχνεύθηκαν οι τέσσερις ήταν μοριακά ανάλογα της προλίνης. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το προφίλ των 2,5-δικετοπιπεραζινών των

επεξεργασμένων ελιών πιθανώς σχετίζεται με γενετικούς και γεωγραφικούς παράγοντες, τις συνθήκες καλλιέργειας, και τη διαδικασία της ζύμωσης.

Τέλος, αναπτύχθηκε μια μέθοδος GC-MS ανάλυσης για τον προσδιορισμό της σύστασης των 2,5-δικετοπιπεραζινών σε εμφιαλωμένους οίνους. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, επιλέχθηκε να γίνει οργανική σύνθεση τεσσάρων 2,5-δικετοπιπεραζινών cyclo(Leu-Pro), cyclo(Val-Phe), cyclo(Ala-Phe), cyclo(Phe-Pro) με απώτερο στόχο την πλήρη ταυτοποίηση των δικετοπιπεραζινών στους μελετούμενους οίνους. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την χρήση προστατευμένων διπεπτιδίων με την ομάδα BOC στην πλευρά της αμινομάδας και με μεθυλεστέρα στην πλευρά της καρβοξυλομάδας, ενώ για την πραγματοποίηση της πεπτιδικής σύνθεσης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο HBTU ως ενεργοποιητής. Μετά την διαδικασία της οργανικής σύνθεσης των ουσιών ακολούθησε ο καθαρισμός τους με την χρήση χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης (OCC), αφού πρώτα διαχωρίστηκαν σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Οι παραπάνω 2,5-δικετοπιπεραζίνες που προέκυψαν από τη χημική σύνθεση ελέγχθηκαν ως προς τη δομή τους με φασματοσκοπία μάζας και ^1H NMR. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε μέθοδος αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας για τον διαχωρισμό των 2,5-δικετοπιπεραζινών που προέκυψαν από τη χημική σύνθεση.

Όσο αφορά την ανίχνευση των 2,5-δικετοπιπεραζινών στους εμφιαλωμένους οίνους, τα εκχυλίσματα από τα δείγματα οίνου αναλύθηκαν με τη GC-MS μέθοδο που αναπτύχθηκε. Η ανίχνευση των 2,5-δικετοπιπεραζινών προέκυψε από τη συγκριτική μελέτη των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζας του μίγματος των συνθετικών δικετοπιπεραζινών και των δειγμάτων. Εκτός από την ποιοτική ανάλυση των 2,5-δικετοπιπεραζινών στους οίνους, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών δικετοπιπεραζινών εκφρασμένων ως mg της cyclo(Leu-Pro) ανά L οίνου. Με την αεριοχρωματογραφική ανάλυση ταυτοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις 2,5-δικετοπιπεραζίνες στα δείγματα των εμφιαλωμένων οίνων που μελετήθηκαν, αποτέλεσμα που αποτελεί πρωτότυπη αναφορά. Τα πιο πλούσια κρασιά σε 2,5-δικετοπιπεραζίνες ήταν το Pouilly Fume, Guy Saget France 2007, το Cabernet Sauvignon California Fetzer Vineyards 2001 και το Malagouzia Antonopoulos Greece 2011, όπου ανιχνεύθηκαν και τα τέσσερα μοριακά είδη δικετοπιπεραζινών. Επίσης 2,5-δικετοπιπεραζίνες προσδιορίστηκαν ως επι το πλείστον σε μεγαλύτερες

συγκέντρωσεις στα παλαιωμένα κρασιά. Με βάση τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το προφίλ και η συγκέντρωση των 2,5-δικετοπιπεραζινών στους οίνους, πιθανώς σχετίζεται με τη γεωγραφική προέλευση, τη χρονολογία και τη μέθοδο της οινοποίησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., (2010). Protein Structure and Function. Essential Cell Biology, Third Edition, Garland Science, New York, USA, pp. 120–70. ISBN: 978-0-8153-4454-4.

Ambrogelly Alexandre, Palioura Sotiria, and Söll Dieter, (2007). Natural Expansion of the Genetic Code. *Nature Chemical Biology*, 3(1), 29–35.

Ambrogelly, A., Palioura, S., & Söll, D., (2007). Natural Expansion of the Genetic Code. *Nature Chemical Biology*, 3(1), 29–35.

Axel, C., Zannini, E., Arendt, E. K., Waters, D. M., & Czerny, M.,(2014). Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2 by HRGC/MS using stable isotope dilution assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(9–10), 2433–2444.

Bellissent-Funel Marie-Claire, Hassanali Ali, Havenith Martina, Henchman Richard, Pohl Peter, Sterpone Fabio, van der Spoel David, Xu Yao, and Garcia Angel E., (2016). Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins. *Chemical Reviews*, 116(13), 1-26.

Ben Ameer Mehdi, L., Shaaban, R., Rebai, K. A., Smaoui, I. K., Bejar, S., & Mellouli, S., (2009). Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the *Streptomyces* sp. strain TN58. *Nat. Prod. Res*, 23, 1095–1107.

Berg Jeremy M., Tymoczko John L., and Stryer Lubert, (2002). *Biochemistry*, Fifth Edition, Freeman W.H., New York, USA.

Bodanszky M. and Bodanszky A., (1994). *The Practice of Peptide Synthesis*. Second Revised Edition, Springer – Verlag, Berlin.

Bodanszky M., (1993). *Peptide Chemistry*. Second Revised Edition, Springer – Verlag, Berlin.

- Borthwick, A. D., & Da costa, N. C., (2015). 2,5-Diketopiperazines in Food and Beverages: Taste and Bioactivity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57(4), 718-742.
- Borthwick, A. D., (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chemical Reviews*, 112, 3641-3716.
- Borthwick, A. D., (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chemical Reviews*, 112, 3641-3716.
- Boskou, G., Salta, F. N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., Andrikopoulos, N. K., (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94(4), 558-564.
- Bown, A. W., & Shelp, B. J., (1997). The Metabolism and Functions of γ -Aminobutyric Acid. *Plant Physiology*, 115(1), 1–5.
- Brändén Carl-Ivar, and Tooze John, (2009). *Introduction to Protein Structure*. Second Edition, Publisher: Garland Pub., New York, USA, ISBN 0-8153-2305-0.
- Bratakos, S.M., Sinanoglou*, V.J., Siapi, E., Matsoukas, M.T., Papahatjis, D.P., Riganakos, K., and Zoumpoulakis**, P. (2016). Fragmentation patterns of aromatic 2,5-diketopiperazines using liquid chromatography/mass spectrometry. *Current Analytical Chemistry*, 12(5), 439-449. (I F: 1.132).
- Bratakos, S.M., Zoumpoulakis*, P., Siapi, D.P., Riganakos, K., and Sinanoglou*, V.J. (2016). Determination of 2,5-diketopiperazines in Greek Processed Olives by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 4(SI. 2), 63-76.
- Brauns, S. C. A., (2004). The Effects of Selected Proline-based Cyclic Dipeptides on Growth and Induction of Apoptosis in Cancer Cells. PhD Thesis: University of Port Elizabeth.
- Chen, C.C., Liou, Y. H., & Chen, S. E.,(2004). Two-step Mass Spectrometric Approach for the Identification of Diketopiperazines in Chicken Essence. *Eur. Food Res. Tech.*, 218(6) 589–597.

Chen, M. Z., Dewis, M. L., Kraut, K., Merritt, D., Reiber, L., Trinnaman, L., & Da Costa, N. C., (2009). 2, 5-Diketopiperazines (cyclic dipeptides) in beef: Identification, synthesis, and sensory evaluation. *J. Food Sci.*, 74(2), 100–105.

Chen, M. Z., Dewis, M. L., Kraut, K., Merritt, D., Reiber, L., Trinnaman, L., Da Costa, N. C., (2009). 2,5-Diketopiperazines (Cyclic Dipeptides) in Beef: Identification, Synthesis, and Sensory Evaluation. *Journal of Food Science*, 74, C100–C105.

Chen, Y. H., Liou, S. E., & Chen, C. C., (2004). Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. *Eur. Food Res. Technol.*, 218(6), 589–597.

Chen, Y. H., Liou, S. E., Chen, C. C., (2004). Two-step Mass Spectrometric Approach for the Identification of Diketopiperazines in Chicken Essence. *European Food Research and Technology*, 218, 589-597.

Chin David, and Means Anthony R., (2000). Calmodulin: a Prototypical Calcium Sensor. *Trends in Cell Biology*, 10, (8), 322–328.

Cornacchia, C., Cacciatore, I., Baldassarre, L., Mollica, A., Feliciani, F., & Pinnen, F., (2012). 2,5-Diketopiperazines as Neuroprotective Agents. *Mini Rev. Med. Chem.*, 12(1), 2–12.

Csapo Janos, Albert Csilla, Loki Katalin, Csapo-Kiss Zs., (2008). Separation and Determination of the Amino Acids by Ion Exchange Column Chromatography Applying Postcolumn Derivatization. *Sapientia, Hungarian University of Transylvania, Acta Universitatis Sapientiae - Alimentaria*, 1, 5–29, Ref.28.

Da Costa, L., Chen, N. C., Merritt, M. Z., & Trinnaman, D., (2010). Methionine Containing Cyclic Dipeptides: Occurrence in Natural Products, synthesis, and Sensory Evaluation. *ACS Symposium Ser. Control. Mail. pathways to Gener. flavors*, 1042, 111–120.

Davies R.L., Bagient D.R., Levitt M.S., Mollah Y., Rayner C.J., and Frensham A.B., (1992). Accuracy and Precision in Amino Acid Analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 423–436.

De Carvalho, M. P., & Abraham, W. R.,(2012). Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Curr Med Chem.*, 19(21), 3564–3577.

Dourtoglou, E. G., Marinea, M., Filandra, K., Bratakos, S., Dourtoglou, V.G., (2012). Diketopiperazines in wine. *Bull. l'OIV Izmir, Turkey*, 85, 459–468.

Dow Jocelyn, Lindsay Gordon and Morrison Jim, (1996). *Biochemistry: Molecules, Cells and the Body*. Addison – Wesley.

Dow Jocelyn, Lindsay Gordon, and Morrison Jim, (1996). *Biochemistry: Molecules, Cells and the Body*. Addison-Wesley. ISBN: 0201631873, 9780201631876.

Ducheyne Paul (Editor in Chief), Healy Kevin, Hutmacher Dietmar E., Grainger David W., Kirkpatrick C. James (Co-Editors), (2017). *Comprehensive Biomaterials II. Second Edition, Volumes 1-7, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, Volume 1: Metallic, Ceramic and Polymeric Biomaterials*, Elsevier B.V. Ltd, Amsterdam, Netherlands, Hardcover, ISBN: 9780081006917

El-Gendy B. E.-D. M., & Rateb, M. E., (2015). Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25(16), 3125–3128.

Elkahoui, S., Abdel Rahim, H., Tabbene, O., Shaaban, M., Limam, F., Laatsch, H., (2013). Cyclo-(His,Leu): A new microbial diketopiperazine from a terrestrial *Bacillus subtilis* strain B38. *Natural Product Research*, 27(2), 108-116.

Fersht Alan, (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. Second Printing, pp 631, Editor: Freeman W.H. and Company, New York, USA. ISBN: 0716732688, 9780716732686.

Foster, A. C., & Kemp, J. A., (2006). Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), 7–17.

Frenkel, J., Wess, C., Vyverman, W., & Pohnert, G.,(2014). Chiral separation of a diketopiperazine pheromone from marine diatoms using supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 951–952, 58–61.

Friedman Mendel, (1999). Chemistry, Nutrition, and Microbiology of D-Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3457-79.

Friedman Mendel, (2010). Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids. *Chemistry and Biodiversity*, Special Issue: D-Amino Acid Research in Chemistry, Life Sciences, and Biotechnology, 7(6), 1491–1530.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E.; Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2009). Gaussian 09, Revision D.09,

Furtado, N. A. J. C., Pupoa, M. T., Carvalhoa, I., Campoa, V. L., Duarteb, M. C. T. and Bastos, J. K., (2005). Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16, 1448-1453.

Furtado, N.A., Vesseccchi, R., Tomaz, J.C., Galembeck, S.E., Bastos, J.K., Lopes, N.P., Crotti, A.E., (2007). Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J. Mass Spectrom.*, 42(10), 1279-1286.

Furtadoa, J. K., Pupoa, N. A. J. C., Carvalhoa, M. T., Campoa, I., Duarteb V. L., & Bastos, M. C. T., (2005). Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16, 1448–1453.

Furukawa, T., Akutagawa, T., Funatani, H., Uchida, T., Hotta, Y., Niwa, M., & Takaya, Y.,(2012). Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. *Bioorganic Med. Chem.*, 20(6), 2002–2009.

Gautschi, M., Schmid, J. P., Peppard, T. L., Ryan, T. P., Tuorto, R. M., & Yang, X., (1997). Chemical Characterization of Diketopiperazines in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 45,(1992), 3183–3189.

Gautschi, M., Schmid, J. P., Peppard, T. L., Ryan, T. P., Tuorto, R. M. and Yang, X. (1997). Chemical Characterization of Diketopiperazines in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3183-3189.

Gillard, J., Frenkel, J., Devos, V., Sabbe, K., Paul, C., Rempt, M., Inz, D., Pohnert, G., Vuylsteke, M. & Vyverman, W., (2013). Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52(3), 854–857.

Ginz, U. H., & Engelhardt, M., (2000). Identification of Proline-Based Diketopiperazines in Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3528–3532.

Gomez, A. H. S., Garcia, P. G., Navarro, L. R., (2006).Trends in table olive production - Elaboration of table olives. *Gracas y Aceites*, 57, 86–94.

Goodman Murray, and Steuben Kenneth C., (1962). Peptide synthesis via amino acid active esters. II. Some abnormal reactions during peptide synthesis. *Journal of American Chemical Society*, 84(7), 1279–1283.

Grainger, H., Tattersall, K.,(2005). *Wine production: Vine to bottle*. Oxford, UK. Blackwell Publ.

Graz, C. J. M., (2002). *Cyclic Dipeptides as Novel Antimicrobial Agents.*, PhD Thesis: University of Port Elizabeth.

Grimaldo Marco, (2016). *Global and Internal Diffusive Dynamics of Proteins in Solution Studied by Neutron Spectroscopy*. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, der Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland,

- Gu, B., He, S., Yan, X., & Zhang, L., (2013). Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(19), 8439–8453.
- Guan, P., Mathai, J., Harris, S., Wen, P., Zhang, J. Y., Brimble, R., & Gluckman, M., (2007). Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharm.*, 53,749–762.
- Gudasheva, G., Boyko, T. A., Akparov, S. S., Ostrovskaya, V. K., Skoldinov, R. U., Rozantsev, S. P., & Voronina, S. B. G., Zherdev, T.A., & Seredenin, V. P.,(1996). Identification of a Novel Endogenous Memory Facilitating Cyclic Dipeptide Cyclo-Prolyl-Glycine in Rat Brain. *Febs Lett.*, 391, 149–152.
- Gumbart James, Trabuco Leonardo G., Schreiner Eduard, Villa Elizabeth, and Schulten Klaus, (2009). Regulation of the Protein-conducting Channel by a Bound Ribosome. *Structure*, 17, 1453-1464.
- Guo, Y-C., Cao, S-X., Zong, X-K., Liao, X-C., Zhao, Y-F., (2009). ESI-MSⁿ study on the fragmentation of protonated cyclic-dipeptides. *Spectroscopy*, 23(3-4), 131-139.
- Hermann Janice R., (2007). Protein and the Body. Oklahoma Cooperative Extension Service, Series:T, OSU fact sheets, T-3149 and T-3163 (pp 1-4), Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA, <http://osufacts.okstate.edu>.
- Holden, M. T., Ram Chhabra, S., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S., Williams, P., (1999). Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1254-1266.
- Huberman, R., Gollop, L., Mumcuoglu, N., Breuer, K. Y., Bhusare, E., Shai, S. R., & Galun, Y.,(2007). Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.*, 21, 127–13.

Iwaniak Anna, and Minkiewicz Piotr, (2008). Biologically Active Peptides Derived from Proteins. Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 58(3), 289-294.

Iwasaki Yusuke, Sawada Takahiro, Hatayama Kentaro, Ohyagi Akihito, Tsukuda Yuri, Namekawa Kyohei, Ito Rie, Saito Koichi and Nakazawa Hiroyuki, (2012). Separation Technique for the Determination of Highly Polar Metabolites in Biological Samples. *Metabolites*, 2(3), 496-515.

Jamie, P. J., Kilian, H., and Milne, G., (2002). Hepatotoxicity of the isomers of cyclo (Trp-Pro). *Pharmazie*, 57, 638–642.

Jamie, P. J., Kilian, H., Dyason, G., & Milne, K., (2002). The effect of the isomers of cyclo(Trp-Pro) on heart and ion-channel activity. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1659–1665.

Jensen Bernard (2007). *Chemistry of Man*. Man Series, Second Edition, Hardcover: pp 599, Publisher: Whitman Publications. ISBN-10: 1885653247.

Karlson Peter, (1998). *Βιοχημεία*. Μετάφραση: Σέκερης Κ.Ε, Φραγκούλης Ε. και Σέκερη-Παταργιά Κ.Ε., 14η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.

Khan Academy, (2017). *Biology Macromolecules: Introduction to Peptide bond formation and protein structure*. KHANACADEMY, Google Classroom Facebook, [https://www. Khanacademy.org/](https://www.Khanacademy.org/) and [http://international. Khanacademy. org](http://international.Khanacademy.org).

Khavinson Vladimir Kh., (2002). *Peptides and Ageing*, *Neuroendocrinology Letters*, Special Issue, Volume 23, Supplement 3, 144 pages, Stockholm, Sweden.

Königshoff Melanie, Brandenburger Timo, *Kurzlehrbuch Biochemie*, Thieme Georg Verlag, (2012). 3rd Revised Version, Stuttgart/New York. ISBN: 9783131364135.

Kontopidis G., Holt C., and Sawyer L., (2004). *beta-Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function*. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785–96.

Kraynov E., Martin S.W., Hurst S., Fahmi O.A., Dowty M., Cronenberger C., Loi C.M., Kuang B., Fields O., Fountain S., Awwad M., Wang D, (2011). *How Current Understanding of Clearance Mechanisms and Pharmacodynamics of Therapeutic*

Proteins can be Applied for Evaluation of their Drug-drug Interaction Potential. *Drug Metabolism Disposition*, 39, 1779-1783.

Krchnak V., Weichsel A.S., Cabel D., Flegelova Z., Lebl M., (1996). Structurally homogeneous and heterogeneous synthetic combinatorial libraries. *Journal of Molecular Diversity*, 1(3), 149–164.

Lautru, S., Gondry, M., Genet, R., Pernodet, J.,(2002). The Albonoursin Gene Cluster of *S. Noursei*: Biosynthesis of Diketopiperazine Metabolites Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology*, 9, 1355-1364.

Leader Benjamin, Baca Quentin J. and Golan David E., (2008). Protein Therapeutics: a Summary and Pharmacological Classification. *A Guide to Drug Discovery — Opinion*, Nature Publishing Group, Nature Reviews, Drug Discovery, 7, 21-39.

Lee, C., Yang, W., Parr, R.G., (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter.*, 37(2), 785-789.

Lee, R., & Kofonow, J., (2014). Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *J. Clin. Invest.*, 124(3).

Lelais Gérald, and Seebach Dieter, (2004). β 2 -Amino Acids—Syntheses, Occurrence in Natural Products, and Components of β -Peptides^{1,2}. *Biopolymers, Peptide Science*, 76(3), 206 –243.

Li Y., Garrell R.L., and Houk K.N., (1991). Mechanism of cis-trans isomerization of amide and peptide excited states. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 5895–5896.

Li, X., Tang, H., Duan, J., Gao, J., & Xue, Q.,(2013). Bioactive alkaloids produced by *Pseudomonas brassicacearum* subsp . *Neaurantiaca* , an endophytic bacterium from *Salvia miltiorrhiza*. *Nat. Prod. Res.*, 6419.

Lin, A., Fang, Y., Zhu, T., Gu, Q., Zhu, W., (2008). A new diketopiperazine alkaloid isolated from an algicolous *Aspergillus flavus* strain. *Pharmazie*, 63(4), 323-325.

- Lindorff-Larsen Kresten, Piana Stefano, Dror Ron O., and Shaw David E., (2011). How Fast-Folding Proteins Fold. *Science*, 334(6055), 517-520.
- Lu, X., Shen, Y., Zhu, Y., Xu, Q., Liu, X., Ni, K., & Cao, X., (2009). Diketopiperazine constituents of marine *Bacillus subtilis*. *Chem. Nat. Compd.*, 45(2), 244–246.
- Mahmood I., and Green M.D., (2007). Drug Interaction Studies of Therapeutic Proteins or Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47, 1540-1554.
- Marinea, M., Dourtoglou, E. G., & Dourtoglou, V. G., (2013). New Trends in Analysis of Diketopiperazines in Wine, 36th World Congr. Vine Wine. Bucharest, Rom.
- Martins, M. B., & Carvalho, I., (2007). Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63(40), 9923–9932.
- McClements David Julian, (2015). Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques. Third Edition, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. ISBN 9781498726689.
- Meier C., Weil T., Kirchhoff F., and Münch J., (2014). Peptide nanofibrils for boosting retroviral gene transfer. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(5), 438–451.
- Mitova, M., Tommonaro, G., Hentschel, U., Muller, W. E. G. & De Rosa, S. (2004). Exocellular cyclic dipeptides from a *Ruegeria* strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. *Mar. Biotech.*, 6, 95-103.
- Mitova, S., Tutino, M., Infusini, M. L., Marino, G., & De Rosa, G.,(2005). Exocellular Peptides from Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromonas Haloplanktis*. *Mar. Biotechnol.*, 7, 523–531.
- Murphy Kenneth P., (2001). Protein Structure, Stability, and Folding. Book Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 168, Publisher: Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. ISBN: 978-0-89603-682-6.

Murray R.F., Harper H.W., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., (2006). Harper's Illustrated Biochemistry. Lange Medical Books, McGraw-Hill, New York, USA, ISBN 0-07-146197-3.

Murzin Alexey G., Brenner Steven E., Hubbard Tim, and Chothia Cyrus, (1995). SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures. *Journal of Molecular Biology*, 247(4), 536-540.

Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., & Zulini, L.,(2007). Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola* : An ultrastructural study. *Micron.*, 38, 643–650.

Nelson David L., and Cox Michael M., (2012). Lehninger Principles of Biochemistry. Sixth Edition, Macmillan Higher Education, International Edition, ISBN-10: 1429234148.

Nevzorov I.A. and Levitsky D.I., (2011). Tropomyosin: Double Helix from the Protein World. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, Pleiades Publishing Ltd., Moscow, Russia, *Biochemistry*, 76(13), 1507-1527.

Nishanth, Kumar, S., Mohandas, C., & Nambisan, B.,(2013). Purification of an antifungal compound, cyclo(l-Pro-d-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. *Microbiol. Res.*, 168(5), 278–288.

Palmore G.T.R., MacDonald J.C., (2000). The Amide Linkage: Selected Structural Aspects. In *Chemistry, Biochemistry and Material Science*. Greenberg A., Breneman C.M., Liebman J. F., Editors, John Wiley and Sons Inc., New York, pp 291–336.

Park, A. E., Gunasekera, Y.C., Lopez, S. P., McCarthy, J.V., & Wright, P.J., (2006). Metabolites from the marine-derived fungus *Chromocleista* sp. isolated from a deep-water sediment sample collected in the Gulf of Mexico. *J Nat Prod.*, 69, 580–584.

Park, Y. C., Gunasekera, S. P., Lopez, J. V., McCarthy, P. J. & Wright, A. E. (2006) Metabolites from the marine-derived fungus *Chromocleista* sp. isolated from a deep-water sediment sample collected in the Gulf of Mexico. *J. Nat. Prod.*, 69, 580-584.

Particle Sciences, Lubrizol Life Sciences, Drug Development Services, (2009). Protein Structure. Technical Brief Volume 8, Bethlehem, PA, USA. www.particlesciences.com

Pedras, Y. A. Z., Yu, M. S. C., Liu, Y., & Tandron-Moya J.,(2005). Metabolites Produced by the Phytopathogenic Fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, Chemical Structure Determination, Syntheses and Bioactivity., *J. Biosci.*, 60(9-10), 717–722.

Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., Estevinho, M. L., (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2895-2902.

Pérez-Picaso, L., Olivo, H. F., Argotte-Ramos, R., Rodríguez-Gutiérrez, M. D. C., Rios, M., (2012). Y. Linear and Cyclic Dipeptides with Antimalarial Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 7048–7051.

Peters C.W., Kruse U., Pollwein R., Grzeschik K.H., Sippel A.E., (1989). The Human Lysozyme Gene. Sequence Organization and Chromosomal Localization. *European Journal of Biochemistry*, 182(3), 507–516.

Prasad, C., (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16,(1), 151–164.

Qiao Xiaoqiang, Wang Li, Ma Junfeng, Deng Qiliang, Liang Zhen, Zhang Lihua, Peng Xiaojun, Zhang Yukui, (2009). High Sensitivity Analysis of Water-soluble, Cyanine Dye Labeled Proteins by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytica Chimica Acta*, 640(2), 114–120.

Radzicka A., Pedersen L., Wolfenden R., (1988). Influences of solvent water on protein folding: free energies of solvation of cis and trans- peptides are nearly identical. *Biochemistry*, 27, 4538–4541.

Rajappa S., and Natekar M.V., (1993). Piperazine-2,5-diones and related lactim ethers, In *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 57, 187–289.

Rhee, K. H., (2006). In vitro activity of cyclic dipeptides against gram-positive and gram-negative anaerobic bacteria and radioprotective effect on lung cells. J. Microbiol. Biotechnol., 16, 158–162.

Rhee, K. H., (2006). In vitro activity of cyclic dipeptides against gram-positive and gram-negative anaerobic bacteria and radioprotective effect on lung cells. J. Microbiol. Biotech., 16, 158-162.

Rosenthal Gerald A., (1982). Plant Non-protein Amino and Imino Acids: Biological, Biochemical, and Toxicological Properties. Academic Press, Boston, USA, ISBN 0-12-597780-8.

Rosenthal, G. A., (1982). Plant Non-protein Amino and Imino Acids: Biological, Biochemical, and Toxicological Properties. Academic Press, Boston, USA, ISBN 0-12-597780-8.

Rother Michael, and Krzycki Joseph A., (2010). Selenocysteine, Pyrrolysine, and the Unique Energy Metabolism of Methanogenic Archaea. Archaea, Article ID 453642, Review Article, 14 pages.

Ryan, K. P., Dal Bello, L. A., Arendt, F.,(2009). Detection and Quantitation of 2,5-Diketopiperazines in Wheat Sourdough and Bread. J. Agric. Food Chem., 57, 9563–9568.

Ryan, L. A. M., Dal Bello, F., Arendt, E. K., Koehler, P., (2009). Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 9563-9568.

Sammes P.G., (1975). Naturally occurring 2,5-dioxopiperazines and related compounds, In Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe. Herz W., Grisebach H., Kirby G.W., Springer-Verlag, Wien, Austria, 32, 51–118,

Samonina, L., Ashmarin, G., and Lyapina, I.,(2002). Glyproline peptide family: review on bioactivity and possible origins. Pathophys., 8, 229–234.

Schneider, R., Baumes, R., Bayonove, C., & Razungles, A., (1998). Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (vines doux naturels) from Grenache Noir. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46, 3230-3237.

Schulz G. E., and Schirmer R. H., (1990). Principles of Protein Structure. Springer Advanced Texts in Chemistry, Editor: C. R. Cantor, Springer-Verlag, New York, USA.

Schwarz Elisabeth L., Roberts William L., Pasquali Marzia, (2005). Analysis of Plasma Amino Acids by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. Clinica Chimica Acta, 354, 204–209.

Stark, T., & Hofman.,(2005). Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (Theobroma Cacao). J. Agric. Food Chem., 53, 7222–7231.

Stark, T., & Hofmann, T., (2005). Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (Theobroma Cacao). J. Agric. Food Chem., 53, 7222-7231.

Stephens, P.J.; Devlin, F.J.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J., (1994). Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. J. Phys. Chem., 98(45), 11623–11627.

Stevens Frits C., (1983). Calmodulin: An Introduction. Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, 61(8), 906-910.

Stierle, A. C., Cardellina, J. H., Strobel, G. A., (1988). Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternate*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(2), 8008-8011.

Stonik, I.,(2015). Low-Molecular-Weight Metabolites from Diatoms: Structures, Biological Roles and Biosynthesis. Mar. Drugs., 13, 3672–3709.

Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., Schnürer, J., (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 68(9), 4322-4327.

Suske G., (1999). The Sp-Family of Transcription Factors. Review, Gene, 238(2), 291–300.

Takaya, M., Furukawa, Y., Miura, T., Akutagawa, S., Hotta, T., Ishikawa, Y., & Niwa, N., (2007). Antioxidant Constituents in Distillation Residue of Awamori Spirits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 75–79.

Tropp Burton E., (2011). *Molecular Biology: Genes to Proteins*. Fourth Revised Edition, pages 1097, Jones & Bartlett Learning Publishers, Sudbury MA, USA.

Tsuruoka, N., Beppu, Y., Koda, H., Doe, N., Watanabe, H., Abe, K. A., (2012). DKP cyclo(L-Phe-L-Phe) found in chicken essence is a dual inhibitor of the serotonin transporter and acetylcholinesterase. *PLoS ONE*, 7(11), 1-10.

Tullberg, M., Grøtli, M., & Luthman, K., (2006). Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating. *Tetrahedron*, 62(31), 7484–7491.

USDA, United States Departure of Agriculture, National Research Council, Institute of Medicine, (2005). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. National Academies Press, pages 1319, Lockbox 285, Washington DC, USA.

Van der Merwe, E., Huang, D., Peterson, D., Kilian, G., Milne, P. J., Van de Venter, M., & Frost, C., (2008). The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines. *Peptides*, 29(8), 1305–1311

Veenhoff Liesbeth M., Heuberger Esther H.M.L. and Poolma Bert, (2002). Quaternary Structure and Function of Transport Proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(5).

Villa Elizabeth, Sengupta Jayati, Trabuco Leonardo G., LeBarron Jamie, Baxter William T., Shaikh Tanvir R., Grassucci Robert A., Nissen Poul, Ehrenberg Måns, Schulten Klaus, and Frank Joachim, (2009). Ribosome-induced Changes in Elongation Factor Tu Conformation Control GTP Hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 1063-1068.

Vitt S.V., Paskonova E.A., Saporovskaia M.B., and Belikov V.M., (1990). The Composition of Amino Acidpeptide Mixtures Obtained during Hydrolysis of Proteins. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 26(2), 279-282.

Wang, J., Quan, C., & Qi, X., (2010). Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography – mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, 396, 1773–1779.

Weber A. L., and Miller S.L., (1981). Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *Journal of Molecular Evolution*, 17(5), 273–284.

Weber, A. L., & Miller, S. L., (1981). Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *Journal of Molecular Evolution*, 17(5), 273–284.

Weil Tanja, Wu Y., Pramanik G., (2011). Protein-based Copolymers for Bioimaging and Drug Delivery Applications. *American Chemical Society*, Volume 241, pp 119.

Wilhelm G., and Kupka K.D., (1981). Identification of Amino Citric Acid in Biological Peptides. *FEBS Letters*, 123(1), 141-144.

World Health Organization, (WHO) /FAO/UNU), (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. United Nations University, WHO Expert Consultation, Technical Report Series No 935, Geneva, Switzerland, ISBN 978 92 4 120935 9.

Yan, P. S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H. and Yabe, K. (2004). Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7466-7473.

Yang, B., Huang, J., Lin, X., Zhang, Y., Tao, H., Liu. Y., (2016). A New Diketopiperazine from the Marine Sponge *Callyspongia* Species. *Records of Natural Products*, 10(1), 117-121.

Yoshimura K., Toibana A., Nakahama K., (1988). Human Lysozyme: Sequencing of a cDNA, and Expression and Secretion by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 150(2), 794–801.

Young Vernon, and Pellett Peter, (1994). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, pp 1203S-12S,

Παπαδόπουλος Γ.Κ. και Σεφεριάδης Κ.Ι., (1994). Χημεία για Βιο-Ίατρικές Επιστήμες. Τόμοι 1 και 2, Ιατρική Σχολή, 2η Έκδοση ΙΩΑΝΝΙΝΑ.

Σεφεριάδης Κ.Ι., (2003). Χημεία για Βιοϊατρικές Επιστήμες. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

R. B. Merrifield., (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, J. Am. Chem. Soc., 85 (14), pp 2149–2154

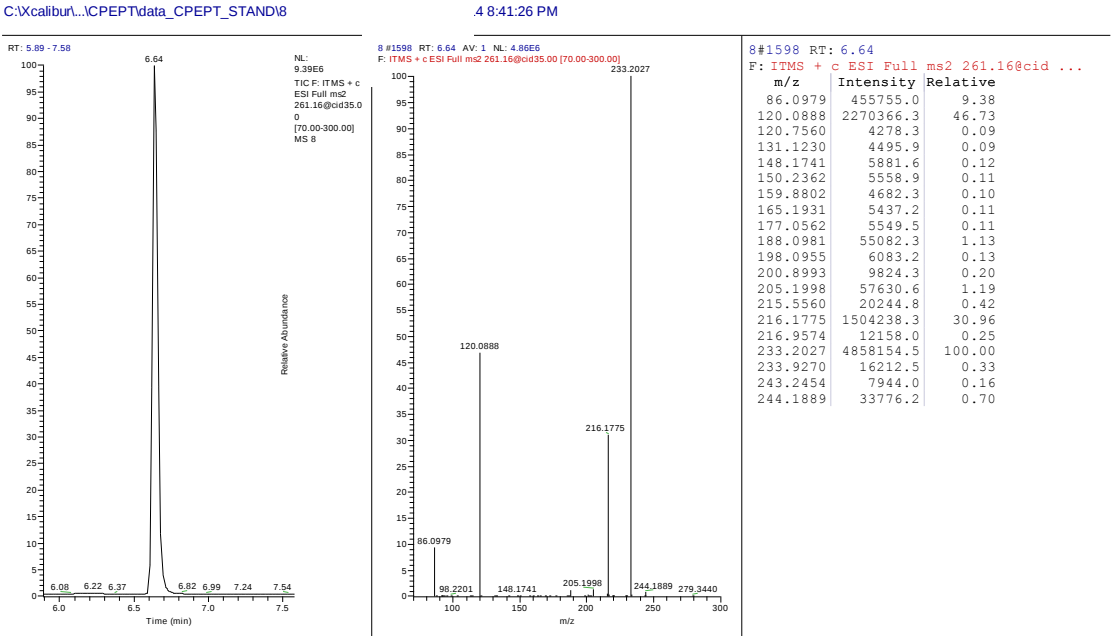
Richard Fooks., (2002). «Το βιβλίο της ηλικίας», Εκδόσεις Ψύχαλος

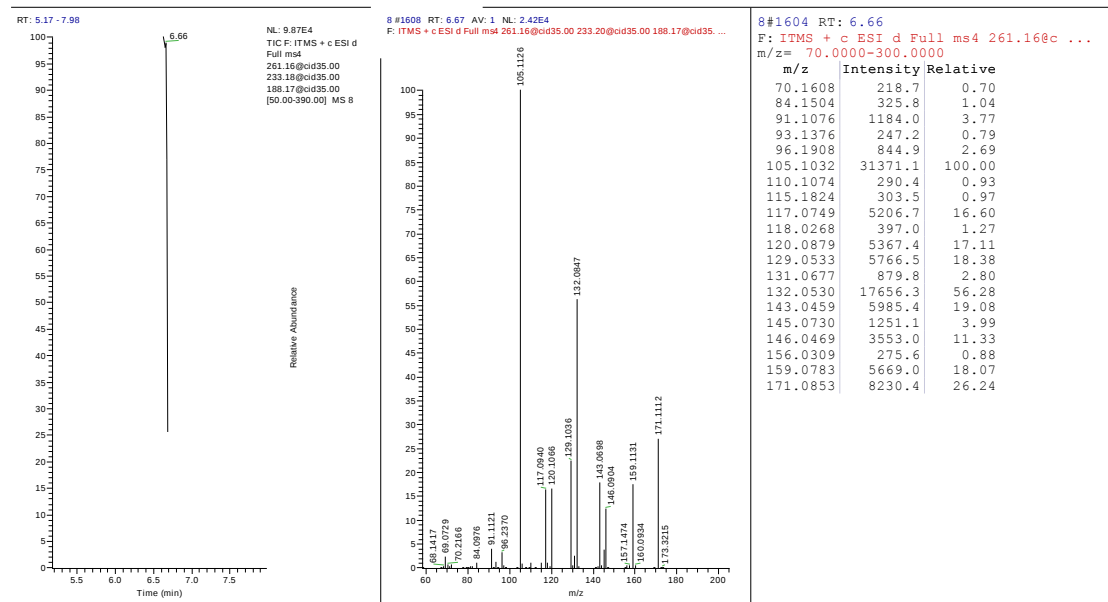
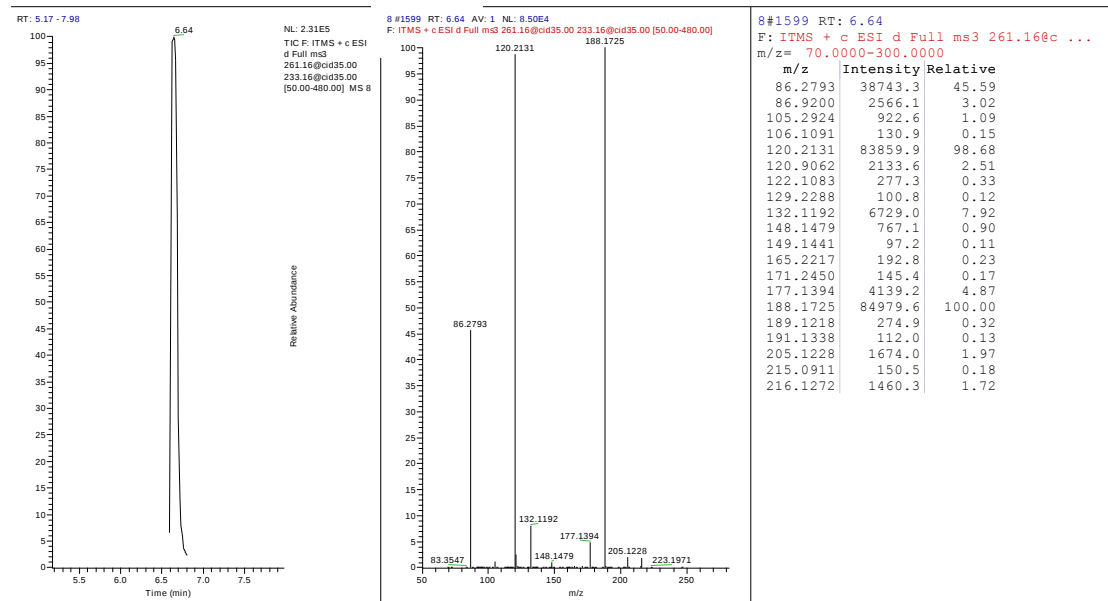
Dourtoglou, V, B Gross, V Lambropoulou, and C Zioudrou.,(1984). "O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the synthesis of peptides of Biological Interest." Synthesis,: 572-574.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠαράρτημαΙ. Χρωματογραφήματακαιφάσματαμάζαςαρωματικών 2,5
δικετοπιπεραζινών

Cyclo(Leu-Phe)

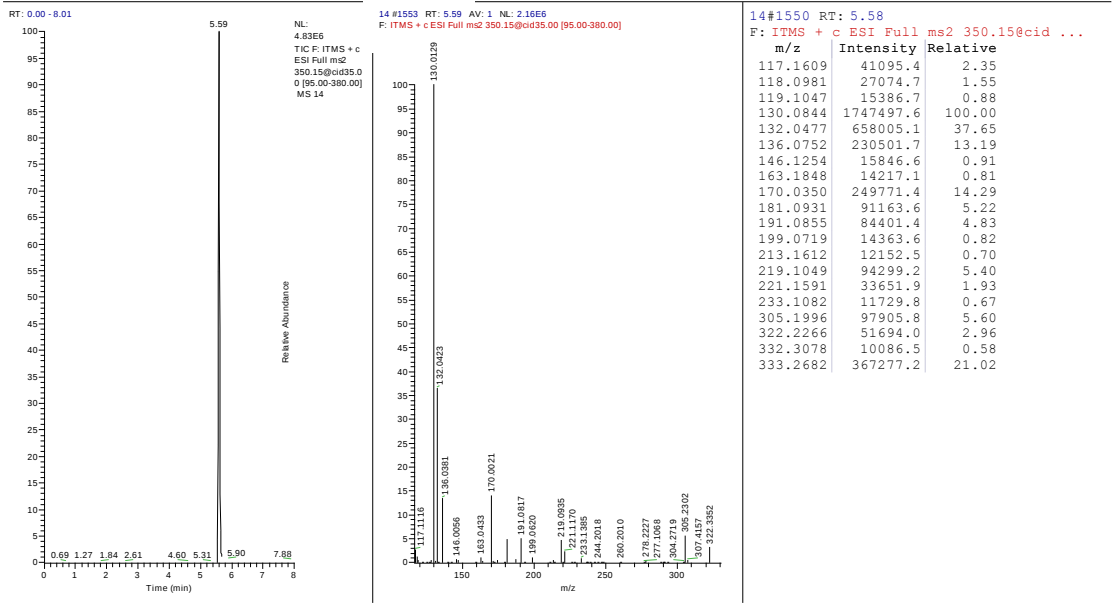




Cyclo(Trp-Tyr)

C:\Xcalibur\data_CPEPT_STAND\14

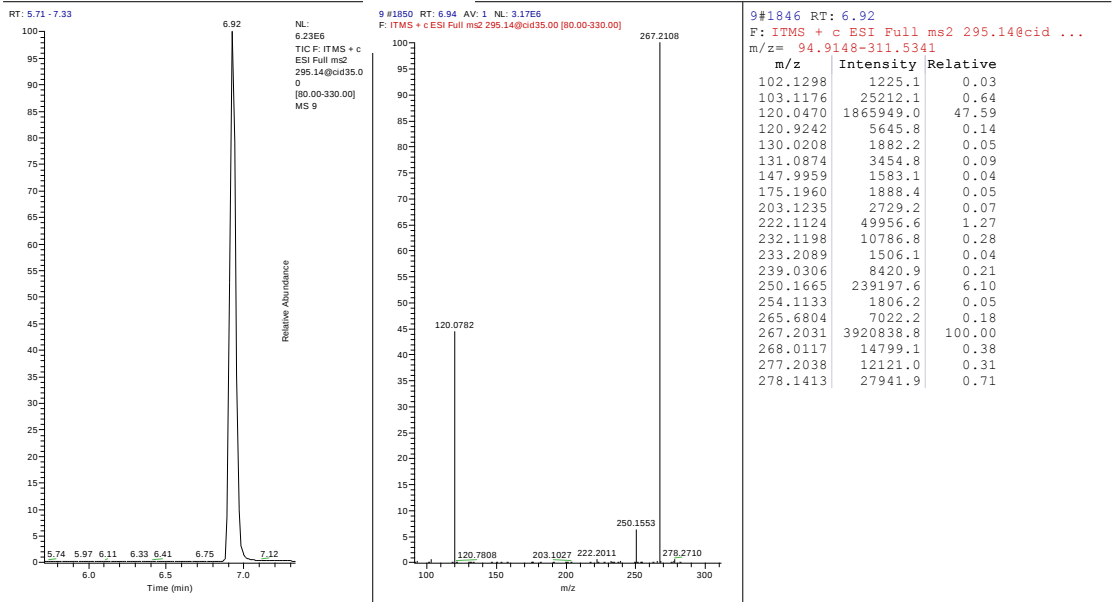
4 10:15:13 PM



Cyclo(Phe-Phe)

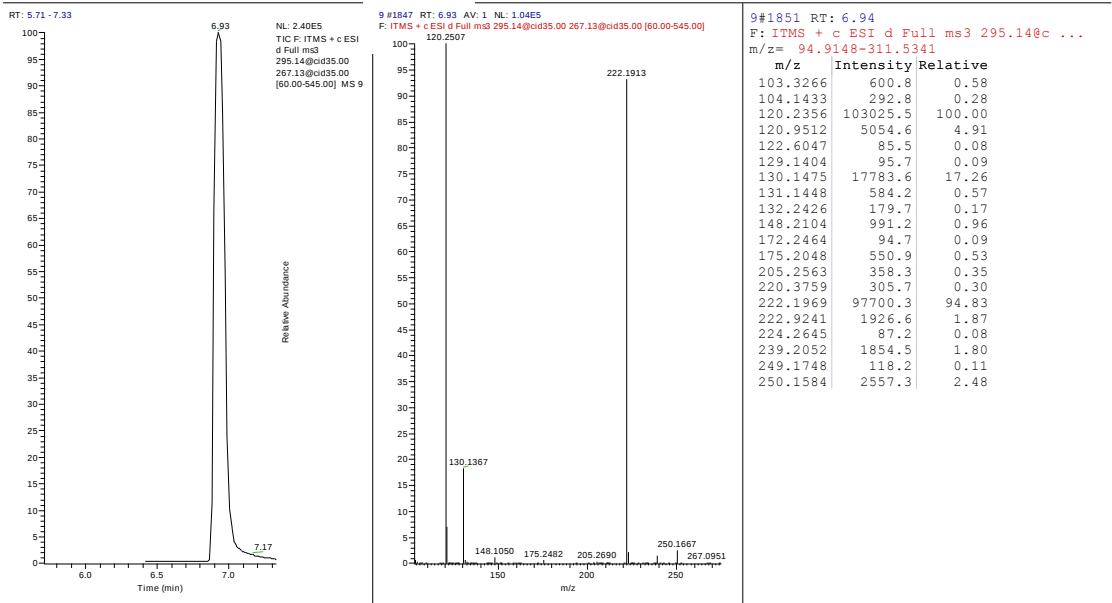
C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STANDI9

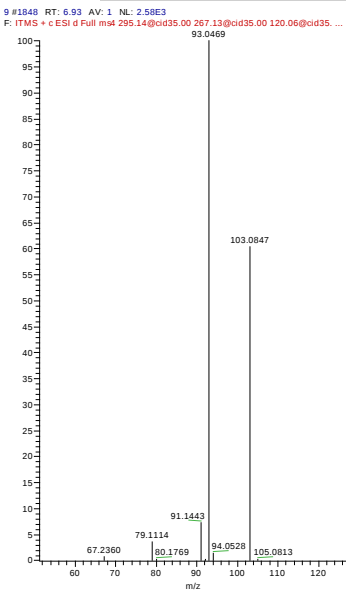
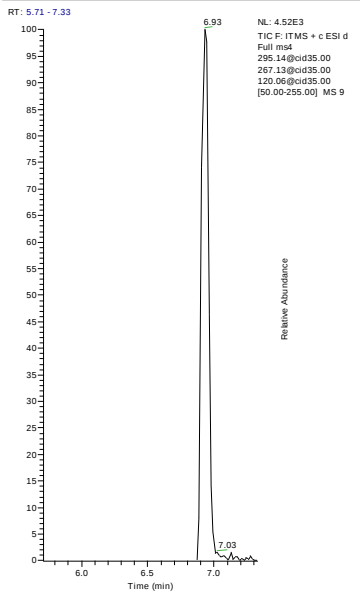
4 8:57:04 PM



C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STANDI9

4 8:57:04 PM

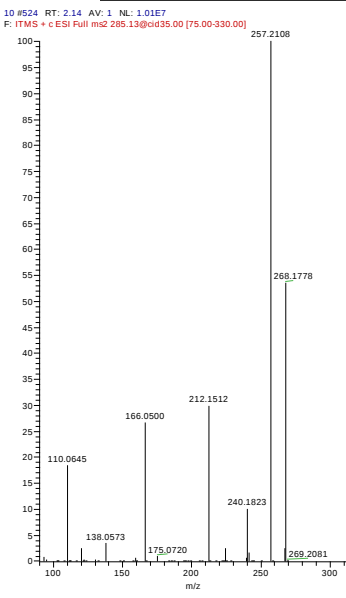
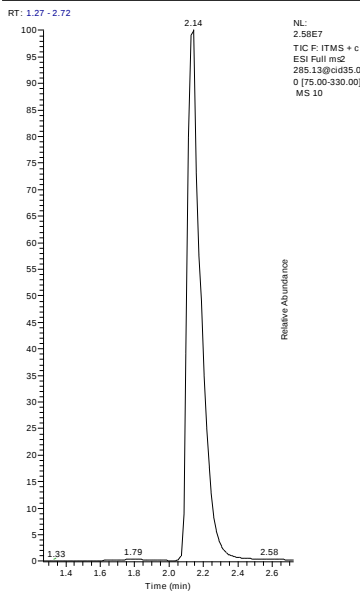




9#1848 RT: 6.93
F: ITMS + c ESI d Full ms4 295.14@cid35.00 267.13@cid35.00 120.06@cid35.00
m/z= 94.9148-311.5341

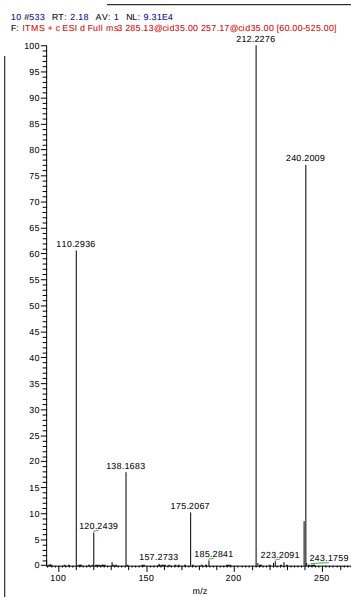
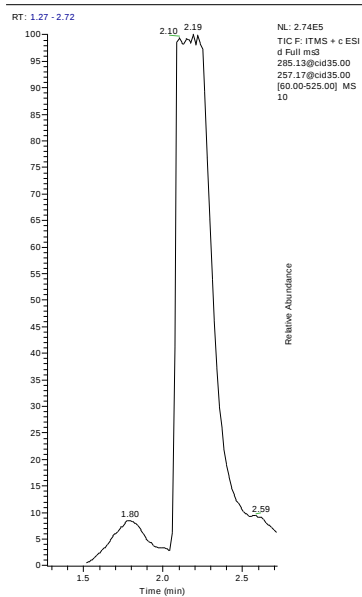
m/z	Intensity	Relative
103.0847	1561.1	100.00
105.0813	7.3	0.47
133.3239	4.2	0.27
161.0417	4.6	0.30

Cyclo(His-Phe)



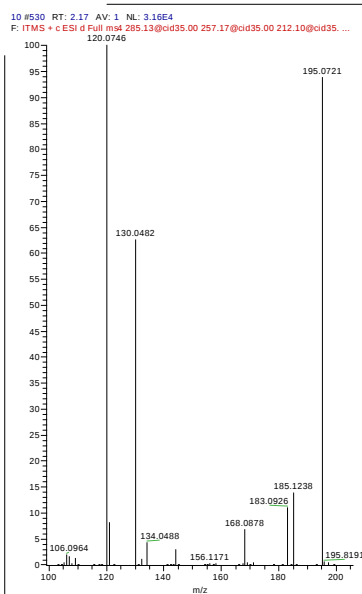
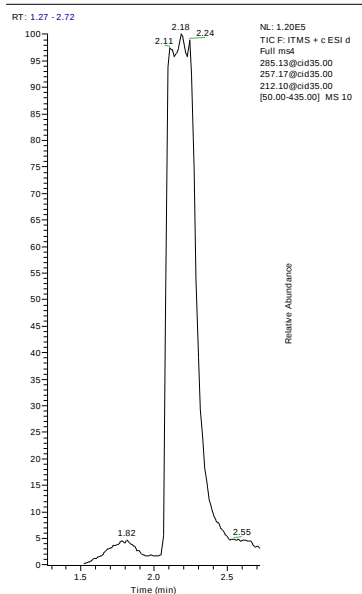
10#524 RT: 2.14
F: ITMS + c ESI Full ms2 285.13@cid35.00 [75.00-330.00]

m/z	Intensity	Relative
83.1063	52945.6	0.53
93.1390	71045.1	0.71
95.0762	17396.2	0.17
110.0645	1856054.1	18.44
111.0639	16512.7	0.16
120.0894	237551.4	2.36
122.1582	27946.6	0.28
130.1233	19300.7	0.19
138.0573	346299.6	3.44
159.1509	62224.5	0.62
166.0500	2685088.5	26.68
175.0720	97900.0	0.97
212.1512	3009938.5	29.91
224.1747	245445.1	2.44
239.2913	53865.6	0.54
240.1823	1012068.3	10.06
241.2049	156105.3	1.55
257.2108	10064673.0	100.00
267.2692	253013.7	2.51
268.1778	5388731.5	53.54



10#533 RT: 2.25
F: ITMS + c ESI d Full ms3 285.13@cid35.00 257.17@cid35.00 [60.00-525.00]
m/z = 75.0000-330.0000

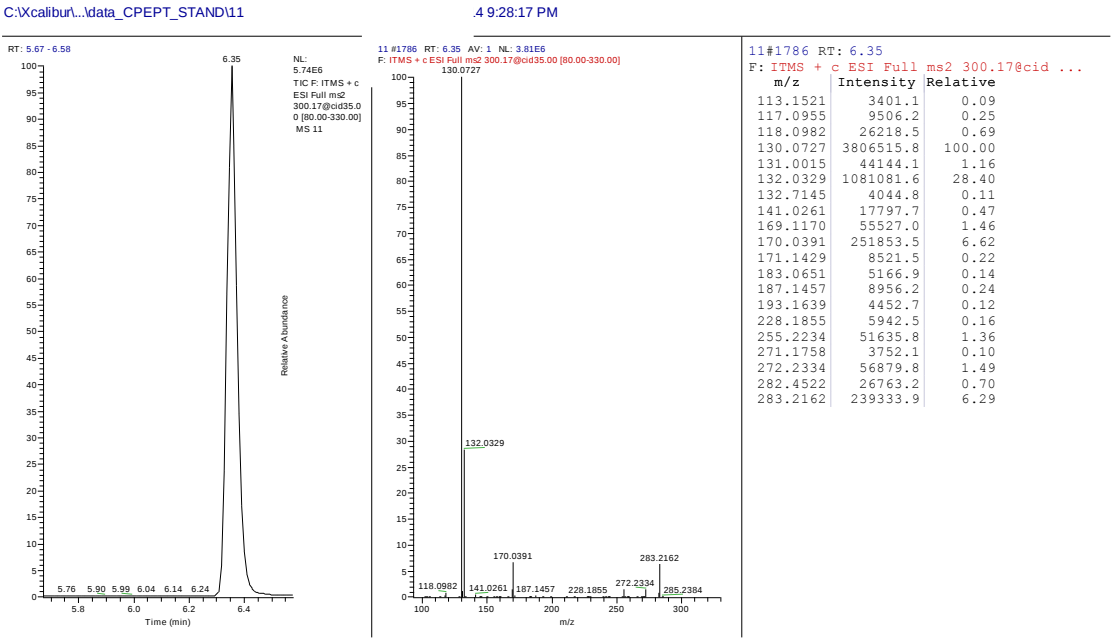
m/z	Intensity	Relative
83.2689	1484.3	1.63
93.3762	857.0	0.94
95.2512	117.3	0.13
110.2807	56670.6	62.05
120.2348	5115.1	5.60
121.0146	191.1	0.21
130.3024	571.0	0.63
138.1696	15564.4	17.04
138.9928	213.1	0.23
157.1948	223.0	0.24
175.1889	9560.5	10.47
185.3544	585.3	0.64
212.2126	91324.1	100.00
213.1699	284.9	0.31
222.2043	283.1	0.31
223.2203	700.0	0.77
228.1695	528.3	0.58
239.3858	8336.8	9.13
240.1902	71659.3	78.47
241.0835	331.2	0.36



10#530 RT: 2.17
F: ITMS + c ESI d Full ms4 285.13@cid35.00 257.17@cid35.00 212.10@cid35.00 [50.00-435.00]
m/z = 75.0000-330.0000

m/z	Intensity	Relative
81.1638	208.6	0.66
82.2539	157.7	0.50
83.1260	15109.0	47.81
95.0898	1242.1	3.93
106.0964	616.0	1.95
107.1067	497.8	1.58
109.0984	374.1	1.18
120.0746	31599.1	100.00
121.0793	2552.8	8.08
130.0482	19771.7	62.57
132.1536	370.3	1.17
134.0488	1373.3	4.35
144.0929	914.6	2.89
168.0878	2154.9	6.82
169.1351	141.2	0.45
171.1533	150.2	0.48
183.0926	3487.7	11.04
185.1238	4359.6	13.80
195.0721	29670.6	93.90
195.8191	160.7	0.51

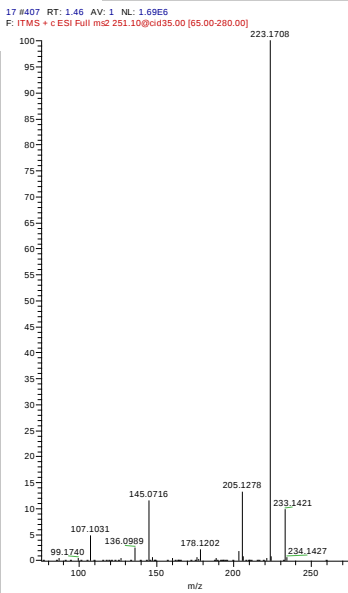
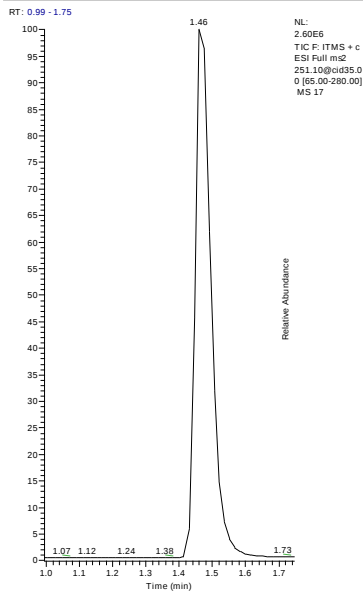
Cyclo(Leu-Trp)



Cyclo(Ser-Tyr)

C:\Xcalibur\...data_CPEPT_STAND\17

4 11:02:10 PM

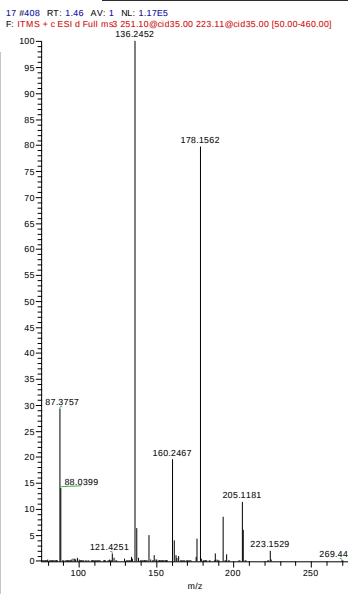
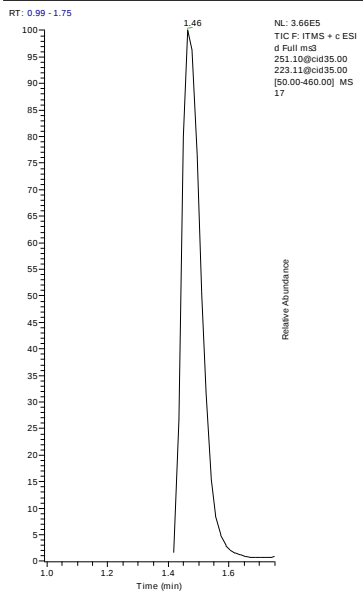


17#407 RT: 1.46
F: ITMS + c ESI Full ms2 251.10@cid ...

m/z	Intensity	Relative
87.1089	6099.4	0.36
99.1740	8047.3	0.48
107.1031	81953.5	4.84
127.0619	6855.2	0.41
136.0989	42642.1	2.52
145.0716	196147.6	11.60
147.0613	9429.1	0.56
160.1046	6997.9	0.41
176.2131	9035.2	0.53
177.3253	3204.6	0.19
178.1202	35745.6	2.11
188.1741	5815.5	0.34
203.1530	30573.1	1.81
205.1278	222146.9	13.13
206.1434	14117.7	0.83
221.2153	6525.4	0.39
223.1708	1691631.1	100.00
223.8491	12139.6	0.72
233.1421	165891.9	9.81
234.1427	11164.5	0.66

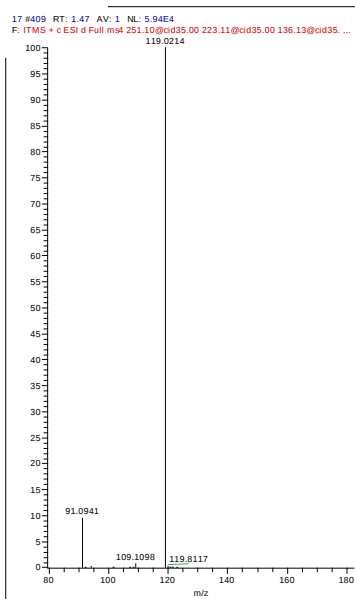
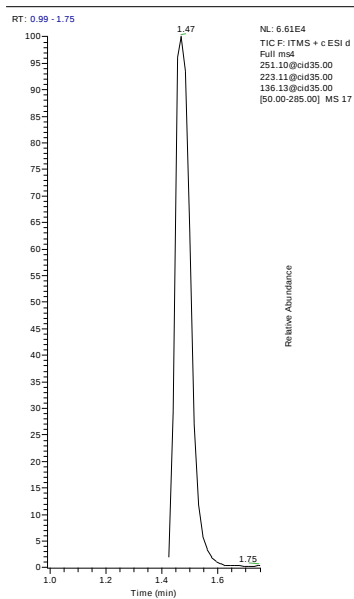
C:\Xcalibur\...data_CPEPT_STAND\17

4 11:02:10 PM



17#408 RT: 1.46
F: ITMS + c ESI d Full ms3 251.10@c ...
m/z = 65.0000-280.0000

m/z	Intensity	Relative
70.6184	5782.1	4.96
87.3757	34204.3	29.31
88.0399	16366.2	14.03
121.4251	1676.1	1.44
136.2452	116679.4	100.00
137.0477	7363.0	6.31
145.2476	5831.7	5.00
148.2634	1280.2	1.10
160.2467	22766.1	19.51
161.2052	4660.9	3.99
162.2337	1304.6	1.12
164.2207	1044.4	0.90
176.2759	5068.4	4.34
178.1562	93005.0	79.71
188.0735	1624.4	1.39
193.1215	9995.3	8.57
195.1350	1476.6	1.27
205.1181	13203.0	11.32
206.0938	7047.7	6.04
223.1529	2291.7	1.96



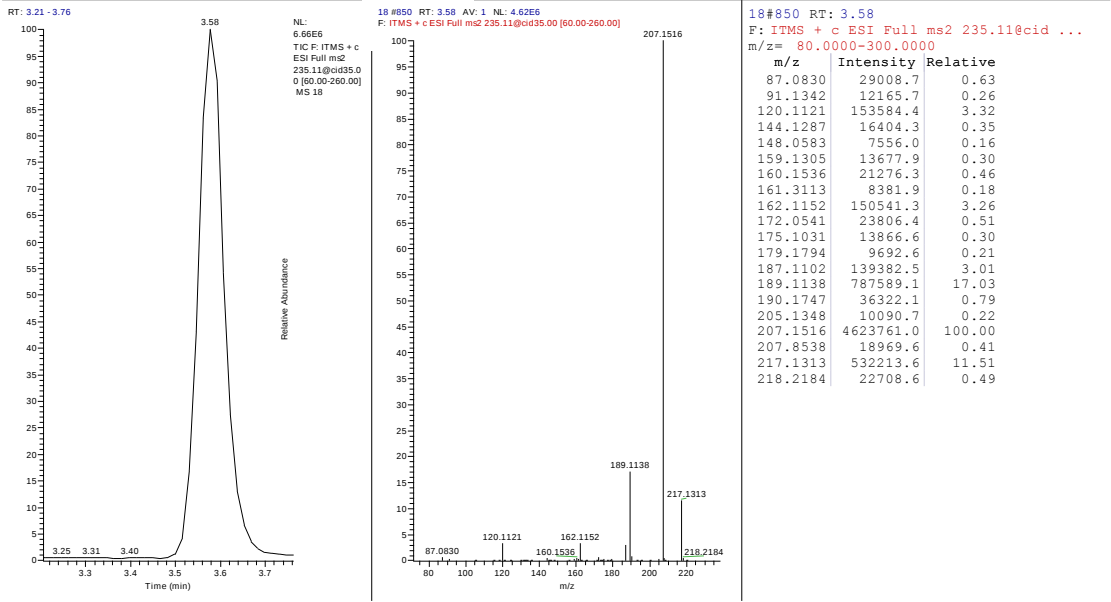
17#409 RT: 1.47
F: ITMS + c ESI d Full ms4 251.10@c ...
m/z= 65.0000-280.0000

m/z	Intensity	Relative
69.0362	3.5	0.01
91.0941	5690.6	9.58
92.0431	7.5	0.01
94.2315	119.6	0.20
101.3387	14.0	0.02
107.0587	54.3	0.09
108.1413	82.7	0.14
109.1098	464.3	0.78
119.0214	59423.4	100.00
119.8117	182.8	0.31
120.6527	7.8	0.01
121.5484	3.5	0.01
122.9987	3.9	0.01

Cyclo(Phe-Ser)

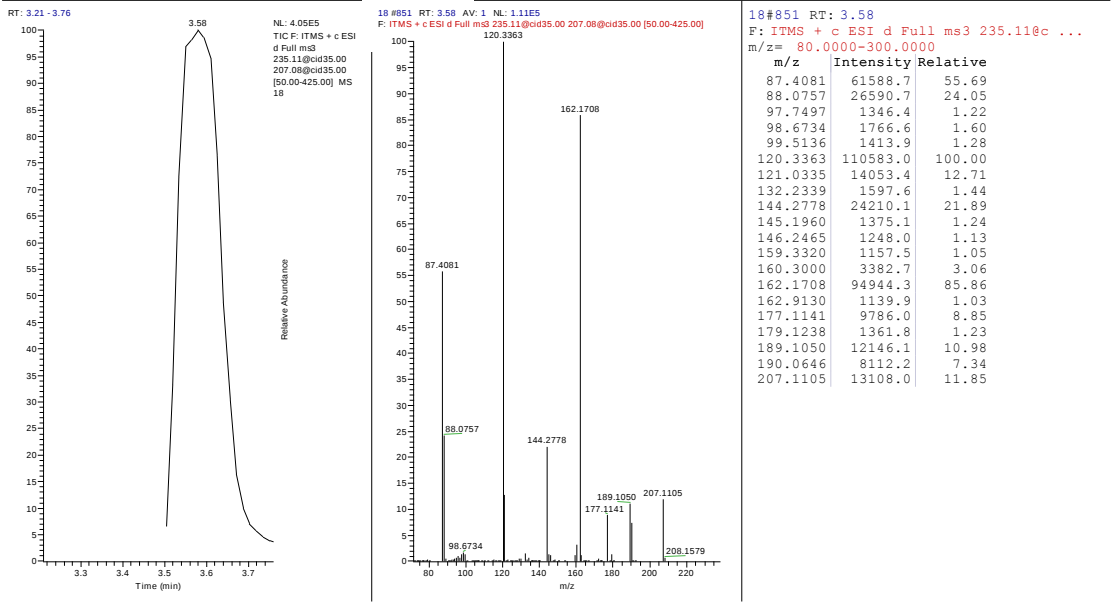
C:\Xcalibur\...data_CPEPT_STAND\18

4 11:17:47 PM



C:\Xcalibur\...data_CPEPT_STAND\18

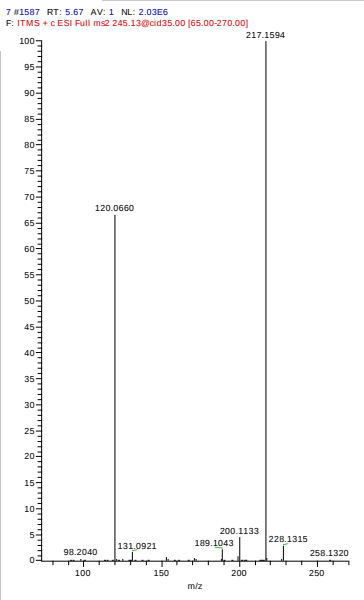
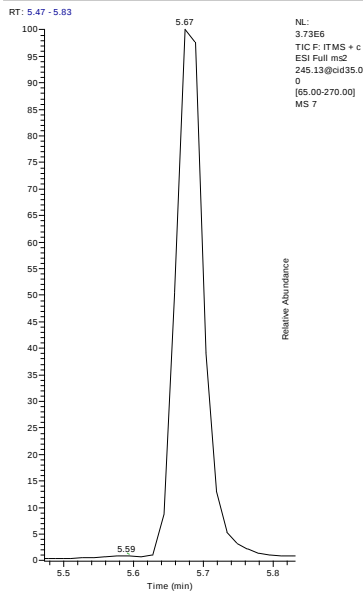
4 11:17:47 PM



Cyclo(Phe-Pro)

C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STANDI7

4 8:25:46 PM

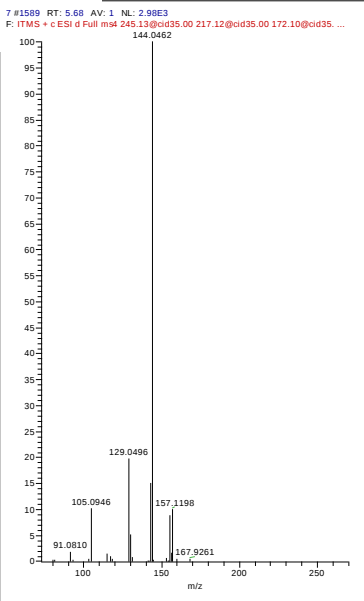
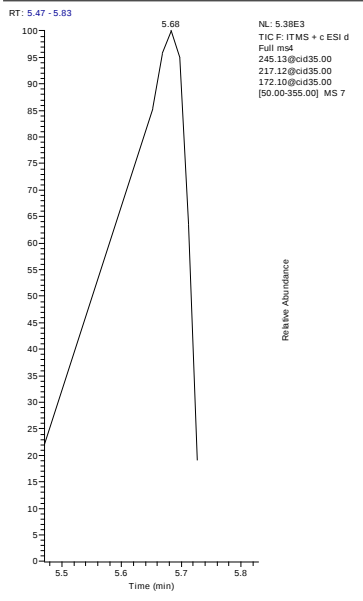


7#1591 RT: 5.69
F: ITMS + c ESI Full ms2 245.13@cid ...

m/z	Intensity	Relative
70.1475	20580.0	0.99
98.1685	3119.8	0.15
113.1291	3468.2	0.17
120.0451	1264981.6	61.12
125.1923	4598.9	0.22
131.0881	20625.3	1.00
153.0471	7914.4	0.38
154.0965	8103.8	0.39
171.1600	15205.9	0.73
172.2833	4718.9	0.23
189.1044	50879.0	2.46
200.0556	87489.4	4.23
201.2222	4201.9	0.20
203.1428	4357.0	0.21
203.8980	2300.3	0.11
215.7259	2477.4	0.12
217.1474	2069666.9	100.00
218.1241	9863.3	0.48
227.1414	5545.3	0.27
228.1323	38005.0	1.84

C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STANDI7

4 8:25:46 PM



7#1589 RT: 5.68
F: ITMS + c ESI d Full ms4 245.13@c ...
m/z = 65.0000-270.0000

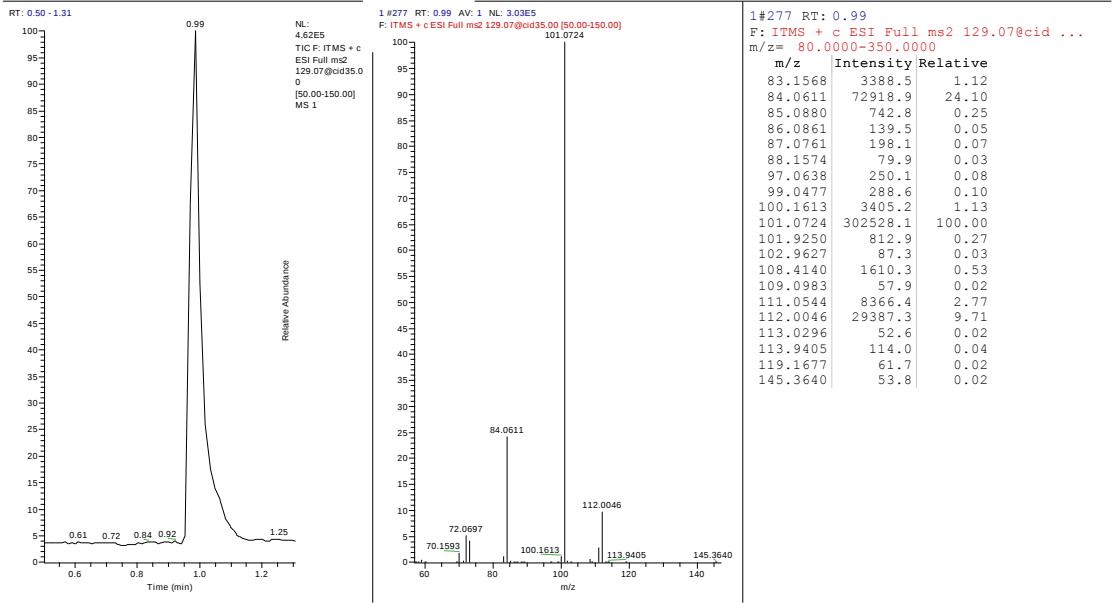
m/z	Intensity	Relative
68.0275	49.3	1.65
91.0810	52.0	1.74
93.2343	7.1	0.24
103.0389	12.4	0.42
105.0946	302.8	10.15
115.0936	41.9	1.40
117.1258	29.3	0.98
118.2361	12.7	0.43
129.0496	587.8	19.71
130.0653	151.5	5.08
131.1259	21.8	0.73
143.0296	449.5	15.07
144.0462	2982.2	100.00
144.8874	9.7	0.32
153.1531	18.7	0.63
155.0533	262.6	8.81
156.1576	47.4	1.59
157.1198	297.6	9.98
159.7061	10.6	0.36
167.9261	13.0	0.44

Παράρτημα II. Χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας αλειφατικών 2,5
δικετοπιπεραζινών

Cyclo(Ala-Gly)

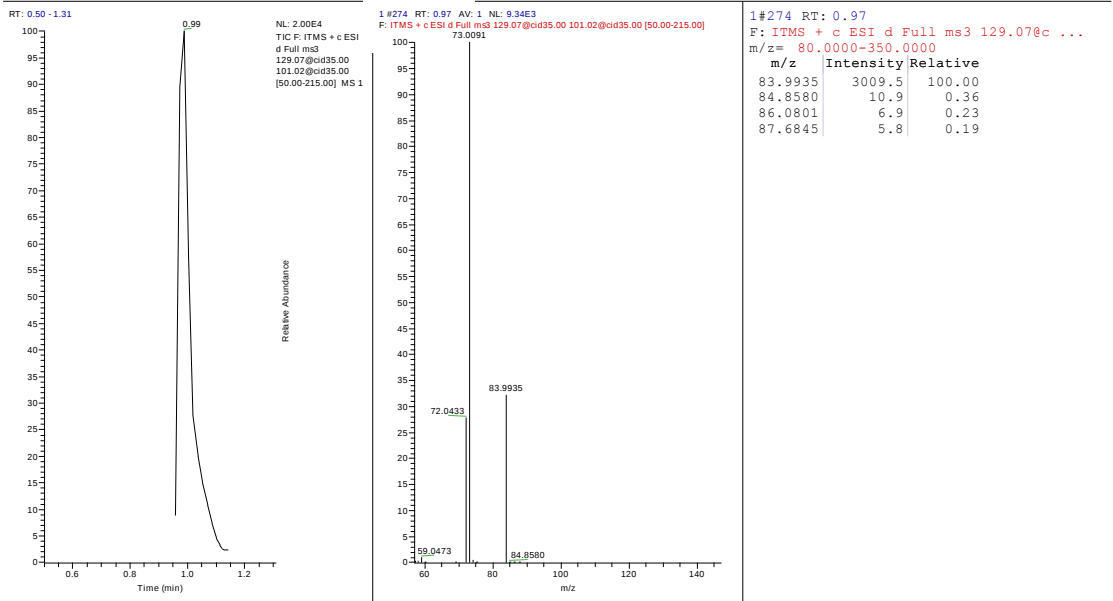
C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STAND1

4 6:46:22 PM



C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STAND1

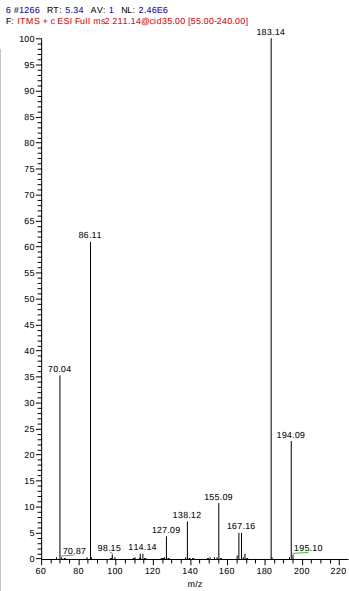
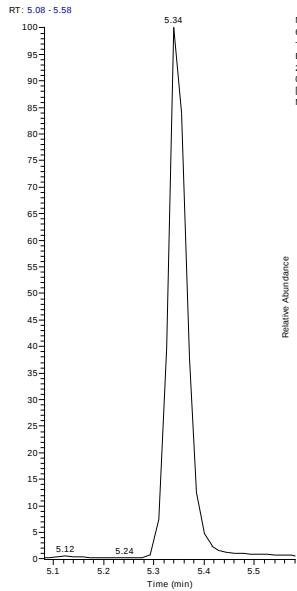
4 6:46:22 PM



Cyclo(Leu-Pro)

C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STAND16

4 8:10:07 PM

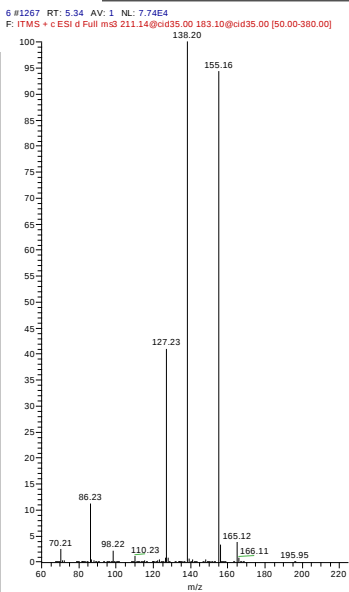
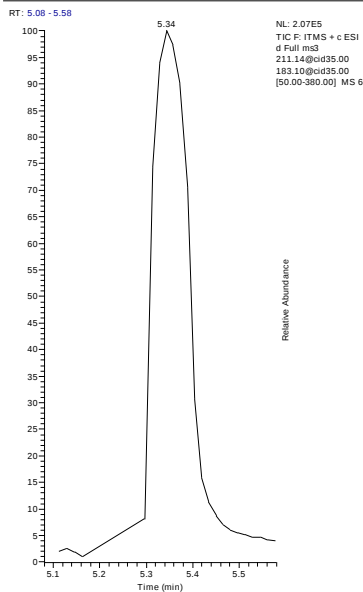


6#1266 RT: 5.34
F: ITMS + c ESI Full ms2 211.14@cid ...
m/z = 50.00-320.00

m/z	Intensity	Relative
70.04	864083.6	35.14
86.11	1498110.0	60.92
86.86	6644.7	0.27
98.15	17760.0	0.72
110.08	6348.8	0.26
113.16	22166.4	0.90
114.14	23778.4	0.97
127.09	106009.8	4.31
138.12	173645.9	7.06
153.03	5415.2	0.22
154.04	5397.4	0.22
155.09	262519.6	10.67
165.13	12848.3	0.52
166.08	121995.7	4.96
167.16	123541.8	5.02
169.22	22378.0	0.91
183.14	2459222.8	100.00
193.16	7996.1	0.33
194.09	556899.2	22.65
195.10	18264.6	0.74

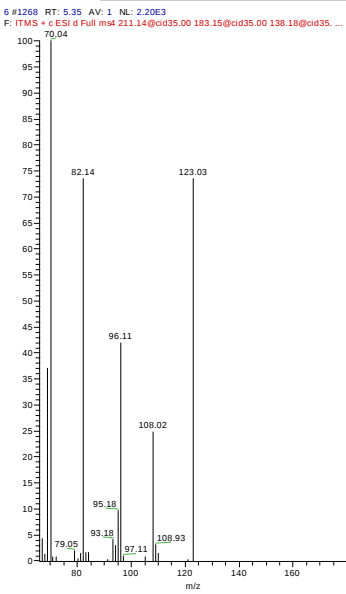
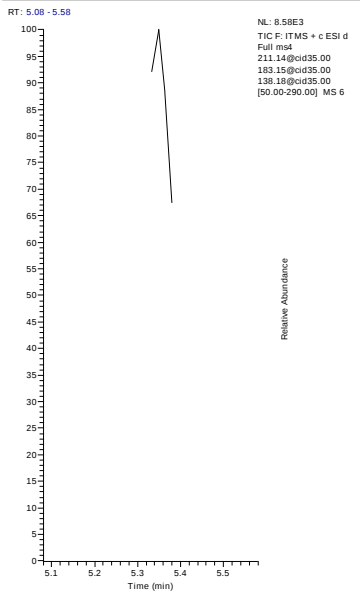
C:\Xcalibur\...ICEPT\data_CPEPT_STAND16

4 8:10:07 PM



6#1267 RT: 5.34
F: ITMS + c ESI d Full ms3 211.14@c ...
m/z = 50.00-320.00

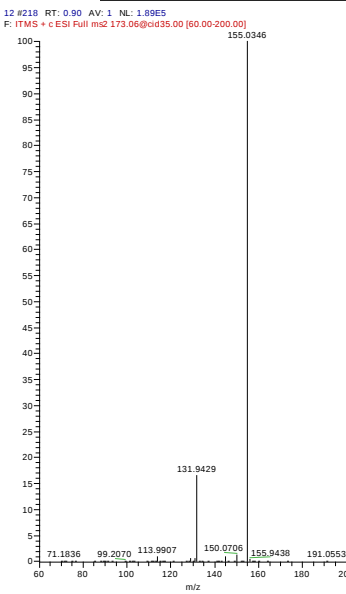
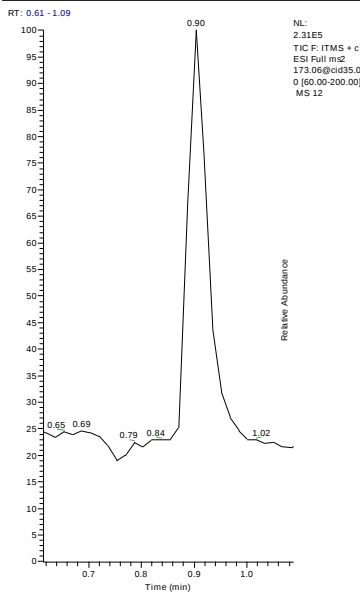
m/z	Intensity	Relative
70.21	1913.7	2.47
71.20	138.1	0.18
86.23	8632.1	11.16
86.85	296.3	0.38
88.21	234.3	0.30
98.22	1642.3	2.12
110.23	849.6	1.10
115.24	222.1	0.29
123.28	366.8	0.47
126.57	601.4	0.78
127.23	31677.3	40.94
127.97	546.6	0.71
138.20	77371.8	100.00
139.02	426.1	0.55
141.12	389.7	0.50
148.12	340.8	0.44
155.16	72984.5	94.33
156.07	2543.7	3.29
165.12	2932.0	3.79
166.11	572.8	0.74



6#1268 RT: 5.35
F: ITMS + c ESI d Full ms4 211.14@cid35.00 183.15@cid35.00 138.18@cid35.00
m/z = 50.00-320.00

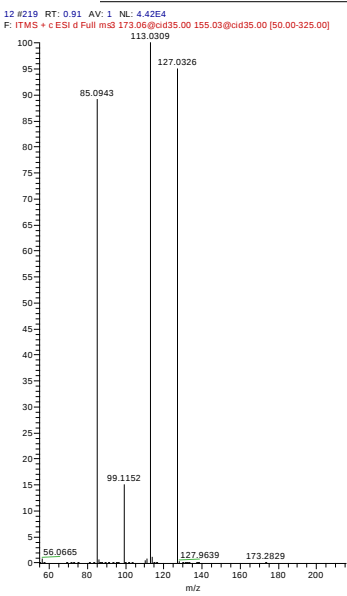
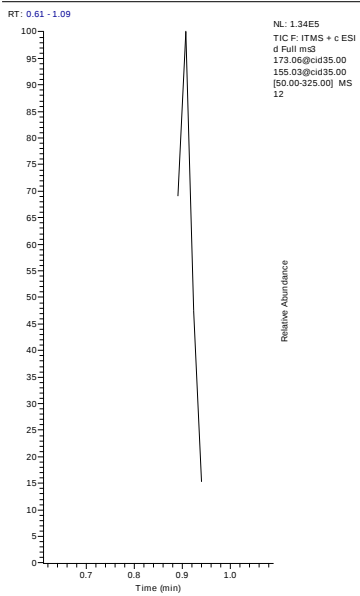
m/z	Intensity	Relative
55.09	23.7	1.08
67.08	93.2	4.24
68.08	29.1	1.32
69.04	815.5	37.09
70.04	2198.5	100.00
79.05	44.2	2.01
81.12	31.2	1.42
82.14	1618.1	73.60
83.09	34.5	1.57
84.19	34.1	1.55
93.18	92.1	4.19
94.07	63.4	2.88
95.18	212.9	9.69
96.11	923.6	42.01
97.11	20.7	0.94
105.02	17.8	0.81
108.02	545.8	24.83
108.93	66.6	3.03
110.15	30.9	1.40
123.03	1618.0	73.59

Cyclo(Asp-Gly)



12#218 RT: 0.90
F: ITMS + c ESI Full ms2 173.06@cid35.00 [60.00-200.00]
m/z = 80.0000-210.0000

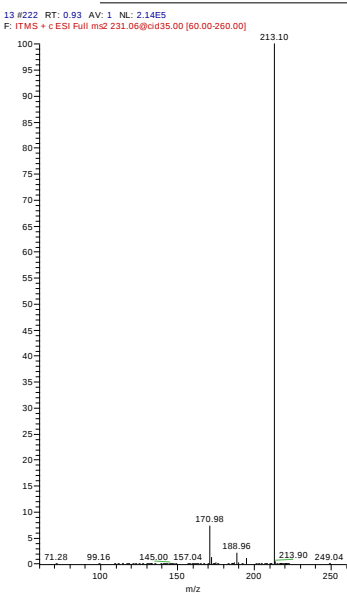
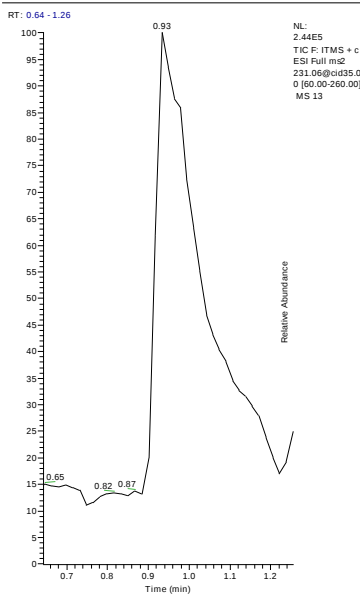
m/z	Intensity	Relative
99.2070	214.7	0.11
111.2050	175.5	0.09
113.9907	1639.3	0.87
115.0364	108.9	0.06
117.1468	108.0	0.06
128.2399	105.5	0.06
129.0536	1228.6	0.65
130.0188	119.7	0.06
131.0649	1083.8	0.57
131.9429	3111.4	16.49
141.0708	316.4	0.17
145.0537	1624.3	0.86
145.9543	89.8	0.05
150.0706	2334.3	1.24
152.0071	96.7	0.05
155.0346	188655.9	100.00
155.9438	805.5	0.43
157.1388	127.2	0.07
158.0278	122.5	0.06
191.0553	158.1	0.08



12#219 RT: 0.91
F: ITMS + c ESI d Full ms3 173.06@cid ...
m/z = 80.0000-210.0000

m/z	Intensity	Relative
83.2099	20.0	0.05
85.0943	39427.2	89.11
85.7865	227.1	0.51
91.0491	9.6	0.02
95.1146	9.6	0.02
99.1152	6619.9	14.96
99.9330	14.8	0.03
101.4034	14.5	0.03
103.1609	12.2	0.03
110.0497	155.8	0.35
111.1154	323.1	0.73
113.0309	44246.8	100.00
113.9347	519.7	1.17
115.0369	54.0	0.12
116.1861	8.2	0.02
127.0326	42051.4	95.04
127.9639	110.8	0.25
131.9965	29.1	0.07
137.1099	43.8	0.10
173.2829	11.3	0.03

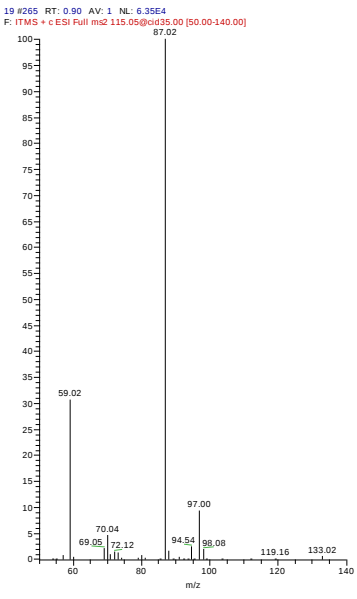
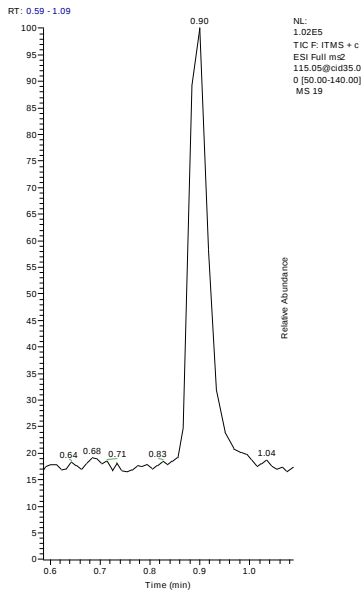
Cyclo(Asp-Asp)



13#222 RT: 0.93
F: ITMS + c ESI Full ms2 231.06@cid ...
m/z = 80.00-300.00

m/z	Intensity	Relative
99.16	129.2	0.06
145.00	152.3	0.07
157.04	176.1	0.08
159.48	113.0	0.05
170.98	15643.0	7.32
171.98	2621.3	1.23
173.12	329.3	0.15
175.12	420.7	0.20
185.12	213.6	0.10
187.08	364.5	0.17
188.96	4445.0	2.08
189.98	538.0	0.25
195.10	2163.3	1.01
201.44	158.2	0.07
202.94	125.1	0.06
211.13	102.2	0.05
213.10	213783.1	100.00
213.90	752.3	0.35
214.86	199.4	0.09
216.29	199.1	0.09

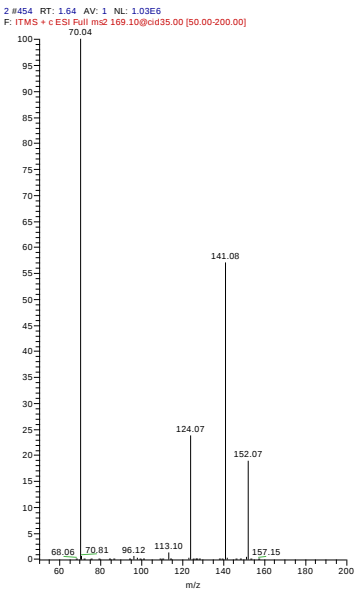
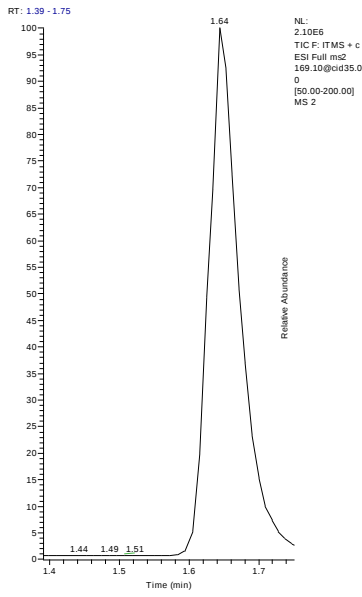
Cyclo(Gly-Gly)



19#288 RT: 0.99
F: ITMS + c ESI Full ms2 115.05@cid ...
m/z = 50.00-200.00

m/z	Intensity	Relative
59.11	552.3	7.74
69.05	940.2	13.17
70.00	695.5	9.74
70.95	735.9	10.31
72.13	260.0	3.64
73.06	644.1	9.02
74.01	164.9	2.31
80.14	430.7	6.03
85.19	153.4	2.15
86.11	263.2	3.69
87.04	7137.9	100.00
88.18	271.6	3.81
91.01	576.6	8.08
94.35	1168.5	16.37
96.39	156.3	2.19
97.07	4287.8	60.07
98.03	562.0	7.87
103.56	229.5	3.21
105.96	108.3	1.52
132.94	204.3	2.86

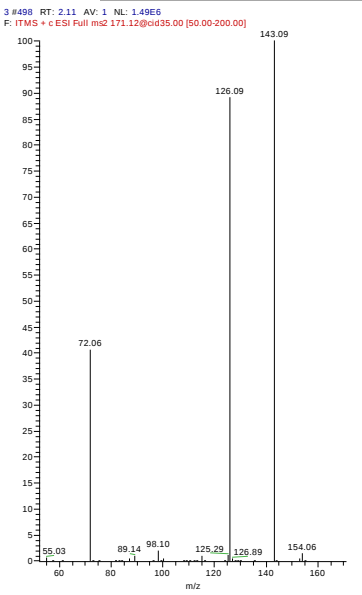
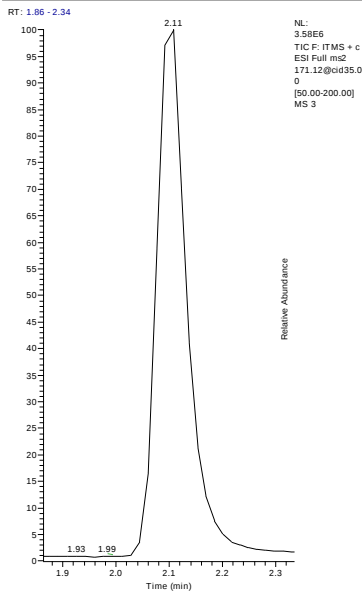
Cyclo(Ala-Pro)



2#454 RT: 1.64
F: ITMS + c ESI Full ms2 169.10@cid ...
m/z= 60.00-200.00

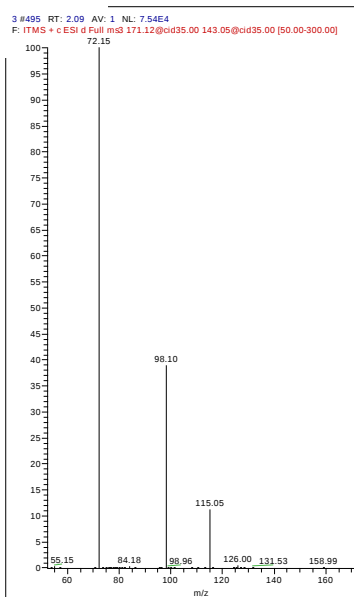
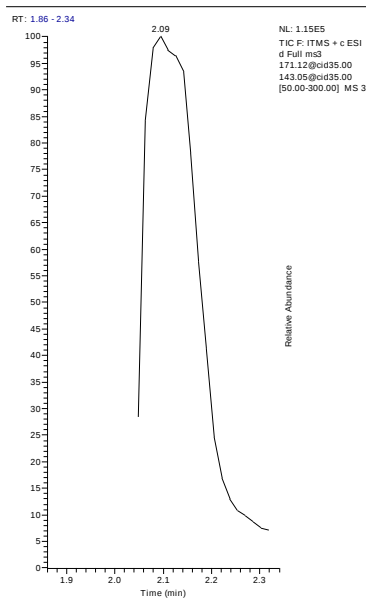
m/z	Intensity	Relative
70.04	1027019.3	100.00
70.81	6280.8	0.61
86.24	631.9	0.06
96.12	6719.7	0.65
98.06	2571.2	0.25
109.13	602.9	0.06
110.10	593.4	0.06
113.10	12507.3	1.22
123.19	2511.4	0.24
124.07	244703.6	23.83
125.25	1194.3	0.12
126.29	1474.6	0.14
126.98	1642.6	0.16
128.01	1722.4	0.17
139.16	653.9	0.06
141.08	585231.2	56.98
141.82	1755.4	0.17
151.10	4385.2	0.43
152.07	193677.7	18.86
157.15	628.6	0.06

Cyclo(Ala-Val)



3#498 RT: 2.11
F: ITMS + c ESI Full ms2 171.12@cid ...

m/z	Intensity	Relative
55.03	8617.6	0.58
72.06	606640.1	40.67
72.89	1261.4	0.08
83.14	1752.7	0.12
87.17	7061.4	0.47
89.14	14992.2	1.01
98.10	28309.9	1.90
100.14	6454.4	0.43
110.29	2203.3	0.15
115.14	14358.1	0.96
116.21	1361.0	0.09
125.29	16401.0	1.10
126.09	1330430.5	89.20
126.89	5593.2	0.37
129.07	1479.1	0.10
130.05	1746.5	0.12
143.09	1491553.0	100.00
143.85	2212.3	0.15
153.07	5305.4	0.36
154.06	20693.9	1.39



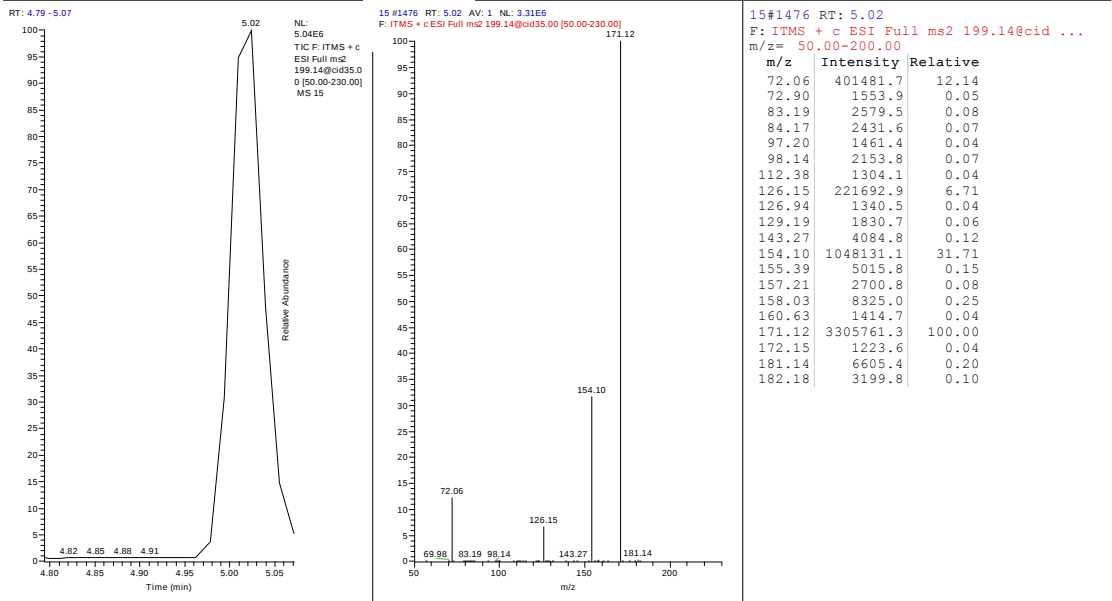
3#495 RT: 2.09
F: ITMS + c ESI d Full ms3 171.12@cid35.00 143.05@cid35.00 [50.00-300.00]
m/z = 50.00-200.00

m/z	Intensity	Relative
55.15	226.6	0.30
72.15	75379.9	100.00
73.65	120.3	0.16
74.79	20.5	0.03
75.96	23.8	0.03
76.73	25.5	0.03
77.58	27.2	0.04
79.10	34.0	0.05
79.91	46.0	0.06
81.02	90.6	0.12
81.86	51.6	0.07
84.18	183.5	0.24
98.10	29267.6	38.83
98.96	85.3	0.11
100.04	68.9	0.09
101.20	21.3	0.03
115.05	8464.5	11.23
125.18	54.0	0.07
126.00	366.3	0.49
128.20	26.6	0.04

Cyclo(Val-Val)

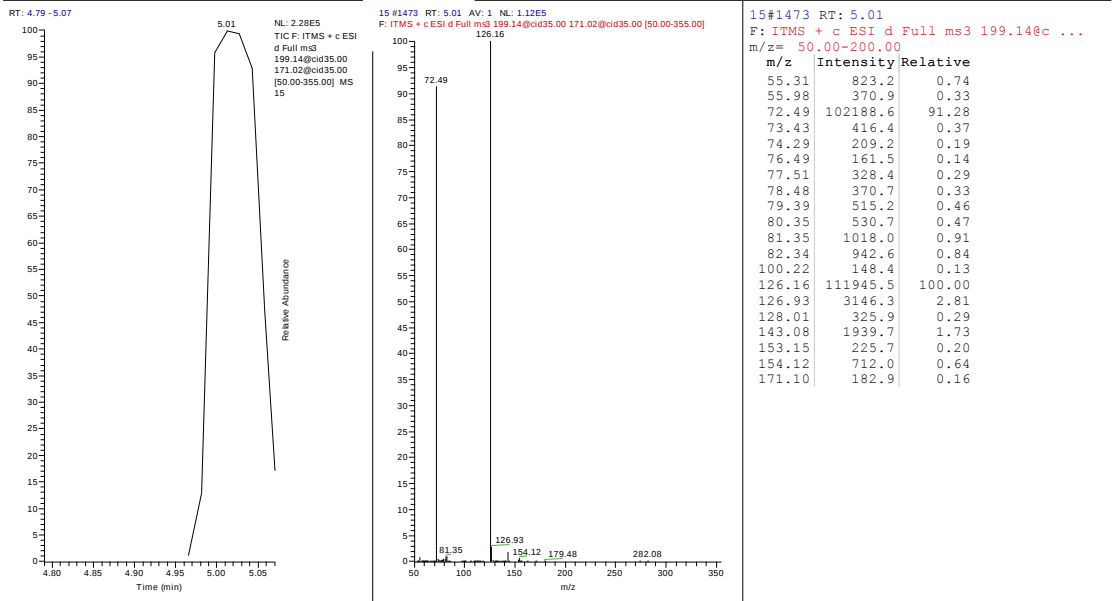
C:\Xcalibur\data_CPEPT_STAND\15

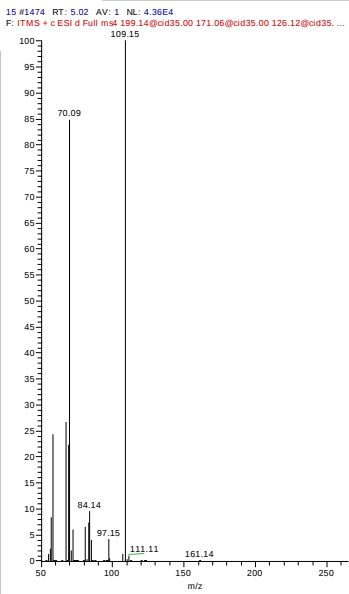
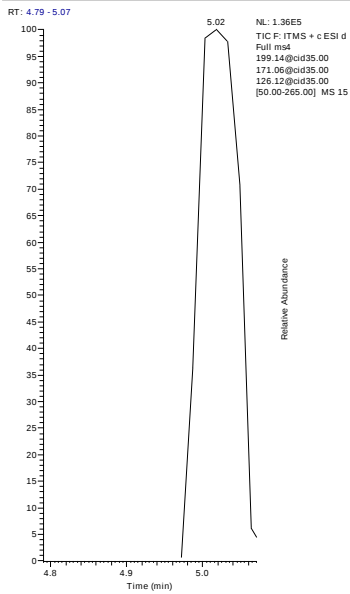
.4 10:30:52 PM



C:\Xcalibur\data_CPEPT_STAND\15

.4 10:30:52 PM

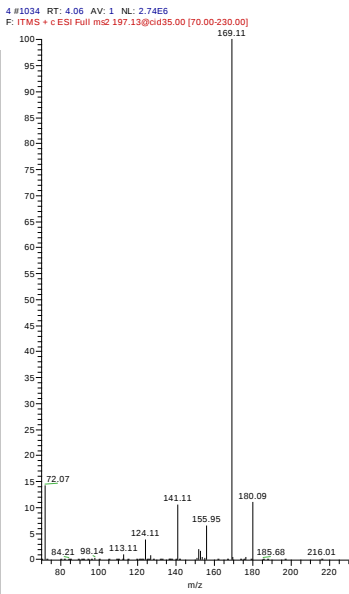
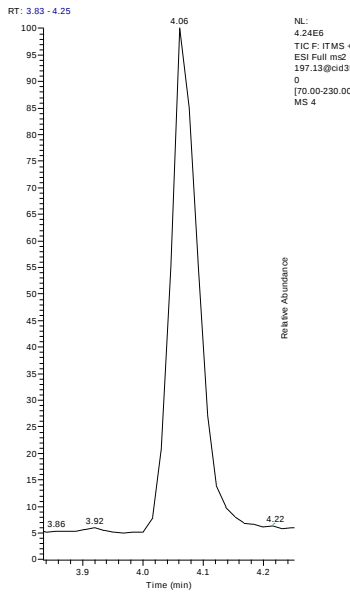




15#1474 RT: 5.02
F: ITMS + c ESI d Full ms4 199.14@cid35.00 171.06@cid35.00 126.12@cid35.00
m/z = 50.00-200.00

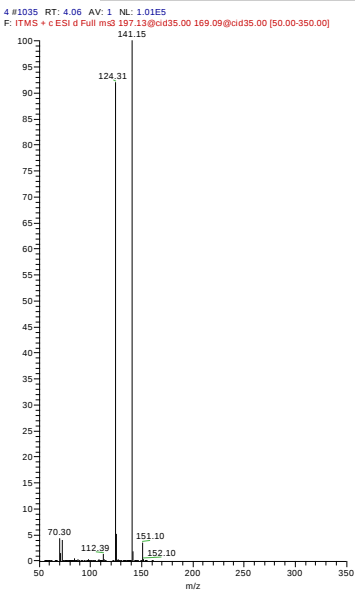
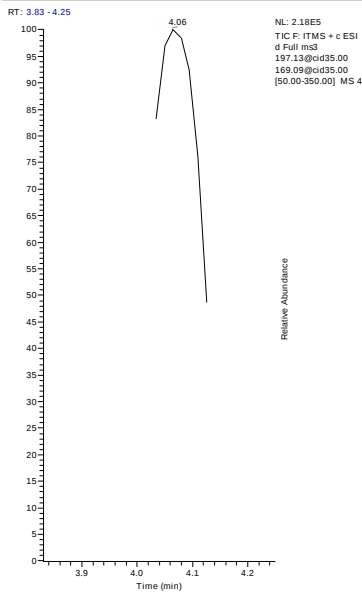
m/z	Intensity	Relative
55.11	538.9	1.24
56.13	983.2	2.26
57.13	3639.9	8.35
58.13	10581.8	24.29
67.13	11618.3	26.67
69.17	9699.3	22.26
70.09	36916.8	84.73
71.03	828.0	1.90
72.10	2570.1	5.90
81.12	2839.0	6.52
82.12	82.0	0.19
83.11	3162.2	7.26
84.14	4120.7	9.46
85.14	1725.9	3.96
97.15	1774.5	4.07
98.18	172.4	0.40
107.23	518.8	1.19
109.15	43569.0	100.00
109.94	137.8	0.32
111.11	425.4	0.98

Cyclo(Pro-Val)



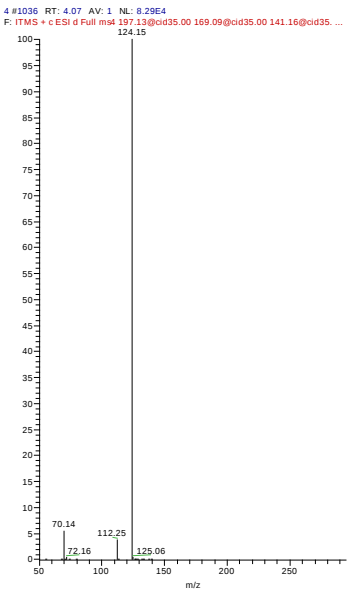
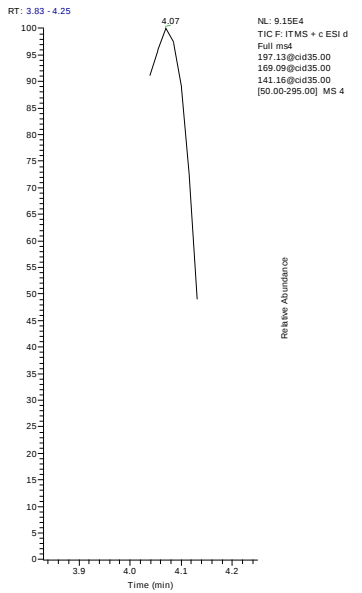
4#1034 RT: 4.06
F: ITMS + c ESI Full ms2 197.13@cid35.00 171.06@cid35.00 126.12@cid35.00
m/z = 50.00-200.00

m/z	Intensity	Relative
72.07	387673.3	14.14
98.14	8988.8	0.33
100.17	3001.7	0.11
113.11	24259.4	0.88
124.11	105883.3	3.86
127.16	18611.6	0.68
140.04	2999.2	0.11
141.11	286082.1	10.43
151.16	5019.2	0.18
152.07	54173.1	1.98
153.18	43843.0	1.60
154.07	10163.3	0.37
155.11	8943.7	0.33
155.95	175427.6	6.40
169.11	2742203.5	100.00
169.90	11547.4	0.42
175.69	2528.1	0.09
176.56	9588.3	0.35
179.14	4358.4	0.16
180.09	300900.6	10.97



4#1035 RT: 4.06
F: ITMS + c ESI d Full ms3 197.13@cid35.00 169.09@cid35.00 [50.00-350.00]
m/z = 50.00-200.00

m/z	Intensity	Relative
55.30	151.4	0.15
70.30	4336.1	4.31
70.94	1416.1	1.41
72.49	3966.7	3.94
84.31	366.6	0.36
85.11	122.2	0.12
88.33	226.3	0.23
89.00	93.9	0.09
98.44	308.4	0.31
108.38	182.9	0.18
109.37	118.1	0.12
112.39	1296.4	1.29
113.21	303.5	0.30
124.31	92486.6	91.98
125.02	5197.1	5.17
127.24	202.3	0.20
141.15	100553.3	100.00
141.96	1852.9	1.84
151.10	3405.5	3.39
152.10	273.0	0.27



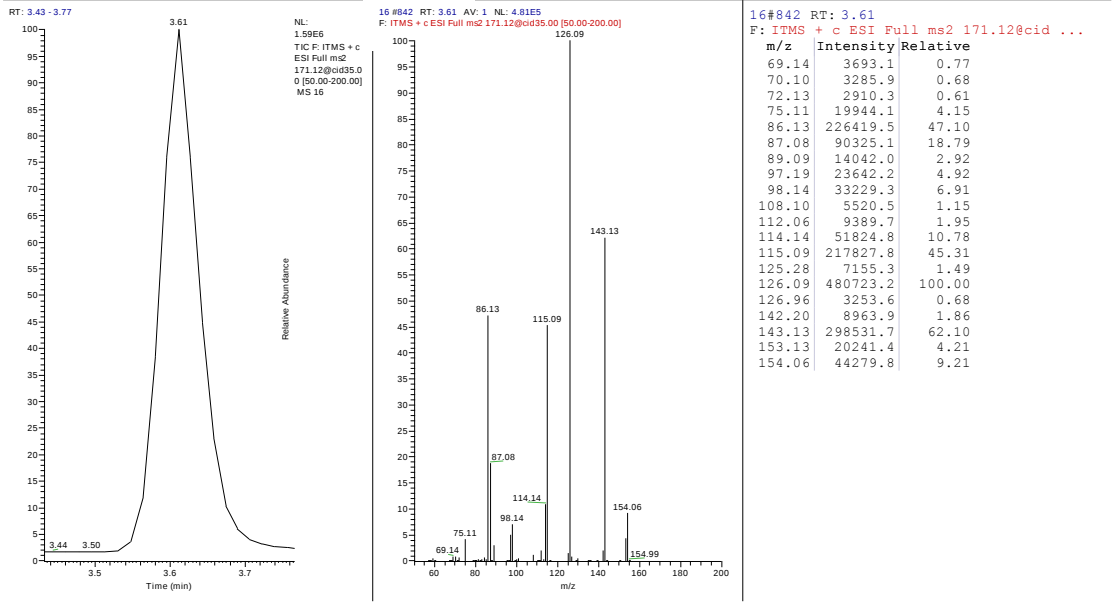
4#1036 RT: 4.07
F: ITMS + c ESI d Full ms4 197.13@cid35.00 169.09@cid35.00 141.16@cid35.00 [50.00-350.00]
m/z = 50.00-200.00

m/z	Intensity	Relative
55.11	14.5	0.02
68.09	11.5	0.01
70.14	4574.2	5.52
70.80	113.7	0.14
72.16	333.2	0.40
74.27	10.8	0.01
79.89	2.1	0.00
112.25	3181.0	3.84
113.08	20.9	0.03
124.15	82883.0	100.00
125.06	308.2	0.37
126.10	36.1	0.04
126.81	20.3	0.02
128.11	14.2	0.02
132.08	7.1	0.01
132.88	2.2	0.00
137.59	7.3	0.01
139.37	6.7	0.01

Cyclo(Gly-Leu)

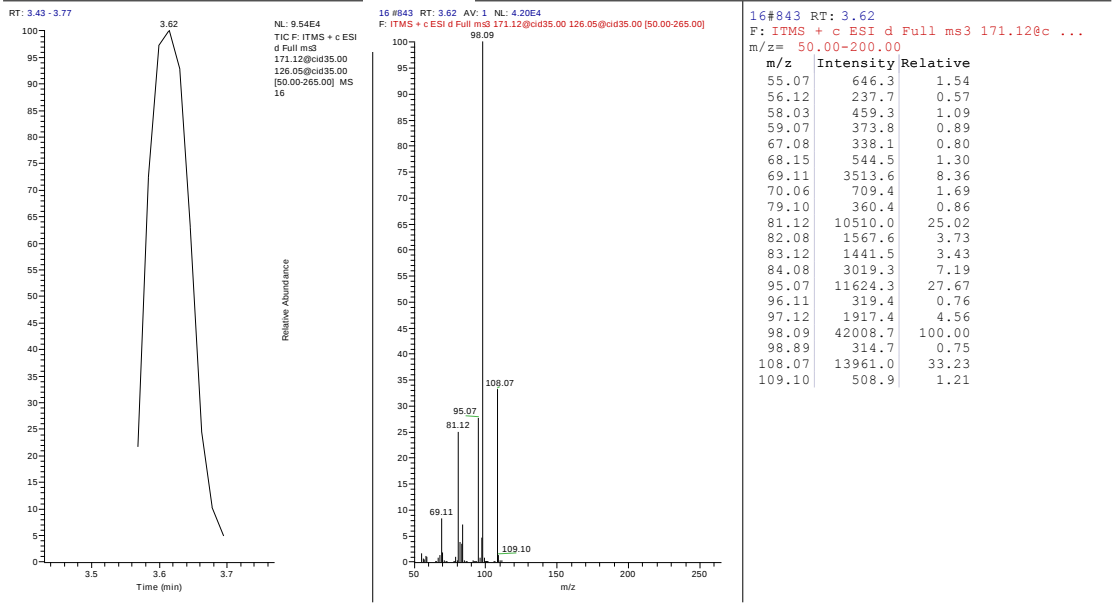
C:\Xcalibur\data_CPEPT_STAND\16

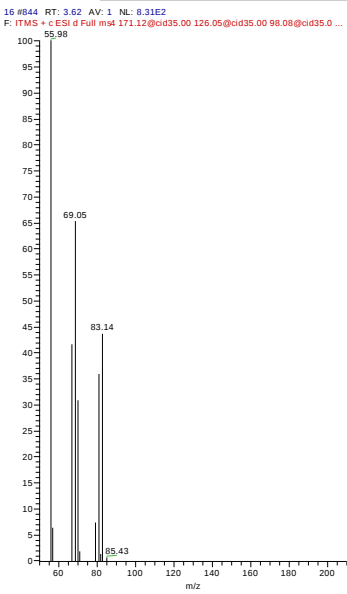
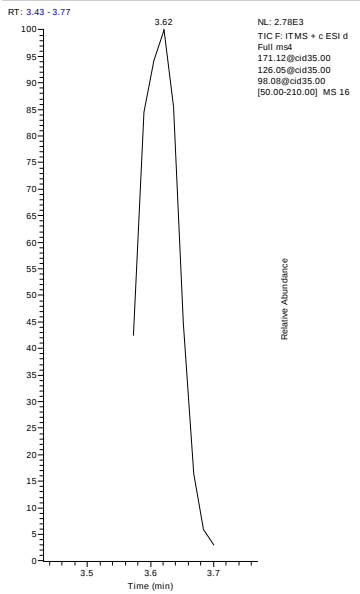
4 10:46:30 PM



C:\Xcalibur\data_CPEPT_STAND\16

4 10:46:30 PM

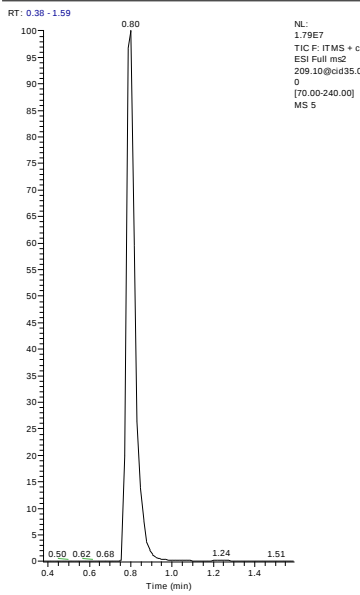




16#844 RT: 3.62
F: ITMS + c ESI d Full ms4 171.12@cid35.00 126.05@cid35.00 98.08@cid35.00 ...

m/z	Intensity	Relative
55.98	830.9	100.00
57.17	51.7	6.22
67.14	345.6	41.59
69.05	543.2	65.38
70.17	256.4	30.86
71.28	15.2	1.83
79.18	60.5	7.28
81.07	297.9	35.85
82.06	10.1	1.22
83.14	363.0	43.68
85.43	4.5	0.54

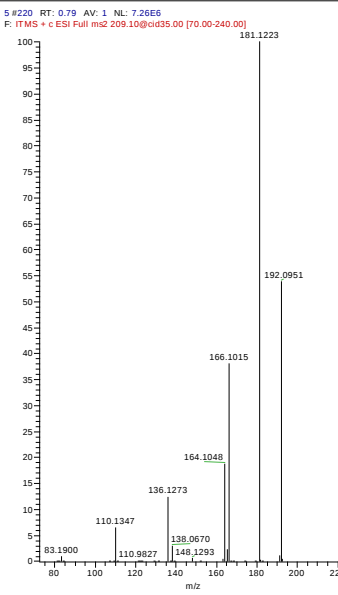
Cyclo(Ala-His)

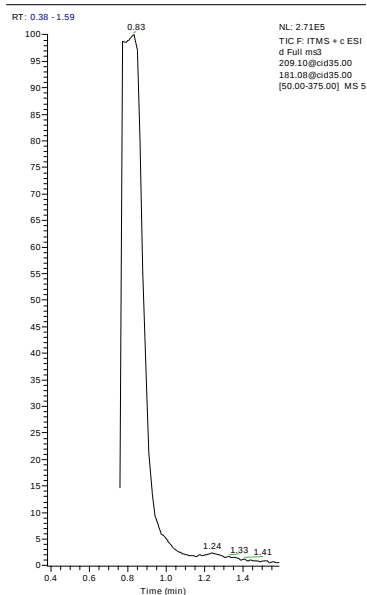


5#220-224 RT: 0.79-0.80 AV: 2
F: ITMS + c ESI Full ms2 209.10@cid35.00 ...

m/z = 50.0000-395.0000

m/z	Intensity	Relative
83.0706	33806.9	0.91
83.1900	34273.3	0.92
110.0842	256941.7	6.92
110.1347	232536.9	6.26
136.0672	447090.7	12.03
136.1273	447424.2	12.04
138.0374	126233.3	3.40
138.0670	104644.8	2.82
164.0602	733919.8	19.75
164.1048	679036.6	18.27
165.0968	110576.5	2.98
165.1765	84676.1	2.28
166.0396	1384186.4	37.25
166.1015	1380145.0	37.14
181.0961	3715707.0	100.00
181.1223	3630906.3	97.72
191.0572	42584.0	1.15
191.1562	45941.7	1.24
192.0390	2024227.9	54.48
192.0951	1955198.3	52.62



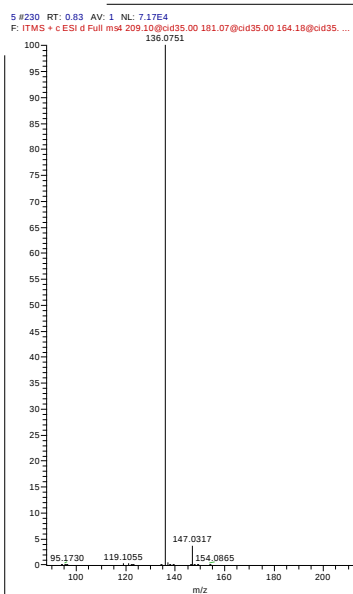
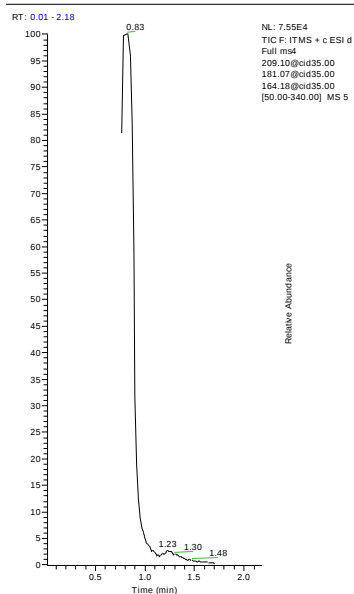
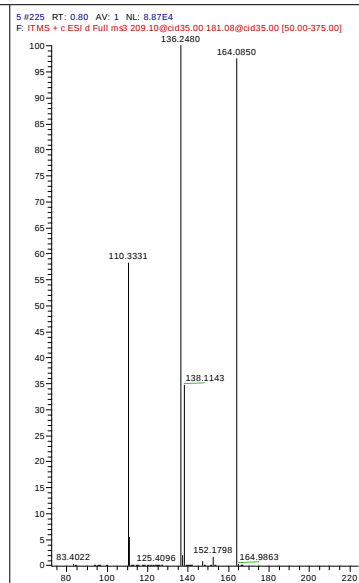


5#225 RT: 0.80

F: ITMS + c ESI d Full ms3 209.10@c ...

m/z = 50.0000-395.0000

m/z	Intensity	Relative
83.4022	273.4	0.31
84.0907	70.2	0.08
99.7030	54.6	0.06
110.3331	51632.0	58.19
111.0262	4870.8	5.49
111.9483	44.7	0.05
112.6742	49.6	0.06
119.9177	45.4	0.05
122.3988	49.5	0.06
125.4096	54.3	0.06
136.2480	88732.2	100.00
137.2315	1684.1	1.90
138.1143	30779.5	34.69
138.9900	82.9	0.09
147.1471	655.3	0.74
152.1798	1376.8	1.55
153.2323	125.4	0.14
164.0850	86632.7	97.63
164.9863	276.8	0.31
166.0095	51.6	0.06



5#218-230 RT: 0.78-0.83 AV: 2

F: ITMS + c ESI d Full ms4 209.10@c ...

m/z = 87.7328-212.0776

m/z	Intensity	Relative
95.1346	39.5	0.11
95.1730	34.5	0.10
96.0706	10.7	0.03
119.1055	112.1	0.31
119.1734	141.3	0.39
121.1735	98.7	0.28
121.2098	78.9	0.22
134.1295	10.3	0.03
134.3557	9.8	0.03
136.0751	35874.2	100.00
136.0887	35723.3	99.58
136.9027	144.4	0.40
136.9385	165.8	0.46
137.7885	12.9	0.04
137.8313	9.5	0.03
146.0736	43.7	0.12
146.1425	80.0	0.22
147.0317	1278.9	3.56
147.1109	1318.2	3.67
154.0865	6.2	0.02

**Παράρτημα III. Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διατριβή σε επίσημα
περιοδικά αναγνωρισμένου κύρους με κριτές**

1. Dourtoglou, E. G., Marinea, M., Filandra, K., Bratakos, S., Dourtoglou, V.G., (2012). Diketopiperazines in wine. Bull. l'OIV Izmir, Turkey, 85, 459–468.
2. Bratakos, S.M., Sinanoglou, V.J., Siapi, E., Matsoukas, M.T., Papahatjis, D.P., Riganakos, K., and Zoumpoulakis, P. (2016). Fragmentation patterns of aromatic 2,5-diketopiperazines using liquid chromatography/mass spectrometry. Current Analytical Chemistry, 12(5), 439-449.
3. Bratakos, S.M., Zoumpoulakis, P., Siapi, D.P., Riganakos, K., and Sinanoglou, V.J. (2016). Determination of 2,5-diketopiperazines in Greek Processed Olives by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. Current Research in Nutrition and Food Science, 4(SI. 2), 63-76.

**Παράρτημα IV. Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διατριβή σε πρακτικά
Διεθνών Συνεδρίων αναγνωρισμένου κύρους με κριτές**

1. Sotirios M. Bratakos, Vassilia J. Sinanoglou, Vassilis Dourtoglou and Kyriakos Riganakos (2013). 2,5-Diketopiperazine identification based on gas chromatography–mass spectrometry analysis. «4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας & Τεχνολογίας Τροφίμων», MEC Παιανίας, 11 - 13 Οκτωβρίου 2013. CD of abstracts.
2. Sotirios M. Bratakos, Vassilia J. Sinanoglou*, Eleni Siapi, Kyriakos Riganakos and Panagiotis Zoumpoulakis (2014). 2,5-Diketopiperazine identification based on liquid chromatography–mass spectrometry analysis. “9th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2014)” (29th Sept. – 3rd Oct. 2014, Chios. Greece).
3. S. Bratakos, E. Siapi, P. Zoumpoulakis*, K. Riganakos, V. Dourtoglou, V.J. Sinanoglou* (2015). Determination of 2,5-diketopiperazines in Greek processed olives. Preconference workshop on food technology 2015 Conference. Innovation and Safety of Foods and Beverages. Congress Center of Technological Educational Institute of Athens, 2-3 June 2015.
4. Sotirios Bratakos, Vassilia J. Sinanoglou*, Eleni Siapi, Kyriakos Riganakos, Panagiotis Zoumpoulakis* (2016). “2,5-Diketopiperazines in Greek Processed Olives”. 1st International Multidisciplinary Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, July 7-9, 2016, Kalamata, Greece.



2,5-Diketopiperazine identification based on gas chromatography–mass spectrometry analysis

Sotirios M. Bratakos^{1*}, Vassilia J. Sinanoglou¹, Vassilis Dourtoglou² and Kyriakos Riganakos³

¹Instrumental Food Analysis Laboratory, Department of Food Technology, Technological Educational Institution of Athens, e-mail: sbrat@teiath.gr, vsina@teiath.gr

²Department of Oenology and Beverage Technology, Technological Educational Institution of Athens, Ag. Spyridonos 12210 Egaleo, Greece.

³Food Chemistry and Technology Laboratory, Department of Chemistry, University of Ioannina, Greece.

Abstract

2,5-diketopiperazines (DKPs) are formed through nonenzymatic dehydration and condensation of two N-terminal amino acid residues of linear peptides or proteins during storage (fermented foods) and through food sterilization (cooked foods). DKPs are present in various foods (cocoa nibs, roasted coffee, roasted malt, dried squid, chicken essence) and create a metallic bitter taste. DKPs exhibit various biological activities, including antiviral, antibacterial, antifungal, anthelmintic and anticancer activities [1]. A modified GC–MS method was applied for chemical characterization of 2,5-diketopiperazines (cyclic dipeptides) standards. These compounds were identified on the basis of their GC retention times and their mass spectra characteristic fragments (m/z). These cyclic dipeptides were cyclo(Ala-Gly), cyclo-D-(Ala-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Pro-Val), cyclo(Ala-His), cyclo(Leu-Pro), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Leu-Phe) and cyclo(Phe-Phe). GC/MS analysis was performed on a Shimadzu gas chromatograph equipped with an automated liquid sampler, split/splitless injector and an Shimadzu quadrupole mass selective detector. Mass spectra were acquired on DB-5ms (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm; Agilent), using helium as the carrier gas. Electron ionization (E.I.) was produced by accelerating electrons from a hot filament through a potential difference, usually of 70 eV.

Introduction

Diketopiperazines (DKPs) have been detected in a variety of natural products, especially in thermally treated or fermented foods and beverages [2]. These molecules are cyclodipeptides, which found previously in a variety of processed and non processed food. They formed from unprotected linear dipeptides under basic conditions especially if the necessary head-to-tail folding not prevented by steric constraints. Cyclic dipeptides are more than usual curiosities. They are essential compounds, therefore, are among the most common peptide derivatives found in nature (Prasad, 1995). Once formed these cyclic dipeptides act as relatively stable molecules. For that reason, many of 2,5-diketopiperazines provide excellent models for theoretical studies as well as the development of pharmaceutical compounds.

Materials and Methods

1. Extraction

The extraction from sourdough and bread was performed according to Ryan et al., (2009) [3], with the following modifications. Food samples (20 g) were spiked with 50 µg of cyclo(Ala-Gly) (previously dissolved in 100 in water) and allowed to equilibrate for 1 h. The mixture was defatted with n-hexane (4x30 mL) at room temperature for 30 min. After centrifugation, the residual material was extracted 4 times with acetone/water (70/30, v/v; 50 mL each) for 45 min at room temperature, while stirring. The samples were centrifuged and the combined supernatants were dried under reduced pressure at 30 °C, to remove acetone. The aqueous solution obtained, after filtration, was extracted 3 times with 30 mL of dichloromethane. The dichloromethane phases were then dried under reduced pressure to constant weight to determine the extractables content. The residue was then dissolved in DMSO and analyzed with GC-MS.

2. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of diketopiperazines

Quantitative and qualitative analysis, was performed on a mass spectrometer QP2010 Series (Shimadzu USA MANUFACTURING, Inc., Kyoto, Japan). Electron ionization (E.I.) was produced by accelerating electrons from a hot filament through a potential difference, usually of 70 eV (Murphy, 1991). The diketopiperazines were identified by comparison with the above mentioned standard mixture of diketopiperazines purchased from Bachem. A non polar column was used (DB-5 MS, 30 m, 0.25 mm i.d. and 0.25 µm film thickness; Agilent, USA). The stationary phase was phenyl arylene polymer virtually equivalent to 5%-Phenyl-methylpolysiloxane. The carrier gas was helium. The temperature of injector was 280 °C, of interface 280 °C and of ion source 200 °C. The temperature was programmed at 70 °C, raised from 70 °C to 130 °C at a rate 7 °C min⁻¹, held constant at 130 °C for 2 min, raised from 130 °C to 180 °C at a rate 5 °C min⁻¹, held constant at 130 °C for 3 min, raised from 180 °C to 270 °C at a rate 4 °C min⁻¹, held constant at 180 °C for 4 min. The duration of the analysis was 50.07 min.

Results and Discussion

The molecular weights and the most intensive ions after MS fragmentation of the 2,5-diketopiperazine standards are shown in Table 1 and Figure 2 (a, b, c, d and e). The 2,5-diketopiperazines showed similar fragmentation patterns according to their individual amino acids, but different intensities of the fragments. The fragment at m/z 44 represented the peptide bond. The fragment at m/z 30 represented the proline part after subsequent COO elimination. The fragment at m/z 44 also represented the alanine part after subsequent COO elimination. The fragment at m/z 70 represented the proline part after subsequent CO and H₂ elimination. The fragment at m/z 154 originating from the proline part of the molecule. The fragment at m/z 72 represented the valine part after subsequent COO elimination. The fragment at m/z 86 represented the leucine part after subsequent COO elimination. The fragment at m/z 125 represented the phenylalanine part after subsequent COO elimination. The fragment at m/z 154 represented the cyclo-pro-val part after subsequent isopropyl group elimination.

As a conclusion, the above mentioned characteristic peaks originated from special amino acids could be a powerful tool to recognize the diketopiperazine structures.

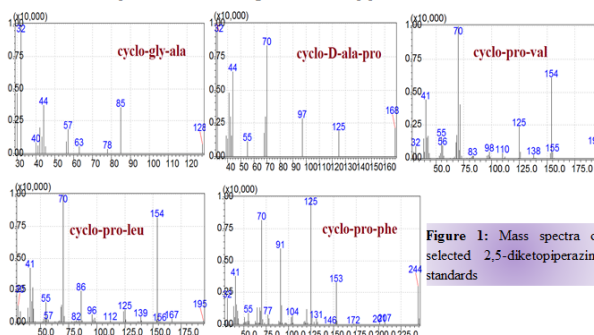


Figure 1: Mass spectra of selected 2,5-diketopiperazine standards

Table 1. Molecular Weight and Most Intense Fragments after GC-MS used for the 2,5-diketopiperazines screening

2,5-diketopiperazines	m/z of (M)	m/z of most intensive fragment
cyclo(Ala-Gly)	128.05	32, 30, 44, 85
cyclo-D-(Ala-Pro)	168.00	32, 70, 44, 41, 42, 97
cyclo-D-(Ala-Val)	170.21	32, 44, 72
cyclo(Pro-Val)	195.95	70, 154, 72, 125, 55
cyclo(Leu-Pro)	210.28	70, 154, 41, 43, 86, 55
cyclo(Phe-Pro)	244.04	125, 70, 91, 41, 154, 120, 244, 32
cyclo(Leu-Phe)	260.34	70, 86, 154
cyclo(Phe-Phe)	294.35	120, 44

References

- [1] Tsurucka, N., Beppu, Y., Koda, H., Doe, N., Watanabe, H., Abe, K. (2012). ADKP Cyclo(L-Phe-L-Phe) Found in Chicken Essence Is a Dual Inhibitor of the Serotonin Transporter and Acetylcholinesterase. PLOS ONE, 7(11), e50824.
- [2] Ginz, M., Engelhardt, U.H. (2001). Identification of new diketopiperazines in roasted coffee. Eur. Food Res. Technol. 213, 8–11.
- [3] Yan, L.A.M.R., Dai Bello, F., Randi, E.K.A and Koehler, P. (2009). Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. J. Agric. Food Chem. 57, 9563–9568.
- [4] Prasad C., 1995. Bioactive cyclic dipeptides. Peptides, 16: 151–164.

2,5-DIKETOPIPERAZINE IDENTIFICATION BASED ON LIQUID CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY ANALYSIS

Sotirios M. Bratakos¹, Vassilia J. Sinanoglou¹, Eleni Siapi², Kyriakos Riganakos³ and Panagiotis Zoumpoulakis²

¹Instrumental Food Analysis Laboratory, Department of Food Technology, Technological Educational Institution of Athens, Ag. Spyridonos 12210 Egaleo, Greece.

²Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Vas. Constantinou Ave., 11636, Athens, Greece

³Laboratory of Food Chemistry and Technology, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

E-mail: pzoump@cc.uoi.gr

Abstract

Diketopiperazines (DKPs) have been detected in a variety of natural products, especially in thermally treated or fermented foods and beverages [1]. These molecules are cyclodipeptides, which found previously in a variety of processed and non-processed food. DKPs are present in various foods (cocoa nibs, roasted coffee, roasted malt, dried squid, chicken essence) and create a metallic bitter taste. They formed from unprotected linear dipeptides under basic conditions especially if the necessary head-to-tail folding not prevented by steric constraints. DKPs exhibit various biological activities, including antiviral, antibacterial, antifungal, anthelmintic and anticancer activities [2]. The purpose of the study was to develop and to validate a liquid chromatography–high resolution mass spectrometry method for the qualification of 2,5-diketopiperazines in food items. Several 2,5-diketopiperazines (cyclic dipeptides) standards were selected according to the literature, in the basis of the detected diketopiperazines in foods. These compounds were identified on the basis of their LC retention times, their molecular ion weight and their mass spectra characteristic fragments (m/z) at MSⁿ fragmentation.

Introduction

Diketopiperazines (DKPs), also known as *dioxopiperazines* or *piperazinediones*, constitute a class of organic molecules in which the two nitrogen atoms of a piperazine 6-membered ring are part of amide linkages. There are three regioisomers possible, differing in the locations of the two carbonyl groups around the ring.

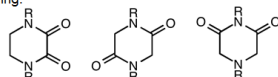


Figure 1. 2,5 and 2,6-isomers of DKPs.

2,5-Diketopiperazine (2,5-DKP) is a type of cyclic organic compound that results from peptide bonds between two amino acids to form a double lactam. They are the smallest cyclic peptides. 2,5-Diketopiperazines are commonly biosynthesized from amino acids by a variety of organisms, including mammals, and are considered to be secondary metabolites [3]. Some proteases, such as dipeptidyl peptidases, cleave the terminal ends of proteins to generate dipeptides, which naturally cyclize to form 2,5-diketopiperazines. Both natural and synthetic 2,5-diketopiperazines exhibit a variety of biological activities including antitumor [4], antiviral [5], antifungal [6] and antibacterial [7] activities.

Materials and Methods

Time	A%	B%	C%	D%	μl/min
0	0.00	100.0	0.0	0.0	300.0
1	0.20	100.0	0.0	0.0	300.0
2	0.30	70.0	30.0	0.0	300.0
3	8.00	40.0	60.0	0.0	300.0
4	9.00	0.0	100.0	0.0	300.0
5	10.00	0.0	100.0	0.0	300.0
6	10.10	100.0	0.0	0.0	300.0
7	15.00	100.0	0.0	0.0	300.0
8	100.0	0.0	0.0	0.0	300.0

Tune File Values	
Source Type	HESI
Polarity	Positive
Capillary Temp (C)	300.00
Source Heater Temp (C)	200.00
Sheath Gas Flow	35.00
Aux Gas Flow	15.00
Source Voltage (kV)	3.50

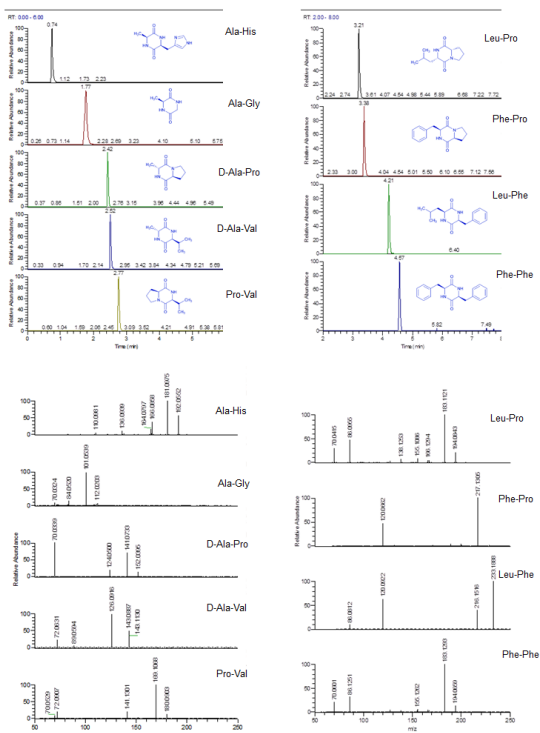
Solvent A	H ₂ O-AcOH(0.1% v/v)
Solvent B	AcN-AcOH(0.1% v/v)

References

- Ginz, M., Engelhardt, U.H. Eur Food Res. Technol. (2001), 213, 8–11.
- Tsunoka, N., Beppu, Y., Koda, H., Doe, N., Watanabe, H., Abe, K. PLOS ONE. (2012), 7(11), e50824.
- Martins, M. B., Carvalho, I. (2007). Tetrahedron 63 (40): 9923–9932.
- Nicholson, B., Lloyd, G. K., Miller, B. R., Palladino, M. A., Kiso, Y., Hayashi, Y., Neuteboom, S. T. (2006). Anti-Cancer Drugs 17 (1): 25–31.
- Sinha, S., Sivastava, R., de Clercq, E., Singh, R. K. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, (2004), 23 (12): 1815–1824.
- Houston, D. R., Synstad, B., Eijank, V. G., Stark, M. J., Eggleston, I. M., van Aalten, D. M. Journal of Medicinal Chemistry, (2004), 47 (23): 5713–5720.
- Kwon, O. S.; Park, S. H.; Yun, B.-S.; Pyun, Y. R.; Kim, C.-J. Journal of Antibiotics, (2000), 53 (9): 954–958.

Results and Discussion

Indicatively, the chromatograms and MS-MS is provided for nine 2,5 DKs.



In conclusion, the cyclic dipeptides identified were: cyclo(Ala-Gly), cyclo-D-(Ala-Pro), cyclo-D-(Ala-Val), cyclo(Pro-Val), cyclo(Ala-His), cyclo(Leu-Pro), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Leu-Phe), cyclo(Phe-Phe), cyclo(His-Phe), cyclo(Leu-Trp), cyclo(Asp-Gly), cyclo(Asp-Asp), cyclo(Trp-Tyr), cyclo(Val-Val), cyclo(Gly-Leu), cyclo(Ser-Tyr), cyclo(Phe-Ser) and cyclo(Gly-Gly).

