ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΕΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών μορίων από το άγριο τριαντάφυλλο (Rosa Canina L.)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ :

Βασιλογιάννη Ειρήνη Σοφία

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :

Κέκος Δημήτριος

ΑΘΗΝΑ 2020

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε, κατά το μεγαλύτερο μέρος της, στο εργαστήριο Τεχνολογίας Βιοσυστημάτων του Τομέα Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διεργασιών και στο οριζόντιο εργαστήριο αναλύσεων στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην περάτωση της παρούσας εργασίας:

Τον Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη διπλωματική αυτή, δίνοντάς μου την ευκαιρία να εμβαθύνω και να κατανοήσω περισσότερο στο αντικείμενο της βιοτεχνολογίας που τόσο πολύ με ενδιαφέρει.

Στην Επίκουρο Καθηγήτρια Διομή Μαμμά, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου, καθώς εκτός από τη βοήθεια που μου προσέφερε στην αντιμετώπιση προβλημάτων που προέκυψαν, κατάφερε να με αντέξει και με στήριξε ηθικά και πνευματικά ανιδιοτελώς, βοηθώντας με ουσιαστικά όλο αυτό το διάστημα.

Θερμά ευχαριστώ επίσης στην Καθηγήτρια Θεοπίστη Λυμπεροπούλου, για την άψογη συνεργασία μας, τη στήριξη και τις συμβουλές της, οι οποίες ήταν καθοριστικής σημασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Στέλλα Καλαντζή για τη βοήθειά της και τη στήριξή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων, τη Διδάκτορα Μαρία Σαββίδου για τις πολύτιμες συμβουλές της όλο αυτό το διάστημα, αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τη χρειάστηκα.

Ένα ιδιαίτερο και μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, την αδερφή μου Μαριλή και κάποιους ιδιαίτερους ανθρώπους στη ζωή μου που καθημερινά είναι στο πλευρό μου και μου προσφέρουν ανιδιοτελώς την αγάπη και τη στήριξή τους, βοηθώντας με να παραμένω προσηλωμένη στο στόχο μου. Χωρίς αυτούς δε θα είχα φτάσει εδώ.

Περίληψη

Η αυξανόμενη ζήτηση στον φαρμακευτικό και τον καλλυντικό τομέα έχει οδηγήσει στην διεξαγωγή πολυάριθμων μελετών για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από φαρμακευτικά φυτά. Ένα από αυτά είναι το τριαντάφυλλο *Rosa Canina L.*, το οποίο είναι γνωστό ότι περιέχει πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στον καρπό του συγκεκριμένου τριαντάφυλλου είναι υπεύθυνες για την αντιμετώπιση και την πρόληψη ποικίλων ασθενειών όπως το κοινό κρυολόγημα, διάφορες μολυσματικές νόσους, γαστρεντερικές διαταραχές, ασθένειες της ουροφόρου οδού αλλά και φλεγμονώδεις νόσους. Ανάμεσα σε αυτές ανήκουν τα καροτενοειδή, ορισμένες φαινολικές ενώσεις, οι τοκοφερόλες, οι πολυφαινόλες, οι τανίνες, οι πηκτίνες, τα σάκχαρα, διάφορα οργανικά οξέα, ορισμένα αμινοξέα, αιθέρια έλαια και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης (Συμβατική Εκχύλιση, Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα –ΜΑΕ– και Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση –ΕΥΕ–) και ο τρόπος επίδρασής τους στην απόδοση των βιοδραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση των δύο πρώτων μεθόδων στις ολικές φαινολικές ενώσεις, στα ολικά φλαβονοειδή και στην αντιοξειδωτική δράση σε δείγματα του καρπού, του φλοιού και του σπόρου του καρπού. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης σε συνδυασμό με τη Συμβατική Εκχύλιση στα ίδια χαρακτηριστικά αλλά και στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και τη γλυκόζη σε δείγματα φλοιού του τριαντάφυλλου. Για την Ενζυμικά υποβοηθούμενη Εκχύλιση έγινε η χρήση τριών διαφορετικών ενζυμικών σκευασμάτων: του *Cellic CTec2*,του *Viscozyme L.* και του *BioPrep*. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν ο χρόνος και το ενζυμικό φορτίο ενώ τα πειράματα σχεδιάστηκαν σύμφωνα με το σχεδιασμό *Taguchi*.

Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε μεθόδου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η μέθοδος *Folin-Ciocalteu* για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων, η μέθοδος χλωριούχου αργιλίου για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών και η μέθοδος *DPPH* για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκαν με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και η γλυκόζη με τη χρήση του ενζυμικού παρασκευάσματος *GOD/PAP* (*Glucotest*). Ο προσδιορισμός των ενώσεων αυτών βασίστηκε στις καμπύλες αναφοράς ορισμένων πρότυπων ενώσεων.

Από την ανάλυση των εκχυλισμάτων της συμβατικής και της Εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα προέκυψε ότι ο φλοιός του τριαντάφυλλου είναι

πιο πλούσιος σε βιοδραστικές ενώσεις απ΄ ότι ο σπόρος. Έτσι, για την Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν μόνο δείγματα του φλοιού του τριαντάφυλλου.

Συγκρίνοντας τα διαφορετικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ΕΥΕ, προέκυψε ότι καλύτερη απόδοση σε βιοδραστικές ενώσεις (ολικά φαινολικά, ολικά φλαβονοειδή, αντιοξειδωτική δράση) επετεύχθη με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος *BioPrep*. Για τα δύο πρώτα ενζυμικά σκευάσματα βρέθηκε ότι ο χρόνος ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας για την μεγαλύτερη παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων, ενώ κατά τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος *BioPrep*, πιο σημαντικός παράγοντας αποδείχθηκε το ενζυμικό φορτίο.

Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει επίσης την ταυτοποίηση ορισμένων ενώσεων (σε εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης και της ΕΥΕ συνδυασμένης με συμβατική εκχύλιση, με χρήση των *Viscozyme L.* και *BioPrep*) με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας. Προκειμένου να καταστεί εφικτό αυτό έγινε η μέτρηση των φασμάτων ορισμένων πρότυπων ενώσεων.

Λέξεις-Κλειδιά: Τριαντάφυλλο, καρπός, φλοιός, εκχύλιση, ένζυμα, βιοδραστικές ενώσεις, φαινολικά, φλαβονοειδή, σάκχαρα, αντιοξειδωτική δράση, υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας

Abstract

The increasing demand for bioactive compounds has led the pharmaceutical and nutraceutical industries in the search for such compounds, in pharmaceutical plants and herbs. A plant included in this category, is *Rosa Canina L.*, known for containing a plethora of bioactive compounds with high antioxidant activity. The rosehip of *Rosa Canina L.*, is rich in bioactive compounds with potential therapeutic value against a number of pathologies including common flu, a variety of infectious diseases, gastrointestinal disorders, urinary tract diseases and inflammatory diseases. Carotenoids, phenolic compounds, tocopherols, polyphenols, tannins, pectines, sugars, organic acids and aminoacids, essential oils and polyunsaturated fatty acids are among those compounds.

This study aims in the comparison of three different extraction methods (Conventional Extraction, Microwave assisted extraction – MAE – and Enzyme assisted extraction – EAE –) and in how they affect the yield of bioactive compounds. Specifically we studied the effect of the first two methods in the Total Phenolic Compounds (TPC), Total Flavonoids (TF) and the antioxidant activity in rosehip, shell (or hypanthium) and seed samples. Subsequently, we assessed the effect of Enzyme-Assisted Extraction combined with Conventional Extraction in the above characteristics but also in the total reducing sugars and glucose in shell samples of *Rosa Canina L.* For the Enzyme-Assisted Extraction three different enzymatic preparations were used: *Cellic CTec2*, *Viscozyme L.* and *BioPrep*. The factors of interest included extraction time and enzyme load.

In order to evaluate the effectiveness of each method of extraction we carried out a number of analyses. More specifically, we applied the method of *Folin-Ciocalteu* in order to determine the Total Phenolic Content, the method of Aluminum Chloride for the determination of Total Flavonoids and DPPH for the determination of antioxidant activity. Total reducing sugars and glucose of the extracts were determined by the photometric method of 3,5-dinitrosalycilic acid and by the use of *GOD/PAP* enzyme preparation respectively. The determination of these compounds was performed based on the standard curves of specific model compounds.

The analysis of the extracts of conventional and enzyme-assisted extraction showed that the shell of Rosa Canina L. is richer than the seeds in bioactive compounds. Therefore, for the enzyme-assisted extraction combined with conventional extraction, we used only shell samples of the rose.

Comparison of the different enzymes used in the EAE, led to the conclusion that the best yield of bioactive compounds (TPC, TF and antioxidant activity) is achieved by

using *BioPrep* enzyme preparation. For the first two enzyme preparations time factor is more important for the greater yield of bioactive compounds, whereas for the use of *BioPrep* enzyme preparation the most important factor is enzyme load.

This study also included the identification of specific compounds (in conventional extraction and EAE combined with conventional extraction derived extracts with the use of *Viscozyme L.* and *BioPrep* enzyme preparation) by liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS). In order to achieve this, we measured the spectrum of model compounds.

Key words: Rose, rosehip, shell, extraction, enzymes, bioactive compounds, Phenolics, flavonoids, sugars, antioxidant activity, liquid chromatography, mass spectrometry

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος 1

Περίληψη 2

Abstract 4

Βιβλιογραφική Επισκόπηση 9

Κεφάλαιο 1 : Καρπός Άγριου Τριαντάφυλλου 10

1.1 Άγριο τριαντάφυλλο (Rosa Canina L.) 11

1.2 Καρπός άγριου τριαντάφυλλου (Rosehip) 14

1.2.1 Χημική σύσταση του καρπού 16

1.2.2 Οι σπόροι του καρπού του τριαντάφυλλου (rosehip seeds) 17

Κεφάλαιο 2 : Βιοδραστικές ενώσεις 19

2.1 Φαινολικές Ενώσεις 20

2.1.1 Φαινολικές ενώσεις στον καρπό 22

2.1.2 Αντιοξειδωτική δράση και ιδιότητες φαινολικών ενώσεων 23

2.1.3 Φλαβονοειδή 23

2.1.4 Τανίνες 26

2.1.5 Ανθοκυανίνες και καροτενοειδή 27

2.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων 29

2.3 Μέθοδος Χλωριούχου αργιλίου για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων 29

Κεφάλαιο 3: Μέθοδοι εκχύλισης 31

3.1 Κατηγοριοποίηση των μεθόδων εκχύλισης 32

3.1.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης 32

3.1.1.1 Εκχύλιση στερεού-υγρού 32

3.1.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης 34

3.1.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave – Assisted Extraction) 34

3.2 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση 36

3.2.1 Ένζυμα 37

3.2.1.1 Πηκτινάσες - Εφαρμογές 39

3.2.1.2 Κυτταρινάσες - Εφαρμογές 39

3.2.1.3 Ημικυτταρινάσες - Εφαρμογές 39

3.2.2 Ένζυμα και τρόποι που επηρεάζουν τις βιοδραστικές ενώσεις 39

3.2.3 Επίδραση των παραμέτρων της ΕΥΕ στην απόδοση της εκχύλισης 40
3.2.3.1 Επίδραση του ενζυμικού τύπου 40
3.2.3.2 Επίδραση των ενζυμικών μιγμάτων 41
3.2.3.3 Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης 41
3.2.3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης 42
3.2.3.5 Επίδραση του pH στην ΕΥΕ 42
Κεφάλαιο 4: Αντιοξειδωτικά 43
4.1 Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά 43
4.2 Πρωτογενή αντιοξειδωτικά 44
4.3 Παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά 44
4.4 Μέθοδος DPPH για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών 45
Μέθοδοι και Υλικά 47
Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι & Υλικά 48
5.1 Υλικά και Αντιδραστήρια 48
5.1.1 Όργανα και Συσκευές 48
5.1.2 Πρώτη Ύλη 49
5.1.3 Αντιδραστήρια - Τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα 49
5.2 Μέθοδοι 49
5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση 49
5.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα 50
5.2.3 Μέθοδος Taguchi 50
5.2.4 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση συνδυασμένη με συμβατική εκχύλιση ... 53
5.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων 55
5.3.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών - Μέθοδος Folin-Ciocalteu 55
5.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών – Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου 56
5.3.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – δοκιμή DPPH 58
5.3.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων 59
5.3.5 Προσδιορισμός γλυκόζης 60
5.3.6 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας 60
Αποτελέσματα 62
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα - Συζήτηση 63
6.1 Συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα 63
6.1.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις 63
6.1.2 Ολικά φλαβονοειδή 65

6.1.3 Αντιοξειδωτική Δράση 66
6.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση συνδυασμένη με συμβατική εκχύλιση 70
6.2.1 ΕΥΕ με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2 70
6.2.1.1 Απώλεια βάρους 70
6.2.1.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων 73
6.2.1.3 Ολικές Φαινολικές ενώσεις 80
6.2.1.4 Ολικά φλαβονοειδή 83
6.2.1.5 Αντιοξειδωτική δράση 86
6.2.2 ΕΥΕ με χρήση του ενζύμου Viscozyme L. 89
6.2.2.1 Απώλεια βάρους 90
6.2.2.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων 93
6.2.2.3 Ολικές φαινολικές ενώσεις 99
6.2.2.4 Ολικά φλαβονοειδή 102
6.2.2.5 Αντιοξειδωτική δράση 105
6.2.3 ΕΥΕ με χρήση του ενζύμου BioPrep 108
6.2.3.1 Απώλεια βάρους 108
6.2.3.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων 111
6.2.3.3 Ολικές φαινολικές ενώσεις 118
6.2.3.4 Ολικά φλαβονοειδή 121
6.2.3.5 Αντιοξειδωτική δράση 124
6.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μεθόδου Taguchi 127
6.4 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (LC – MS) 128
Συμπεράσματα 140
Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα και Προοπτικές 141
7.1 Συμπεράσματα 141
7.2 Προοπτικές 144
Βιβλιογραφία 145

Βιβλιογραφική Επισκόπηση

Κεφάλαιο 1 : Καρπός Άγριου Τριαντάφυλλου

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για τα βότανα, το οποίο έχει οδηγήσει στη διεξαγωγή πολυάριθμων ερευνών βασισμένων σε ένα μεγάλο αριθμό ποικίλων φυτών. Από τα φυτά αυτά, τα περισσότερα είναι ευρέως γνωστά και χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική.

Ο καρπός (*rosehip*) του τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.* χρησιμοποιείται ως φυτικό φάρμακο για περισσότερα από 2000 χρόνια, όμως μόλις τα τελευταία χρόνια μέσω ερευνών αρχίζουν και διευκρινίζονται οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους το φυτικό αυτό προϊόν επηρεάζει την ανθρώπινη υγεία.

Οι λόγοι για τους οποίους το φυτό προάγει την ανθρώπινη υγεία βρίσκονται στην ίδια του τη σύνθεση και τα χαρακτηριστικά του. Πιο συγκεκριμένα τα χαρακτηριστικά του τριαντάφυλλου τα οποία προωθούν την υγεία των ανθρώπων είναι τα εξής:

1. τα φλαβονοειδή
2. τα καροτενοειδή
3. τα λιπαρά οξέα (Fatty Acids FAs)
4. το υψηλό περιεχόμενο σε βιταμίνες (ειδικά βιταμίνης C)
5. οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, και τέλος
6. αντιφλεγμονώδεις παράγοντες

Τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί η ζήτηση των rosehips ως φυσικών και χρήσιμων υλικών, κυρίως για τη χρήση τους σε φαρμακολογικές εφαρμογές αλλά και ως συμπληρώματα διατροφής, ειδικών ελαίων, κρεμών, απολεπιστικών και καλλυντικών προϊόντων. Η υψηλή τους περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις προστιθέμενης αξίας, όπως είναι το ασκορβικό οξύ, οι φαινολικές ενώσεις και οι αντιοξειδωτικές ουσίες, επιτρέπει την εκχύλιση και απομόνωση αυτών για τη μετέπειτα χρήση τους σε ποικίλες εφαρμογές (Winther et al., 2016).

1.1 Άγριο τριαντάφυλλο (Rosa Canina L.)

Το τριαντάφυλλο *Rosa Canina L.* ανήκει στο γένος *Rosa* στην οικογένεια *Rosaceae* (Ahmad et al., 2015), και αποτελεί ουσιαστικά έναν άγριο θάμνο, ο οποίος αναπτύσσεται κυρίως στην Ευρώπη, τη βορειοδυτική Αφρική και τη δυτική Ασία. Θεωρείται ότι εξελίχθηκε μετά την εποχή των παγετώνων από τη μίξη ενός διαφορετικού γένους άγριου τριαντάφυλλου *Rosa spp.* και ενός εξαφανισμένου πλέον αρχέγονου *"Protocaninae"* (Winther et al., 2016). Το ύψος αυτού του φυλλοβόλου θάμνου κυμαίνεται από 2 έως 3 μέτρα, ενώ τα στελέχη του είναι μικρά και έχουν αιχμηρά αγκάθια σαν γάντζους τα οποία βοηθούν το φυτό να αναρριχηθεί. Τα φύλλα του είναι πεπλατυσμένα και μεγαλώνουν σε σχηματισμούς οι οποίοι αποτελούνται από 5 έως 7 φυλλαράκια.

Τα λουλούδια του *Rosa Canina L.* συνήθως βρίσκονται σε ανοιχτούς ροζ χρωματισμούς αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου το χρώμα μπορεί να κυμανθεί από βαθύ ροζ έως λευκό. Αποτελούνται από 5 πέταλα τα οποία έχουν διάμετρο 4-5 cm και σταδιακά στο κέντρο τους σχηματίζεται ο συνήθως πορτοκαλοκόκκινος καρπός, το χρώμα του οποίου κυμαίνεται από πορτοκαλοκίτρινο έως σκούρο κόκκινο και σε κάποιες περιπτώσεις σχεδόν μαύρο, ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε καροτενοειδή, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες (Bhave et al., 2017). Το φυτό αυτό παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες όπως σε φτωχό σε θρεπτικά συστατικά έδαφος, βραχώδεις περιοχές, έλλειψη νερού κ.α. Τα λουλούδια του *Rosa Canina L.* είναι ερμαφρόδιτα και μπορούν να επικονιαστούν από μέλισσες, μύγες σκαθάρια και λεπιδόπτερα. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι επικονίαση ονομάζεται η διαδικασία μεταφοράς της γύρης από τους ανθούς στο στίγμα μέσω φορέων οι οποίοι ονομάζονται επικονιαστές (π.χ οι μέλισσες) (Παπαδάκης et al., 2008). Μεγαλύτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα λουλούδια του τριαντάφυλλου μπορούν να αυτό-επικονιαστούν, γεγονός που καθιστά το *Rosa Canina L.* ένα αυτό-γόνιμο φυτό (Ahmad et al., 2015). Η μορφή ενός τυπικού άνθους του τριαντάφυλλου παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.

Εικόνα 1. Το άνθος του τριαντάφυλλου Rosa Canina L.

Ορισμένες φαρμακευτικές χρήσεις του *Rosa Canina L.* παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Winther et al., 2016).

Πίνακας 1. Ιστορικά καταγεγραμμένες θεραπευτικές χρήσεις του Rosa Canina L.

Μέρος του φυτού που χρησιμοποιήθηκε	Τύπος θεραπείας	Συμπτώματα και ασθένειες που αντιμετωπίζονται
Ρίζες	Εσωτερική χρήση	Πρωκτικές αιμορροΐδες, Δυσουρία, βήχας, ρευματισμοί
Φύλλα	Εσωτερική χρήση	Κρυολογήματα, γρίπη, βήχας, έκζεμα
Κλαδιά	Εσωτερική χρήση	πέτρες νεφρών
	Εξωτερική χρήση	έκζεμα
Καρποί (rosehips)	Εσωτερική χρήση	Κρυολογήματα, γρίπη, βήχας, βρογχίτιδα, άσθμα, μόλυνση, ανοσολογική νεφρίτιδα, ασθένειες της χοληδόχου κύστης, καψίματα, έλλειψη βιταμίνης C, κολικούς, διαταραχές του κατώτερου

		ουροποιητικού συστήματος, ως διουρητικό και για αρθριτικές και ρευματικές διαταραχές, για ξέπλυμα των ματιών, διάρροια, ως προφύλαξη για εντερικές λοιμώξεις, ως καθαρτικό, για τον διαβήτη και την ανεπαρκή κυκλοφορία σε περιφερικά αγγεία
Σπόροι (rosehip seeds)	Εσωτερική χρήση	Για τα νεφρά και το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα, ως διουρητικό, για οστεοαρθρίτιδα, ρευματισμούς, ποδάγρα και ισχιαλγία, για κρυολογήματα και ασθένειες που κάνουν πυρετό, ως αιμοστατικό
	Εξωτερική χρήση	Ρευματισμούς, αιμορροΐδες, διάρροια, καρδιακές διαταραχές,

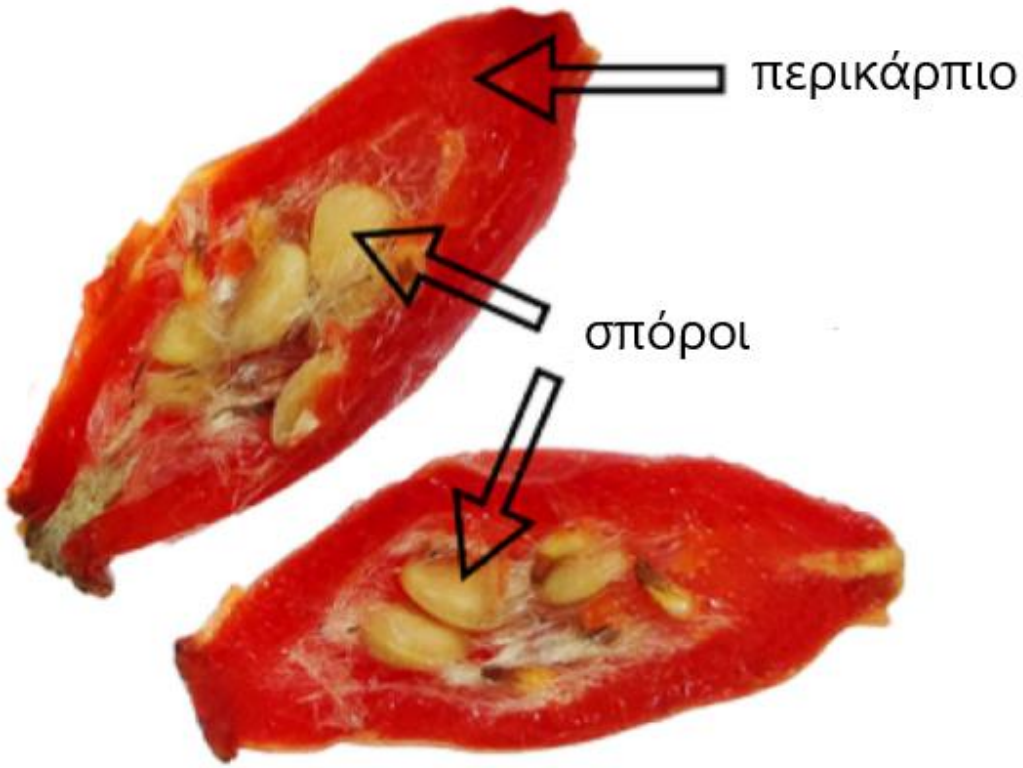
Ο Πλίνιος ο Γέροντας ήταν αυτός που αναγνώρισε το τριαντάφυλλο αυτό ως φαρμακευτικό φυτό (23-79 π.Χ), καθώς ήταν ο πρώτος που το χρησιμοποίησε για τη θεραπεία από το δάγκωμα σκύλου σε Γαλλικές φυλές. Γι' αυτό το λόγο το *Rosa Canina L.* αναφέρεται και ως "dog rose". Αργότερα (1098-1179 μ.Χ) χρησιμοποιήθηκε από την γνωστή τότε καλόγρια Hildegard του Bingen, ως δυναμωτικό τσάι σε θεραπείες. Επίσης, παρόλο που δεν ήταν γνωστό ακόμη ότι η υψηλή συγκέντρωση της βιταμίνης C στον καρπό αποτελούσε το κλειδί για την πρόληψη ή και αντιμετώπιση του σκορβούτου, το τριαντάφυλλο χρησιμοποιήθηκε αρκετά από τους ναύτες ως μέσο προστασίας έναντι αυτού αλλά και άλλων ασθενειών που μπορεί να προκαλέσει η έλλειψη βιταμινών γενικότερα, κι έτσι μεταφέρθηκε και σε άλλες ηπείρους. Η υψηλή περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C ήταν επίσης ο λόγος που το *Rosa Canina L.* αποτέλεσε τη βασική πηγή βιταμίνης C κατά τον δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, ενώ η κυβέρνηση οργάνωσε μαζική συγκομιδή αυτού. Στη Σκανδιναβία αποτελεί παράδοση η χρήση των καρπών του τριαντάφυλλου για την παρασκευή μαρμελάδας και διάφορων σουπών. Αυτή καθαυτή η χρήση βέβαια του τριαντάφυλλου, δεν μπορεί να συνδεθεί με την προώθηση της ανθρώπινης υγείας, καθώς τα βασικά συστατικά που συντελούν σε αυτή, είναι ασταθή και αποσυντίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ ο βρασμός που απαιτείται για την παρασκευή της μαρμελάδας και της σούπας, αδρανοποιεί τα βιοδραστικά συστατικά που εμπεριέχονται στον καρπό.

1.2 Καρπός άγριου τριαντάφυλλου (Rosehip)

Οι καρποί του τριαντάφυλλου συναντιούνται συνήθως σε αποχρώσεις του κόκκινου και του πορτοκαλί (Εικόνα 1), και αποτελούνται από πολλούς σπόρους (*rosehip seeds*), περίπου 30-35%, οι οποίοι περικλείονται από ένα διευρυμένο, κόκκινο, σαρκώδες περικάρπιο (*hypanthium* ή *shell*) το οποίο καταλαμβάνει το 65-70% του καρπού (Εικόνες 2, 3 (Winther et al., 2016)). Οι καρποί του τριαντάφυλλου περιέχουν μεγάλο αριθμό συστατικών που υπόκεινται σε εποχιακές διακυμάνσεις όσων αφορά τη σύστασή τους (όπως άλλωστε και όλα τα φυτικά προϊόντα) (Winther et al., 2016).

Εικόνα 2. Το τριαντάφυλλο Rosa Canina L. μαζί με τους καρπούς του (rosehips)

Παρόλο που υπάρχουν και άλλα είδη τριαντάφυλλων που διαθέτουν καρπούς, αυτοί του *Rosa Canina L.*, είναι οι μόνοι που αποδεδειγμένα έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Winther et al., 2016). Οι καρποί του τριαντάφυλλου χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική, καθώς δρουν προληπτικά αλλά και θεραπευτικά έναντι στο κοινό κρυολόγημα, σε διάφορες μολυσματικές νόσους, γαστρεντερικές διαταραχές, σε ασθένειες της ουροφόρου οδού αλλά και σε φλεγμονώδεις νόσους. Επίσης έχει αποδειχθεί σε κλινικές δοκιμές ότι η σκόνη του καρπού μειώνει τα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας.



Εικόνα 3. Απλοποιημένη βοτανική ανατομία του καρπού και τα μέρη αυτού

Εικόνα 4. Σπόροι και περικάρπιο (ή φλοιός) του καρπού ξεχωριστά

Δεδομένου ότι μεταξύ των υπόλοιπων φρούτων και λαχανικών, οι καρποί περιέχουν ασκορβικό οξύ σε υψηλότερα επίπεδα, είναι σύνηθες εδώ και χρόνια στην Ευρώπη να χρησιμοποιούνται ως ροφήματα βοτάνων αλλά και ως συμπληρώματα βιταμινών. Οι καρποί φρέσκοι μπορούν να καταναλωθούν ως σνακ, ενώ αποξηραμένοι μπορούν με μεταποίησή τους να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων όπως είναι οι μαρμελάδες, το νέκταρ, το ψωμί και το τσάι (Ilyasoğlu, 2014).

1.2.1 Χημική σύσταση του καρπού

Η μεγάλη περιεκτικότητα του καρπού σε βιοδραστικές ενώσεις, επιτρέπει όχι μόνο την άμεση κατανάλωση αυτού αλλά και την εκχύλιση των ενώσεων αυτών και τη χρήση τους σε πρόσθετα τροφίμων, σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Jiménez et al., 2017).

Η σύσταση του καρπού μεταβάλλεται στα διάφορα είδη του τριαντάφυλλου *Rosa Canina*, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αυτά αναπτύσσονται. Ρόλο στη βιοχημική σύστασή του, άρα και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, παίζουν οι ώρες στις οποίες το τριαντάφυλλο εκτίθεται στον ήλιο, το υψόμετρο στο οποίο βρίσκεται, το έδαφος και η συχνότητα βροχοπτώσεων στην περιοχή. Επιπλέον, η ποικιλία στην ποιότητα του τελικού προϊόντος όσων αφορά τα βιοδραστικά συστατικά του, εξαρτάται από το πότε έγινε η συγκομιδή του καρπού αλλά και από τη μέθοδο και τη θερμοκρασία στην οποία έγινε η ξήρανσή του (Winther et al., 2016). Το περιεχόμενο, η ενεργότητα και η βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ουσιών που περιέχονται στον καρπό, εξαρτώνται τόσο από εγγενείς (γένος, είδος, ποικιλία), όσο και από εξωτερικούς παράγοντες όπως αυτοί που αναφέρθηκαν παραπάνω (αγρονομικοί, περιβαλλοντικοί, χειρισμοί αποθήκευσης και επεξεργασίας) . Οι Jiménez et al., 2017 παρατήρησαν ότι ανάμεσα στα διαφορετικά είδη τριαντάφυλλου, αυτά που αναπτύχθηκαν σε περιοχές με περισσότερη ηλιοφάνεια περιείχαν λιγότερο ασκορβικό οξύ, σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε περιοχές με λιγότερο ή καθόλου ήλιο. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν ότι όσο πιο φρέσκος είναι ο καρπός, δηλαδή όσο περισσότερο νερό περιέχει, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχει.

Έχει αποδειχθεί ότι οι καρποί περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών ουσιών όπως καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες, πολυφαινόλες, τανίνες, πηκτίνες, σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη) (Koczka et al., 2018), οργανικά οξέα, αμινοξέα, αιθέρια έλαια και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Ahmad et al., 2015). Εκτός από ασκορβικό, ο καρπός περιέχει κιτρικό και μηλικό οξύ. Ανάμεσα στα καροτενοειδή που περιέχει βρίσκονται το λυκοπένιο, η β-κρυπτοξανθίνη, το β-καροτένιο, η ρουβιξανθίνη, βενζοξανθίνη και ζεαξανθίνη. Επιπλέον, περιέχει ποικιλία μεταλλικών θρεπτικών συστατικών, με κύρια τα: φωσφόρο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και ψευδάργυρο (Koczka et al., 2018).

Ο καρπός του *Rosa Canina* είναι αυτός ο οποίος περιέχει βιταμίνη C σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα άλλα είδη τριαντάφυλλου. Παράλληλα, περιέχει τις βιταμίνες A, B1, B2, B6, D, E, και K (Koczka et al., 2018). Έχει αποδειχθεί ότι οι ενώσεις που υπάρχουν σε μεγαλύτερη αφθονία στον καρπό του *Rosa Canina* είναι το ασκορβικό οξύ, οι φαινολικές ενώσεις και διάφορα λιπαρά οξέα. Παράλληλα,

αποτελεί πολύ καλή πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων ενώ έχει βρεθεί ότι περιέχει 4 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη φυτική καλλιέργεια. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αφορούν τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών, οι (Jiménez et al., 2017) παρατήρησαν ότι ο καρπός του *R. Canina*, περιέχει φαινολικές ουσίες σε μικρότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με άλλα είδη τριαντάφυλλων.

1.2.2 Οι σπόροι του καρπού του τριαντάφυλλου (rosehip seeds)

Οι σπόροι του καρπού, οι οποίοι αποτελούν υποπροϊόντα αυτού, χρησιμοποιούνται και ως ζωοτροφή. Είναι γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον έρευνες που γίνονται σε βιομηχανίες μεταποίησης τροφίμων και αφορούν τον χαρακτηρισμό των υποπροϊόντων του καρπού, καθώς αυτός, ως πιθανή πηγή βιοδραστικών ουσιών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακολογικές και καλλυντικές εφαρμογές.

Τα στοιχεία που είναι διαθέσιμα σχετικά με τη θρεπτική, τη φυτοχημική σύνθεση και τα λιπιδικά χαρακτηριστικά του σπόρου είναι περιορισμένα. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι το λιπιδικό κλάσμα του σπόρου του καρπού αποτελείται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Έχει διαπιστωθεί επίσης, ότι οι σπόροι του καρπού αλλά και τα έλαια αυτού αποτελούν καλές πηγές φυτοθρεπτικών συστατικών, ενώ παρουσιάζουν και υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Ilyasoğlu, 2014), η οποία αποδίδεται κυρίως στην παρουσία ασκορβικού οξέος και φαινολικών ενώσεων (Ahmad et al., 2015).

Οι σπόροι του καρπού είναι πλούσιοι σε ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA's) τα οποία έχει αποδειχθεί ότι βοηθούν στη μείωση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης του αίματος, στην αποφυγή θρομβώσεων, στη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, στην ενίσχυση της ρευστότητας του αίματος, στην αυξημένη πλαστικότητα των ερυθροκυττάρων, στη μείωση των καρδιαγγειακών ασθενειών αλλά και στην αναστολή φλεγμονών. Οι καρποί και κυρίως οι σπόροι αυτών είναι επίσης πλούσιοι σε διαιτητικές ίνες, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την ανθρώπινη διατροφή καθώς βοηθούν στην καλύτερη πέψη των τροφίμων αλλά και στην καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Winther et al., 2016).

Συγκρίνοντας δύο διαφορετικά προϊόντα του καρπού, ένα που περιείχε μόνο το περίβλημα (hypanthium), και ένα που περιείχε και το περίβλημα αλλά και τους σπόρους, βρέθηκε ότι στο δεύτερο περιέχονταν τέσσερις φορές περισσότερα FA's και

7 φορές περισσότερο λινολεϊκό οξύ (PUFA). Αυτή η έρευνα υποδεικνύει την ύπαρξη των FA's κυρίως στους σπόρους του καρπού (Schwager et al., 2014).

Τα έλαια των σπόρων, παραλαμβάνονται συνήθως με συμπίεση αυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες και χρησιμοποιούνται συχνά σε καλλυντικά, λοσιόν, κρέμες και προϊόντα φροντίδας του δέρματος λόγω της θεραπευτικής επίδρασης που έχουν σε διάφορες δερματικές διαταραχές, όπως ουλές, καψίματα, έκζεμα, δερματίτιδα και ακμή (Ahmad et al., 2015). Είναι πλούσια σε αλκοόλες, αλδεΰδες, μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, και εστέρες (Koczka et al., 2018).

Τα αποτελέσματα των ερευνών των (Ilyasoğlu, 2014), υποδεικνύουν ότι το λιπιδικό και πρωτεϊνικό περιεχόμενο των σπόρων είναι μεγαλύτερο από αυτό όλου του καρπού. Αντιθέτως, η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, ολικά φαινολικά και ασκορβικό οξύ είναι μικρότερη στους σπόρους απ' ότι σ' όλο τον καρπό. Παρόμοια συμπεριφορά ακολουθεί και η αντιοξειδωτική συμπεριφορά του σπόρου (μετρούμενη σε ισοδύναμα *Trolox - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* -), καθώς βρέθηκε μικρότερη από αυτή του καρπού ολόκληρου.

Κεφάλαιο 2 : Βιοδραστικές ενώσεις

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια υπάρχει τεράστια ζήτηση για βιοδραστικές ενώσεις από τις φαρμακοβιομηχανίες αλλά και τις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω του τεκμηριωμένου ρόλου αυτών στην πρόληψη ασθενειών, όπως ο καρκίνος, αλλά και στην ενίσχυση του ανθρώπινου δέρματος προκειμένου να φαίνεται νεότερο και να είναι υγιέστερο. Οι καταναλωτές προτιμούν να αγοράζουν φυσικά προϊόντα λόγω των πλεονεκτημάτων τους στην ανθρώπινη υγεία, κι έτσι οι βιομηχανίες εστιάζουν την προσοχή τους στην παραλαβή των βιοδραστικών ενώσεων από φυσικές πηγές όπως είναι τα φυτά και τα φρούτα.

Οι βιοδραστικές ενώσεις είναι μεταβολίτες που συνθέτονται από τα φυτά και συμβάλουν στην άμυνά αυτών ενάντια σε παράγοντες που απειλούν την ευδοκιμία τους. Παράλληλα ορισμένοι από αυτούς τους μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ανθρώπους σε ποικιλία εφαρμογών (Puri et al., 2012). Τα φυτά συνθέτουν πολλούς κύριους και δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είναι πολύ ευεργετικοί για την ανθρώπινη υγεία. Οι κύριοι μεταβολίτες των φυτών είναι κυρίως λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Οι δευτερογενείς χωρίζονται σε τρείς κατηγορίες (Industries, 2013):

1. φαινολικά,
2. τερπενοειδή και
3. αλκαλοειδή.

Δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι τα καροτενοειδή λειτουργούν προστατευτικά για το δέρμα και τα μάτια, ενώ οι πολυφαινολικές ενώσεις, στις οποίες ανήκουν τα φαινολικά οξέα, οι ανθοκυανίνες , τα φλαβονοειδή, οι τανίνες και οι λιγνίνες, έχουν ποικίλα πλεονεκτήματα, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση.

Εκχυλίσματα από διαφορετικά μέρη των φυτών χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες για την παρασκευή ποικίλων προϊόντων περιποίησης του σώματος ή των μαλλιών, αρώματα, αντιγηραντικές κρέμες κλπ. Τα εκχυλίσματα αυτά παρόλο που τις περισσότερες φορές είναι απολύτως φυσικά, υπόκεινται σε εκτενείς μελέτες προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι η χρήση τους είναι απολύτως ασφαλής για την ανθρώπινη υγεία (Yahya et al., 2018).

Το αυξημένο ενδιαφέρον προς φυτά που έχουν μεγάλο περιεχόμενο σε βιοδραστικές ουσίες, έχει οδηγήσει στην πιο εκτεταμένη μελέτη συγκεκριμένων μεταβολιτών μείζουσας σημασίας για την ανθρώπινη υγεία, όπως τα καροτενοειδή και οι πολυφαινολικές ενώσεις. Οι καρποί του *R. Canina L.*, θεωρούνται πολύ καλή πηγή των συγκεκριμένων μεταβολιτών, γι’ αυτό και μελετώνται ιδιαιτέρως κυρίως στη Βορειοανατολική Ευρώπη. Παρόλα αυτά, έκπληξη αποτελεί το γεγονός ότι στο Νότο

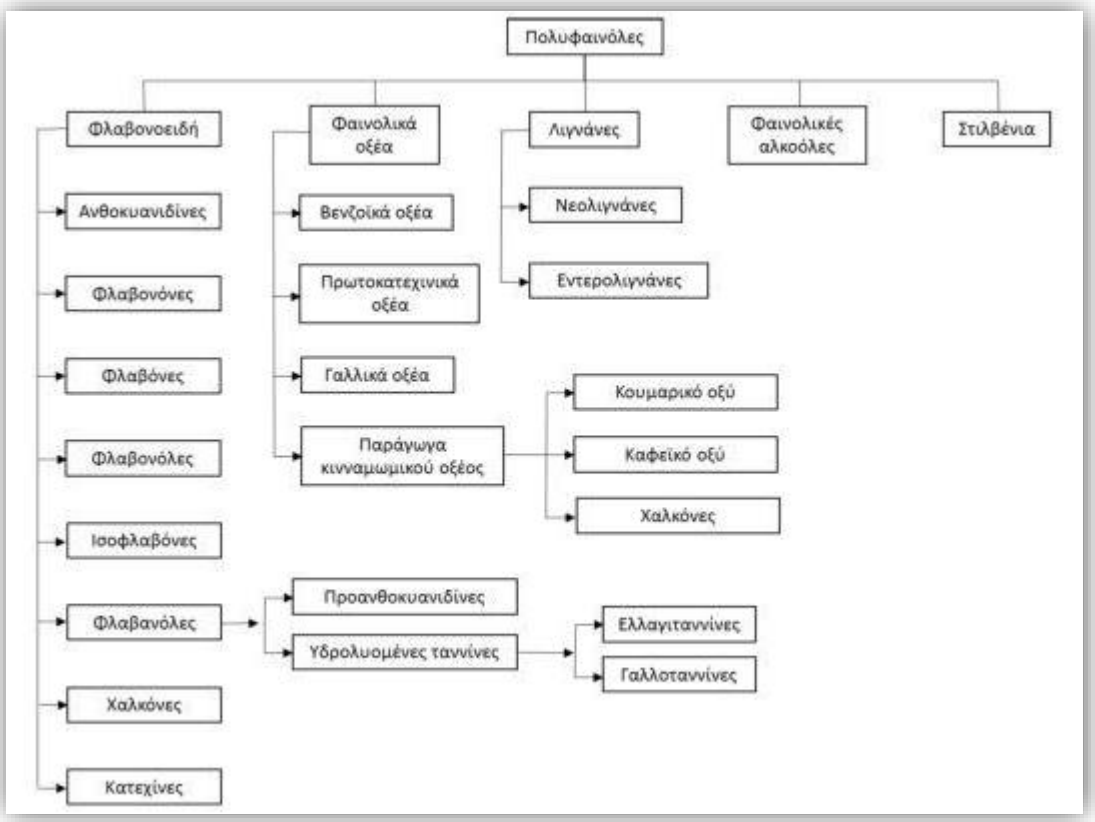
(και συγκεκριμένα στη Σικελία), το τριαντάφυλλο *R. Canina L.* ενώ μεγαλώνει φυσικά, χρησιμοποιείται κυρίως ως διακοσμητικό ή ως ρίζωμα για την καλλιέργεια άλλων ειδών και ποικιλιών (Fascella et al., 2019)

2.1 Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από βενζολικούς δακτυλίους που περιέχουν ένα ή περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίου, και σχηματίζουν από απλά φαινολικά μόρια έως περίπλοκα πολυμερισμένες ενώσεις. Παράγονται από το σικιμικό οξύ και τις φωσφορικές πεντόζες του φυτού μέσω του μονοπατιού του φαινυλοπροπανοειδούς. Αυτές οι ενώσεις, που είναι γνωστές και ως πολυφαινόλες, είναι οι ενώσεις που συναντιούνται πιο συχνά στα φυτά και χωρίζονται σε υποκατηγορίες ενώσεων όπως: απλά φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, σύνθετα φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες (Εικόνα 5, Εικόνα 6) (Lin et al., 2016), (Κυριακοπούλου, 2016). Οι πιο συχνά απαντώμενες μορφές φαινολικών ενώσεων είναι αυτές που προέρχονται από την σύζευξη φαινολικών μονοσακχαριτών και πολυσακχαριτών. Αυτή η σύζευξη έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ποικιλίας στις δομές των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες χωρίζονται σε τάξεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, με τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τις τανίνες να θεωρούνται τα κυριότερα (Πίνακας 2) (Balasundram et al., 2006).

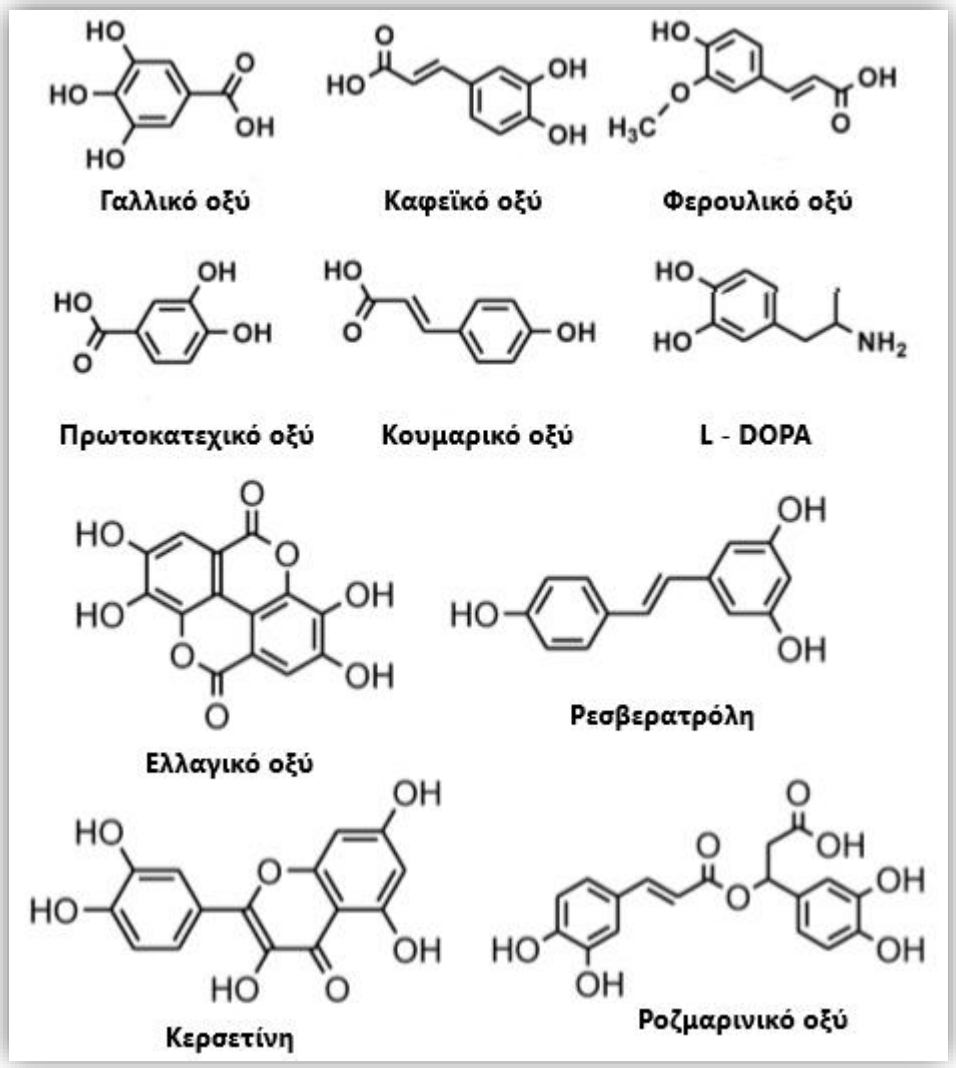
Πίνακας 2. Τάξεις φαινολικών ενώσεων που συναντώνται στα φυτά

Τάξη	Δομή
Απλά φαινολικά, βενζοκινόνες	C_6
Υδροξυ-βενζοϊκά οξέα	$C_6 – C_1$
Ακετοφαινόνες, φαινυλοξεϊκά οξέα	$C_6 – C_2$
υδροξυκιναμικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή (κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, χρωμένια)	$C_6 – C_3$
Ναφθοκινόνες	$C_6 – C_4$
Ξανθόνες	$C_6 – C_1 – C_6$
Στιλβένια, ανθρακινόνες	$C_6 – C_2 – C_6$
Φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή	$C_6 – C_3 – C_6$
Λιγνάνες, νεολιγνάνες	$(C_6 – C_3)_2$
Διφλαβονοειδή	$(C_6 – C_3 – C_6)_2$
Λιγνίνες	$(C_6 – C_3)_n$
Συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανιδίνες ή φλαβολάνες)	$(C_6 – C_3 – C_6)_n$



Εικόνα 5. Κατηγοριοποίηση των πολυφαινολών στα κυριότερα παράγωγά τους

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ικανότητα προσαρμογής των φυτών στο φυσικό τους περιβάλλον, καθώς σχετίζονται με αμυντικές αποκρίσεις των φυτών (Lin et al., 2016), ενώ η ποιοτική και ποσοτική σύστασή τους επηρεάζεται, εκτός άλλων, από το είδος του φυτού και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Ouerghemmi et al., 2016). Επιπρόσθετα, οι διαφοροποιήσεις που υπάρχουν όσον αφορά το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη των φυτών, οφείλονται στην πολυπλοκότητα αυτών των ενώσεων αλλά και στον τρόπο εκχύλισής τους (Balasundram et al., 2006). Παράλληλα, οι ενώσεις αυτές σχετίζονται και με άλλες ευεργετικές επιδράσεις στα φυτά, όπως είναι ο χρωματισμός τους για καμουφλάζ και άμυνα κατά των φυτοφάγων, με αντιβακτηριακές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες, καθώς και την επιτάχυνση της επικονίασης μέσω της απόδοσης ελκυστικών ουσιών για τους επικονιαστές (Lin et al., 2016).



Εικόνα 6. Κοινές φαινολικές ενώσεις στα φυτά που αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίου.

2.1.1 Φαινολικές ενώσεις στον καρπό

Ο καρπός του *Rosa Canina L.* , έχει αποδειχθεί ότι περιέχει αρκετούς δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως φαινολικά οξέα, προανθοκυανιδίνες, ελλαγιτανίνες, μικρή ποσότητα σε φλαβανόλες, φλαβονόλες, καροτενοειδή (Jang et al., 2008), τανίνες και ανθοκυανίνες (Koczka et al., 2018).

Στους καρπούς, το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις επηρεάζεται από τον γενότυπο του φυτού, την περιοχή καλλιέργειάς του, αλλά και τη φάση ωρίμανσης στην οποία αυτό βρίσκεται. Πολύ σημαντικό ρόλο επίσης στο συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, παίζει και ο τρόπος εκχύλισης που χρησιμοποιείται (Demir et al., 2014).

Ορισμένες έρευνες (Tumbas et al., 2012, Hosni et al., 2010) έχουν δείξει ότι οι κύριες φαινολικές ενώσεις στον καρπό του *Rosa Canina L*. είναι η κερσετίνη και το ελλαγικό οξύ, ενώ άλλες (Olsson et al., 2004) αναφέρουν την κερσετίνη και την κατεχίνη ως κύρια συστατικά σε είδη τριαντάφυλλου που δεν υπάρχει ελλαγικό οξύ ή καμφερόλη.

2.1.2 Αντιοξειδωτική δράση και ιδιότητες φαινολικών ενώσεων

Η βιοδραστικότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τη δομή τους, την σύζευξή τους με άλλες φαινολικές ενώσεις, και τη διαλυτότητά τους (Balasundram et al., 2006).

Οι πολυφαινόλες σχετίζονται με πολύ ευνοϊκές επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία, οι οποίες οφείλονται στην υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, να προσφέρουν άτομα υδρογόνου, ηλεκτρόνια, ή χηλικα κατιόντα μετάλλου (Afanas'ev et al., 1989). Σύμφωνα με έρευνα των Balasundram et al., 2006, κύρια πηγή φαινολικών ενώσεων στον άνθρωπο, αποτελούν τα φυτά και τα φρούτα. Έρευνες επίσης δείχνουν ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι οι πιο άφθονες ανάμεσα στις αντιοξειδωτικές ουσίες που λαμβάνει ο άνθρωπος στην καθημερινή του διατροφή (Lin et al., 2016).

Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλο εύρος ευεργετικών ιδιοτήτων όπως αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιθρομβωτικές, αντιοξειδωτικές, αλλά και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (Panche et al., 2016).

2.1.3 Φλαβονοειδή

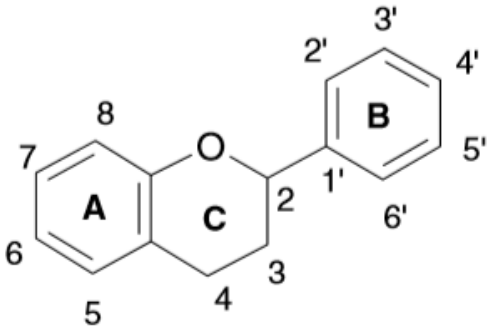
Τα φλαβονοειδή όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν υποκατηγορία φαινολικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα που διατάσσονται στη μορφή $C_6 – C_3 – C_6$ (Balasundram et al., 2006). Αποτελούν την πιο ευρεία κατηγορία φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 6.500 φλαβονοειδή (Samanta et al., 2011).

Απαρτίζονται από δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B οι οποίοι ενώνονται μέσω ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου C (Εικόνα 7). Ανάλογα με τον άνθρακα που συνδέει τον δακτύλιο B με τον C και με το βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου C, τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε υποομάδες (Balasundram et al., 2006). Όταν ο δακτύλιος B συνδέεται με τον C στη θέση 3, το

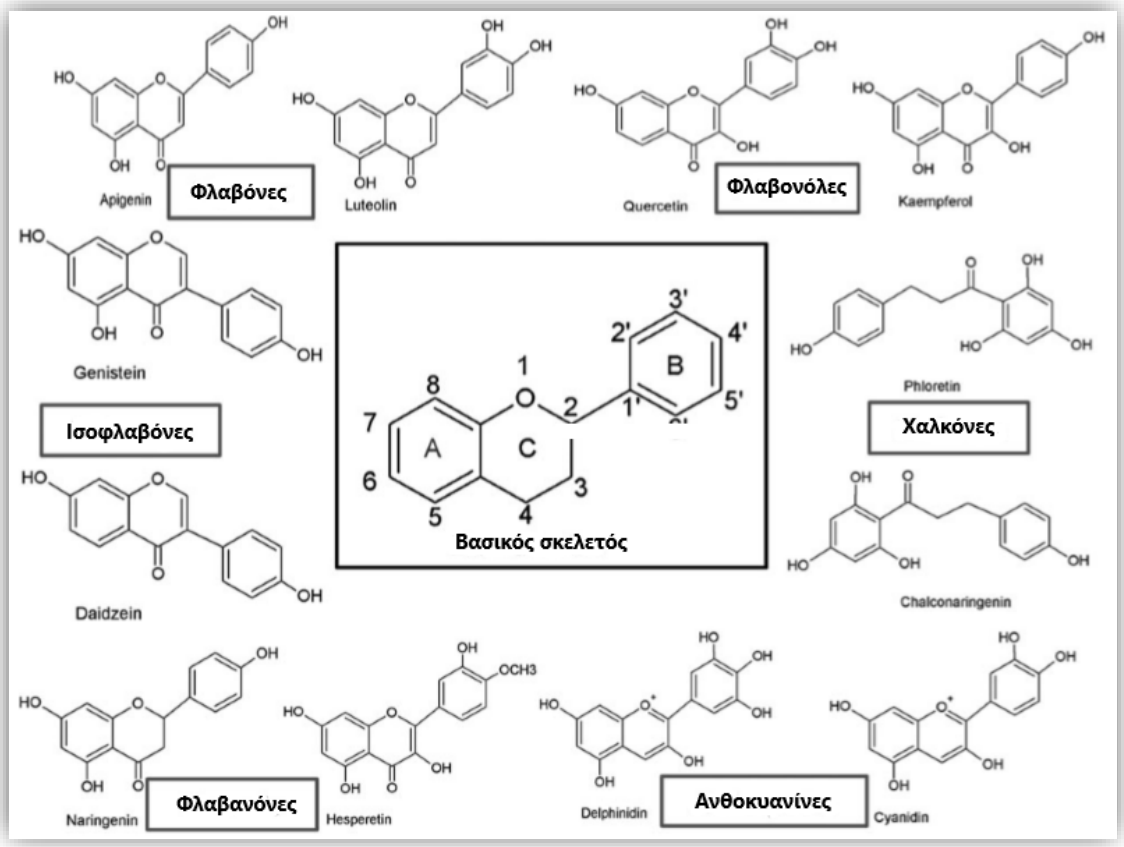
φλαβονοειδές καλείται ισοφλαβονοειδές. Αντίστοιχα, όταν οι δύο δακτύλιοι συνδέονται στη θέση 4, ονομάζεται νεοφλαβονοειδές. Όταν οι δύο δακτύλιοι ενώνονται στη θέση 2, το φλαβονοειδές χωρίζεται σε περεταίρω κατηγορίες ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά του C δακτυλίου. Οι υποομάδες αυτές είναι οι εξής:

- Χαλκόνες
- Φλαβόνες
- Φλαβονόλες
- Φλαβανόνες
- Φλαβανόλες ή κατεχίνες
- Φλαβονονόλες
- Ανθοκυανίνες
- Ισοφλαβόνες

Οι γενικές δομές των κυριότερων ομάδων των φλαβονοειδών φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 8). Η παρουσία σακχάρων και ομάδων υδροξυλίου καθιστούν το μόριο του φλαβονοειδούς υδατοδιαλυτό, ενώ η παρουσία μεθυλομάδων το καθιστά λιπόφιλο (Samanta et al., 2011).



Εικόνα 7. Γενική δομή ενός μορίου φλαβονοειδούς



Εικόνα 8. Γενικές δομές των κυριότερων υποομάδων των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο όσον αφορά την αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον του, καθώς απορροφούν την UV ακτινοβολία η οποία προκαλεί βλάβες στα κύτταρα, λειτουργώντας έτσι ως φίλτρα UV. Επίσης είναι υπεύθυνα για την πρόσδοση χρώματος και αρώματος στα φυτά. Έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και συμβάλλουν στην άμυνα κατά του παγετού και της ξηρασίας (Panche et al., 2016).

Τα φλαβονοειδή χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών για καλλυντική και φαρμακευτική χρήση. Αυτό οφείλεται στην αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινογόνο ιδιότητά τους, συνδυασμένη με την ικανότητά τους να ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες. Εκτός των άλλων διαθέτουν εντομοκτόνο δράση, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για τη χρήση τους ως εντομοκτόνα.

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες αλλά και εμποδίζουν το σχηματισμό αυτών, είναι αυτή που τους προσδίδει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση. Ως εκ τούτου τα φλαβονοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε φάρμακα κατά του οξειδωτικού στρες (Panche et al., 2016).

Έρευνες δείχνουν ότι τα φλαβονοειδή αναμένεται να χρησιμοποιηθούν σε φάρμακα για τη καταπολέμηση ασθενειών που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες, όπως ισχαιμία, αναιμία, αρθρίτιδα, αμιάντωση. Ο λόγος είναι ότι τα φλαβονοειδή είναι μη τοξικές φυσικές ενώσεις που διαθέτουν αντιοξειδωτικές (κατά των ελευθέρων ριζών) και χηλικές ιδιότητες. (Afanas'ev et al., 1989).

2.1.4 Τανίνες

Οι τανίνες αποτελούν υποκατηγορία των φαινολικών ενώσεων. Είναι υδατοδιαλυτά μόρια σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους που κυμαίνεται από 300 έως 3000. Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ικανότητά τους να υδρολύονται ή όχι υπό την παρουσία ζεστού νερού ή του ενζύμου τανάση :

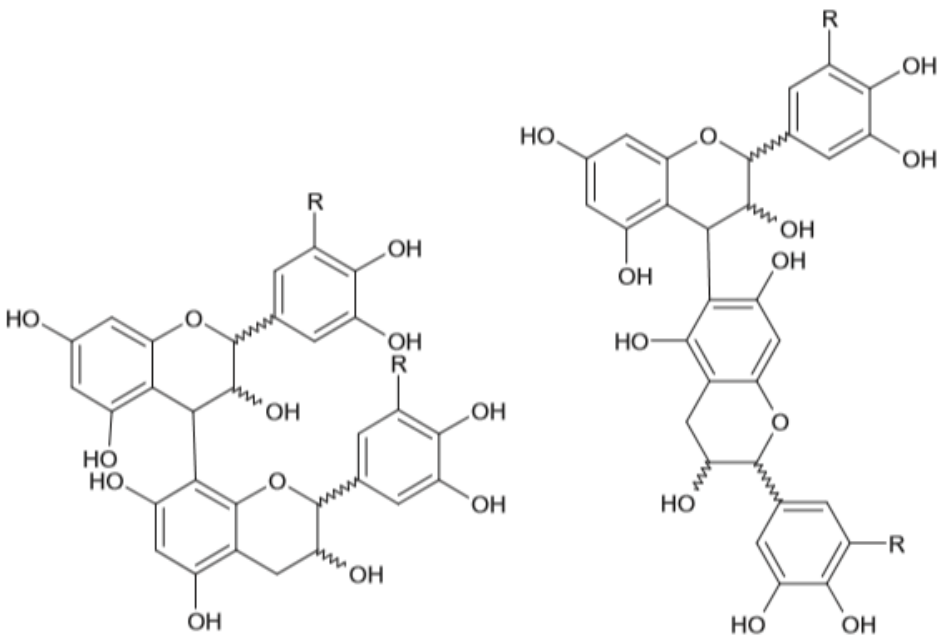
- Υδρολύσιμες τανίνες
- Μη υδρολύσιμες ή συμπυκνωμένες τανίνες

Οι υδρολύσιμες τανίνες είναι εστέρες του γαλλικού και του εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος, (οι οποίες ονομάζονται γαλλο- και ελλαγι-τανίνες), ενώ οι συμπυκνωμένες τανίνες (επίσης γνωστές ως προανθοκυανιδίνες), είναι πολυμερή του μονομερούς πολυυδροξυ φλαβαν-3-όλη.

Τα τελευταία χρόνια οι τανίνες τείνουν να χωρίζονται ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά τους σε 4 κατηγορίες:

- Γαλλοτανίνες
- Ελλαγιτανίνες
- Σύνθετες τανίνες
- Συμπυκνωμένες τανίνες ή προανθοκυανιδίνες

Όσον αφορά τις συμπυκνωμένες τανίνες, είναι γνωστό ότι σχηματίζονται από το δεσμό μεταξύ του άνθρακα 4 της κατεχίνης με τον άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 8 ή 6 του επόμενου μορίου κατεχίνης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Προανθοκυανιδίνη με σύνδεση του C4 και C8 (αριστερά) και προανθοκυανιδίνη με σύνδεση του άνθρακα C4 και C6 (δεξιά)

Οι τανίνες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε πολλά μέρη των φυτών, ενώ συχνά, η αυξημένη παραγωγή τους μπορεί να είναι ένδειξη ασθένειας του φυτού. Ως εκ τούτου, ο ρόλος των τανίνων στα φυτά σχετίζεται με την προστασία τους εναντίον επικείμενης μικροβιακής μόλυνσης αλλά και εντόμων και ζώων (Sieniawska et al., 2017).

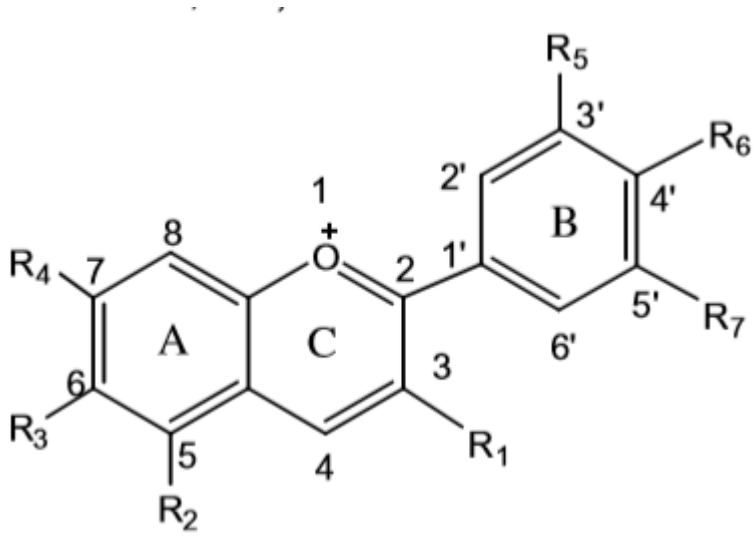
Έρευνες δείχνουν ότι οι τανίνες μπορούν να αποδειχτούν χρήσιμες για την αντιμετώπιση μολύνσεων και τραυματισμών του δέρματος, αλλά και για την πρόληψη από την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών. Είναι βιοδραστικές είτε ως απορροφήσιμες, είτε ως μη απορροφήσιμες. Οι απορροφήσιμες τανίνες έχουν συνήθως χαμηλό μοριακό βάρος και έχουν ευεργετική επίδραση σε διάφορα όργανα του σώματος. Οι μη απορροφήσιμες τανίνες είναι πιο πολύπλοκες δομές και έχουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιϊική, και αντιμεταλλαξιογόνο επίδραση στη γαστρεντερική οδό. Οι τανίνες παρουσιάζουν επίσης καρδιοπροστατευτικές, κυτταροτοξικές, αντιδιαβητικές, αντιπαχυσαρκικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Serrano et al., 2009).

2.1.5 Ανθοκυανίνες και καροτενοειδή

Οι ανθοκυανίνες και τα καροτενοειδή ανήκουν στις πιο γνωστές χρησιμοποιούμενες φυσικές χρωστικές. Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά και προσδίδουν στα φυτά χρωματισμούς που κυμαίνονται από κίτρινο έως κόκκινο. Οι ανθοκυανίνες από τη

άλλη, είναι υδατοδιαλυτές και λιγότερο σταθερές από τα καροτενοειδή, ενώ προσδίδουν χρωματισμούς από ροζ μέχρι μπλε.

Την βασική δομή των ανθοκυανίνων αποτελούν οι ανθοκυανιδίνες οι οποίες σχηματίζονται από έναν αρωματικό δακτύλιο A, συνδεδεμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο C που περιέχει οξυγόνο, και ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με τρίτο αρωματικό δακτύλιο μέσω δεσμού C-C (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Βασική δομή ανθοκυανίνης

Τα καροτενοειδή αποτελούνται από μια αλυσίδα άνθρακα η οποία περιέχει εναλλασσόμενους απλούς και διπλούς δεσμούς, ενώ στα άκρα της συνδέονται κυκλικά και άκυκλα μόρια. Διακρίνονται στα καροτένια και τις ξανθοφύλλες ανάλογα με τη χημική τους σύσταση. Τα μεν καροτένια αποτελούνται μόνο από άτομα άνθρακα και υδρογόνου, ενώ οι δε ξανθοφύλλες περιέχουν τουλάχιστον ένα μόριο οξυγόνου. Έχει αποδειχθεί ότι τα καροτενοειδή δρουν ενάντια σε αρκετά είδη καρκίνου, και προστατεύουν το δέρμα από την ηλιακή ακτινοβολία. Παρόλα αυτά πρέπει να αναφερθεί ότι ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει καροτενοειδή γι' αυτό πρέπει να τα παραλάβει μέσω της τροφής του (Stahl et al., 2005).

Οι ανθοκυανίνες και τα καροτενοειδή κατέχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά και αντιδιαβητικά, όσο και κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι οι ανθοκυανιδίνες και οι ανθοκυανίνες κατέχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις βιταμίνες C και E (Castañeda-Ovando et al., 2009).

2.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu, αποτελεί την πιο απλή μέθοδο για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων σε ένα δείγμα. Το αντιδραστήριο αυτό είναι πολύ σταθερό αν δεν ανηχθεί, ακόμα κι όταν αραιωθεί, υπό την προϋπόθεση ότι προστατεύεται από το φως, καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Το Folin-Ciocalteu (F-C) αποτελεί μείγμα μολυβδαινικού νατρίου, βολφραμικού νατρίου και άλλων αντιδραστηρίων όπου το μολυβδαίνιο και το βολφράμιο βρίσκονται στην κατάσταση οξείδωσης 6^+. Κατά την αντίδραση του (F-C) με ένα αναγωγικό, σχηματίζονται το μπλε μολυβδαίνιο και το μπλε βολφράμιο με μέση οξειδωτική κατάσταση 5 έως 6.

$$Na_2WO_4 \ \therefore Na_2MO_4 \ (\text{κίτρινα}) \rightarrow (phenol - MoWO_{11}O_{40})^{-4} \ (\mu\pi\lambda\varepsilon)$$

$$MO^{+6} \ (\kappa\acute{\iota}\tau\rho\iota\nu o) + \ e^{-1} \ \rightarrow \ MO^{+5} \ (\mu\pi\lambda\varepsilon)$$

$$MO^{+5} \ + \ e^{-1} \ \rightarrow \ MO^{+4} \ (\mu\pi\lambda\varepsilon)$$

Η παραπάνω αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH και γρηγορότερη σε βασικό, ενώ χαρακτηρίζεται από ακρίβεια και ευαισθησία, αλλά έλλειψη εξειδίκευσης. Προκειμένου να γίνει βελτίωση της μεθόδου σε όξινο pH, γίνεται χρήση ανθρακικού ασβεστίου Na_2CO_3. Επίσης, προκειμένου η μέθοδος να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως η σωστή αναλογία όγκου, ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης, η κατάλληλη θερμοκρασία για τον σχηματισμό χρώματος και η χρήση μιας πολυφαινολικής ουσίας που θα χρησιμεύσει ως ουσία αναφοράς. Η απορρόφηση λαμβάνεται σε μήκος κύματος λ=750 nm μετά το πέρας μισής έως δύο ωρών από την έναρξη της αντίδρασης (A Agbor et al., 2014).

2.3 Μέθοδος Χλωριούχου αργιλίου για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

Η πιο κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών ενώσεων σε φυτικά δείγματα, είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση που βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου των φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο $AlCl_3$. Αυτή η αντίδραση συμπλοκοποίησης λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον υπό την παρουσία νιτρώδους νατρίου $NaNO_2$ και βασίζεται στη νίτρωση οποιουδήποτε αρωματικού δακτυλίου που φέρει μια ομάδα κατεχόλης, της οποίας οι τρείς ή τέσσερις θέσεις δεν είναι υποκατεστημένες ή παρεμποδισμένες από εστέρες. Μετά την προσθήκη του Al^{+3}, σχηματίζεται ένα κίτρινο σύμπλοκο το οποίο γίνεται κόκκινο αμέσως μετά την

προσθήκη του $NaNO_2$, ενώ η απορρόφηση μετράται σε μήκος κύματος λ=510 nm. Για τη συγκεκριμένη μέθοδο η κατεχίνη επιλέγεται ως το κύριο συστατικό για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος (Pękal et al., 2014).

Σημαντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο σε αυτή τη μέθοδο είναι η συγκέντρωση του μέσου συμπλοκοποίησης, το pH του συστήματος, η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάπτυξης της αντίδρασης συμπλοκοποίησης και χρωματισμού του συμπλόκου (Liu et al., 2017).

Κεφάλαιο 3: Μέθοδοι εκχύλισης

Όπως προαναφέρθηκε, οι βιοδραστικές ενώσεις που παραλαμβάνονται από φυτά, χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων. Τα αρχικά βήματα για τη παραλαβή και τη χρήση μίας βιοδραστικής ένωσης σε τέτοια προϊόντα είναι τα εξής (Tradit et al., 2007):

- Εκχύλιση
- Φαρμακολογικός έλεγχος
- Απομόνωση
- Χαρακτηρισμός της βιοδραστικής ένωσης
- Τοξικολογική αξιολόγηση
- Κλινική αξιολόγηση

Είναι υψίστης σημασίας η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης των βιοδραστικών συστατικών των φυτών, καθώς πρέπει μετέπειτα να γίνει ανάλυση της δομής τους. Οι δύο παράγοντες με βάση τους οποίους γίνεται η επιλογή της κατάλληλης διαδικασίας εκχύλισης είναι η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της εκάστοτε βιοδραστικής ένωσης (Ajila et al., 2011). Ορισμένοι επιπλέον παράγοντες με βάση τους οποίους επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική εκχύλισης είναι ο διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος (Azmir et al., 2013). Για παράδειγμα, για την εκχύλιση υδρόφιλων ενώσεων, γίνεται χρήση πολικών διαλυτών όπως μεθανόλη, αιθανόλη ή οξικός αιθυλεστέρας. Αντίθετα, για την εκχύλιση λιπόφιλων ενώσεων γίνεται χρήση διαλυτών όπως δι-χλωρομεθάνιο, ή μίξη δι-χλωρομεθάνιου/μεθανόλης με αναλογία 1:1. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, γίνεται χρήση εξανίου ως διαλύτη, προκειμένου να γίνει απομάκρυνση της χλωροφύλλης (Tradit et al., 2007).

Η εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων, που αναφέρεται και ως «μέθοδος προετοιμασίας του δείγματος», αποτελεί το πρώτο βήμα για την επεξεργασία των φαρμακευτικών φυτών και είναι μείζουσας σημασίας, καθώς πρέπει οι ενώσεις αυτές να παραλαμβάνονται καθαρές (Yahya et al., 2018, Azmir et al., 2013). Αν δεν γίνει σωστά η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης, υπάρχει κίνδυνος το προϊόν να παραληφθεί μαζί με άλλα παραπροϊόντα, οδηγώντας έτσι σε παρερμηνεία της τελικής ανάλυσης δομής που ακολουθεί μετά την εκχύλιση (Tradit et al., 2007).

Πριν την κύρια διαδικασία της εκχύλισης, ακολουθούν κάποια απαραίτητα βήματα όπως πρώιμο πλύσιμο του υλικού, ξήρανση και άλεση προκειμένου το δείγμα να είναι όσο πιο ομογενές γίνεται. Η άλεση του δείγματος στοχεύει επίσης στην αύξηση της επιφάνειας του δείγματος που έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απόδοση της εκχύλισης (Tradit et al., 2007).

3.1 Κατηγοριοποίηση των μεθόδων εκχύλισης

Οι τεχνικές εκχύλισης μπορούν να χαρακτηριστούν ως παραδοσιακές (συμβατικές) ή μοντέρνες (μη συμβατικές).

3.1.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Στην κατηγορία των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης ανήκουν οι εξής μέθοδοι (Yahya et al., 2018):

- Εκχύλιση υγρού-υγρού (*Liquid-liquid Extraction – LLE*)
- Εκχύλιση στερεού-υγρού (*Solid-liquid Extraction – SLE*)
  [Υποκατηγορία της εκχύλισης στερεού-υγρού αποτελεί και η εκχύλιση σε συσκευή *Soxhlet*.]
- Μικρο-εκχύλιση στερεής φάσης (*Solid-Phase Micro-Extraction – SPME*)

Στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης πρέπει ο διαλύτης που χρησιμοποιείται να είναι ίδιας πολικότητας με την ένωση ενδιαφέροντος, προκειμένου αυτή να διαλυθεί πλήρως. Αυτό συμβαίνει γιατί διαλύματα με διαφορετική πολικότητα διαλύτη-διαλυμένης ουσίας, μπορεί να απαιτούν διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης καθώς η πολικότητά τους αλλάζει από μη πολική σε πολική ή είναι θερμικά ασταθή.

Ως εκ τούτου και σύμφωνα με τα παραπάνω, για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών είναι απαραίτητη η χρήση πολικών διαλυτών με χαμηλά σημεία βρασμού όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη ή μίγματα αυτών με νερό σε διάφορες αναλογίες. Επομένως τέτοιοι διαλύτες είναι κατάλληλοι για την εκχύλιση πολικών και ημι-πολικών ενώσεων (Sciences & Lumpur, 2017, Altemimi et al., 2017).

3.1.1.1 Εκχύλιση στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μία από της πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και εύκολες τεχνικές για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων όπως οι φαινολικές ενώσεις (Majors, 2011). Χρησιμοποιείται για την εκχύλιση συστατικών μέσω ενός διαλύτη ή και μίγμα διαλυτών και περιλαμβάνει (Κυριακοπούλου, 2016,Prado et al., 2015):

1. Τη διείσδυση του διαλύτη στη στερεά μάζα
2. Τη διαλυτοποίηση των ενώσεων

3. Την κίνηση του διαλύματος από το εσωτερικό της στερεάς μάζας στην επιφάνειά του
4. Την μετακίνηση των εκχυλισμένων ενώσεων από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού προς τον κύριο όγκο του διαλύματος, και τέλος
5. Το διαχωρισμό του εκχυλίσματος από το διαλύτη.

Γενικά, η εκχύλιση στερεού-υγρού των πολυφαινολών, αποτελείται από τη άμεση εκχύλιση φρέσκου, κατεψυγμένου ή αποξηραμένου φυτικού υλικού σε κατάλληλο διαλύτη για συγκεκριμένο χρόνο (Ajila et al., 2011). Γενικά ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου ο διαλύτης να επιδράσει με το στερεό είναι πολύ σημαντικός για την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών και εξαρτάται όχι μόνο από τη διαλυτότητά τους αλλά και από τη θερμοκρασία της εκχύλισης, την επιφάνεια του στερεού υλικού, το ιξώδες και τη ροή του διαλύτη (Κυριακοπούλου, 2016). Είναι μια πολυφασική διαδικασία που αποτελείται από μεταφορά μάζας σε μη μόνιμες-συνθήκες, καθώς κατά την εκχύλιση η συγκέντρωση του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας μεταβάλλονται διαρκώς. Οι φαινολικές ενώσεις των φυτών μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με άλλες ενώσεις όπως με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητά τους. Το γεγονός ότι τα φυτά περιέχουν από απλά φαινολικά έως υψηλού βαθμού πολυμερισμένες αλυσίδες, όπως είναι οι τανίνες, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη τεχνική για την εκχύλιση όλων αυτών των ενώσεων μαζί, αλλά ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης και τις συνθήκες που επιλέγονται, δίνεται έμφαση σε μία συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων (Ajila et al., 2011).

Αξίζει να αναφερθεί ότι πολύ μεγάλος χρόνος εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση των φαινολικών ενώσεων, εκτός και αν προστεθούν στο σύστημα της εκχύλισης ουσίες που μειώνουν τα φαινόμενα της οξείδωσης (Ajila et al., 2011). Παράλληλα, σημαντικό ρόλο εκτός από τα προαναφερθέντα, παίζει και η αναλογία διαλύτη/στερεού (Prado et al., 2015, Ajila et al., 2011). Όπως προαναφέρθηκε, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη γίνεται με βάση:

- Την πολικότητα και την διαλυτότητα της ουσίας ενδιαφέροντος
- Τη δυνατότητα απομάκρυνσής του, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων αυτού στο τελικό εκχύλισμα
- Τη δυνατότητα ανακύκλωσης/ανάκτησής του, για οικονομικούς λόγους
- Την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του, καθώς πρέπει να μπορεί να διαπερνάει τους πόρους του στερεού και να ρέει εύκολα
- Τη διαβρεξιμότητά του, για τον ίδιο ακριβώς λόγο, και τέλος
- Τις υπόλοιπες ιδιότητές του, καθώς πρέπει να είναι μη τοξικός, σταθερός (χημικά και θερμικά), μη αντιδραστικός, μη διαβρωτικός, μη εύφλεκτος, ασφαλής προς το περιβάλλον και οικονομικά προσιτός.

Αντίστοιχα, η αναλογία διαλύτη/στερεού αλλά και το μέγεθος των σωματιδίων πρέπει να μελετάται ανάλογα το υλικό (Prado et al., 2015).

Η εκχύλιση στερεού/υγρού σε διαλύτες αποτελεί μία από της πιο γρήγορες και εύκολες τεχνικές εκχύλισης. Παρόλα αυτά ορισμένες φορές γίνεται χρήση τοξικών διαλυτών, απαιτείται εξάχνωση ή συμπύκνωση για την απομάκρυνση του διαλύτη, ενώ απαιτούνται και μεγάλες ποσότητες διαλύτη (Kumar et al., 2017).

3.1.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Στην κατηγορία των μοντέρνων μεθόδων εκχύλισης ανήκουν οι εξής (Yahya et al., 2018):

- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (*Ultrasound-Assisted Extraction – UAE*)
- Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (*Pressurized Liquid Extraction – PLE*)
- Εκχύλιση με υποκρίσιμο νερό (*Subcritical Water Extraction – SWE*)
- Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (*Supercritical Fluid Extraction – SFE*)
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (*Microwave-Assisted Extraction - MAE*)
- Εκχύλιση με άμεσα ελεγχόμενη πτώση πίεσης (*Instant Controlled Pressure Drop Extraction – DIC*)

Οι μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης έχουν αρχίσει να ανακαλύπτονται τα τελευταία χρόνια και θεωρούνται πιο φιλικές προς το περιβάλλον καθώς χρησιμοποιούν λιγότερα συνθετικά και οργανικά χημικά, μειώνουν το χρόνο εκχύλισης και έχουν καλύτερη απόδοση οδηγώντας στην παραλαβή τελικού προϊόντος καλύτερης ποιότητας (Azmir et al., 2013). Επιπρόσθετα οι μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών καθώς δεν απαιτούν ακριβούς και μεγάλης καθαρότητας διαλύτες οι οποίοι εξατμίζονται εύκολα, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος της διεργασίας (Azmir et al., 2013).

3.1.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave – Assisted Extraction)

Η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (MAE), συνδυάζει τα μικροκύματα με την κλασική εκχύλιση διαλυτών (Kumar et al., 2017) και χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά (Anokwuru et al., 2011). Αποτελεί μία από τις γρηγορότερες μεθόδους εκχύλισης και έχει υψηλή αποδοτικότητα, ενώ καταναλώνει λιγότερο διαλύτη για θερμοευαίσθητα συστατικά

(Ajila et al., 2011). Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία των μικροκυμάτων εκπέμπει σε συχνότητες μεταξύ 300 MHz και 300 GHz, και σε μήκος κύματος μεταξύ 1 cm και 1 m. Τα μικροκύματα αυτά εκπέμπουν και ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο τα οποία είναι κάθετα μεταξύ τους. Τα συνήθη όργανα που χρησιμοποιούν μικροκύματα εκπέμπουν σε συχνότητα 2450 MHz, καταναλώνοντας ενέργεια 600–700 Watts (Altemimi et al., 2017). Η βασική αρχή λειτουργίας της ΜΑΕ, είναι η άμεση επίδραση που έχουν τα μικροκύματα στα μόρια της ένωσης, τα οποία προκαλούν την κίνηση αυτών μέσω ιοντικής αγωγιμότητας και περιστροφής των διπόλων (Ajila et al., 2011). Ως εκ τούτου προκαλούν θέρμανση της μήτρας εσωτερικά και εξωτερικά χωρίς την ύπαρξη βαθμίδας θερμοκρασίας, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης, καθώς απαιτείται λιγότερη ενέργεια και ποσότητα διαλυτών (Yahya et al., 2018). Πολικά μόρια όπως οι πολυφαινόλες απορροφούν μεγάλη ποσότητα μικροκυμάτων που προκαλεί την απότομη και γρήγορη αύξηση της θερμοκρασίας τους. Η εκχύλιση με μικροκύματα οδηγεί στην εκρόφηση της ουσίας ενδιαφέροντος από τη μήτρα του φυτού, μέσω της θέρμανσης των μορίων του νερού η οποία οδηγεί σε απότομη διαστολή και εν τέλει θραύση των τοιχωμάτων (Ajila et al., 2011). Ως εκ τούτου η εκχύλιση με μικροκύματα έχει τρείς φάσεις (Yahya et al., 2018):

1. Η διαλυμένη ουσία διαχωρίζεται από τη μήτρα του δείγματος λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας και της πίεσης,
2. Ο διαλύτης εισέρχεται μέσα στη μήτρα του δείγματος και τέλος,
3. Η διαλυμένη ουσία μεταφέρεται από τη μήτρα του δείγματος στον διαλύτη.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα μπορεί να χωριστεί σε τρείς υποκατηγορίες, ενώ υπάρχουν μόνο δύο τύποι δοχείων στα οποία μπορεί να διεξαχθεί· τα κλειστά και τα ανοιχτά δοχεία. Οι τρείς κατηγορίες στις οποίες χωρίζεται η ΜΑΕ είναι οι εξής (Yahya et al., 2018):

- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με τη χρήση διαλυτών (*Microwave-Assisted Solvent Extraction – MASE*)
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα χωρίς τη χρήση διαλυτών (*Solvent-Free Microwave Extraction – SFME*)
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε συνδυασμό με υδρο-διάχυση και βαρύτητα (*Microwave xtraction combining Hydro-diffusion and Gravity – MHG*)

Οι φυσικές παράμετροι που παίζουν ρόλο στη ΜΑΕ είναι η διαλυτότητα, η διηλεκτρική σταθερά και οι παράγοντες διασποράς. Διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά και πολικοί διαλύτες, οι οποίοι απορροφούν μεγαλύτερα ποσά ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας που προέρχεται από τα μικροκύματα, θεωρούνται καλύτεροι και πιο αποτελεσματικοί από μη πολικούς. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη ΜΑΕ, πρέπει εκτός από μεγάλη διηλεκτρική σταθερά να έχουν και υψηλούς παράγοντες διασποράς (Ajila et al., 2011). Άλλοι παράγοντες που

παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση με μικροκύματα, εκτός από τα φυσικά χαρακτηριστικά του διαλύτη, είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης. Αύξηση της θερμοκρασίας πέραν της βέλτιστης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση (Altemimi et al., 2017).

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η MAE έχει και ορισμένα μειονεκτήματα με κυριότερο το υψηλό κεφαλαιουχικό κόστος (Ajila et al., 2011). Ορισμένες φορές μπορεί να χρειαστεί το δείγμα πριν την εκχύλισή του με μικροκύματα να φυγοκεντρηθεί ή και να φιλτραριστεί προκειμένου να απομακρυνθούν στερεά κατάλοιπα. Επιπρόσθετα, η MAE έχει ορισμένους περιορισμούς που αφορούν την αλλοίωση της δομής της ουσίας του ενδιαφέροντος αλλά και την ανάκτηση μη πολικών ενώσεων (Yahya et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, η σχετικά υψηλή θερμοκρασία (100 – 150 ˚C) που είναι απαραίτητη στην MAE, μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα όταν αυτή χρησιμοποιείται για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών (Sciences & Lumpur, 2017).

3.2 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

Η απαίτηση για νέες και καινοτόμες φυσικές ενώσεις έχει οδηγήσει, όπως προαναφέρθηκε, στην ανάπτυξη τεχνικών που στοχεύουν στη μεγαλύτερη δυνατή ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από φυσικές πηγές όπως τα φυτά. Οι τεχνικές αυτές οδηγούν στην διάσπαση των φυτικών κυττάρων και στην εκχύλιση των ουσιών ενδιαφέροντος μέσω του κυτταρικού τοιχώματος, και μπορούν να βελτιστοποιηθούν με τη χρήση ενζυμικών παρασκευασμάτων που περιέχουν είτε μόνο ένα ενζυμικό διάλυμα είτε μίγμα ενζύμων (Puri et al., 2012). Εκτός από τις διαλυτές ενώσεις που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα, υπάρχουν και κάποιες που είναι δεσμευμένες σε αυτό και είναι δύσκολο να εκχυλιστούν με την χρήση εκχύλισης διαλυτών. Η ύπαρξη πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα μειώνει την απόδοση της εκχύλισης με την κλασική εκχύλιση διαλυτών, γι’ αυτό απαιτείται η χρήση πιο εξειδικευμένης μεθόδου εκχύλισης όπως αυτή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (Nadar et al., 2018). Η μέθοδος αυτή έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να έχει όλο και μεγαλύτερη ζήτηση καθώς θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον, ενώ αποτελεί και καλύτερη εναλλακτική λύση έναντι των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με διαλύτες. Η χρήση ενζύμων στην προκατεργασία των δειγμάτων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απαίτηση μικρότερης ποσότητας διαλύτη για την εκχύλιση, αλλά και την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης (Puri et al., 2012).

Ανάμεσα στους παράγοντες που παίζουν ρόλο στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση ανήκουν (Azmir et al., 2013, Industries, 2013, Puri et al., 2012, Nadar et al., 2018):

- Η σύσταση του χρησιμοποιούμενου ενζυμικού σκευάσματος
- Η συγκέντρωση του ενζύμου
- Το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος του φυτού
- Η αναλογία στερεού/υγρού (ενζύμου/υποστρώματος)
- Ο χρόνος της υδρόλυσης
- Το pH
- Η θερμοκρασία

Παρόλο που τα ένζυμα έχουν μία βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας, μπορούν να δράσουν και σε ένα εύρος θερμοκρασιών, παρέχοντας έτσι ευελιξία στο συνολικό κόστος της διεργασίας αλλά και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Άξιο αναφοράς είναι επίσης το γεγονός ότι μικρότερα σωματίδια του δείγματος της φυτικής ύλης οδηγούν σε μεγαλύτερη προσβασιμότητα του ενζύμου στο κύτταρο άρα και σε μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης της βιοδραστικής ένωσης του ενδιαφέροντος (Puri et al., 2012). Καλύτερη απόδοση στην εκχύλιση μπορεί να επιτευχθεί και με τη συνεργεία διαφορετικών ενζύμων (Nadar et al., 2018).

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση πλεονεκτεί έναντι των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με διαλύτες καθώς οδηγεί σε μικρότερους χρόνους εκχύλισης, σε ελαχιστοποίηση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και σε αυξημένη απόδοση και ποιότητα του τελικού προϊόντος, καθώς η εκχύλιση γίνεται σε ηπιότερες θερμοκρασίες (Puri et al., 2012, Industries, 2013). Παρόλα αυτά, η ΕΥΕ έχει και ορισμένα μειονεκτήματα με κυριότερα από αυτά να είναι το κόστος των ενζύμων (ειδικά όταν τα ένζυμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες ποσότητες για μεγάλους όγκους διαλυμάτων), και το γεγονός ότι τα παρασκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά δεν είναι ικανά να υδρολύσουν πλήρως το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Επιπλέον η ΕΥΕ είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς τα ένζυμα συμπεριφέρονται διαφορετικά για τις μεταβολές στα ποσοστά του διαθέσιμου οξυγόνου, της θερμοκρασίας και του υποστρώματος που μπορεί να συμβαίνουν μέσα στους αντιδραστήρες μεγάλου όγκου (Puri et al., 2012).

3.2.1 Ένζυμα

Τα ένζυμα, είναι πρωτεΐνες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς και έχουν πολύ συγκεκριμένες καταλυτικές λειτουργίες. Είναι απαραίτητα για όλες τις μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών και είναι υπεύθυνα για πολλές βιοχημικές αντιδράσεις. Παρόλο που η δομή τους είναι παρόμοια με όλες τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (αφού συνθέτονται από αμινοξέα), τα ένζυμα έχουν την ιδιότητα να διευκολύνουν την διεξαγωγή βιοχημικών αντιδράσεων αυξάνοντας τον ρυθμό της αντίδρασης, χωρίς να επηρεάζεται η δική τους δομή, ενώ είναι και

βιοαποικοδομήσιμα (Industries, 2013). Η ικανότητά τους να διασπούν και να αποικοδομούν κύτταρα ή μεμβράνες, βοηθά στην απελευθέρωση μεγαλύτερης ποσότητας της ουσίας ενδιαφέροντος, και συνεπώς οδηγεί σε καλύτερη απόδοση στην εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών (Puri et al., 2012)

Τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται με βάση την αντίδραση της ουσίας την οποία καταλύουν. Ορισμένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι οι πρωτεάσες (οι οποίες διασπούν τις πρωτεΐνες), οι κυτταρινάσες (οι οποίες διασπούν την κυτταρίνη), οι ημικυτταρινάσες (οι οποίες διασπούν την ημικυτταρίνη), οι λιπάσες (οι οποίες διαχωρίζουν τα λίπη σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα), και οι αμυλάσες (οι οποίες διασπούν το άμυλο σε απλά σάκχαρα) (Industries, 2013). Κάθε ένζυμο δρα σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα , με βάση την ιδιότητά του να καταλύει συγκεκριμένες αντιδράσεις (Puri et al., 2012). Τα ένζυμα διαχωρίζονται στους παρακάτω τύπους (Industries, 2013):

- Υδρολυτικά ένζυμα (ή υδρολάσες) : καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των κυττάρων
- Οξειδοαναγωγικά ένζυμα (ή οξειδοαναγωγάσες) : καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
- Λιγάσες : καταλύουν την ένωση 2 μορίων με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας
- Τρανσφεράσες : καταλύουν τη μεταφορά μιας ομάδας από ένα μόριο σε άλλο
- Ένζυμα ισομερισμού (ή ισομεράσες) : καταλύουν τη μετακίνηση ομάδων ενδομοριακά ώστε το σχηματιζόμενο προϊόν να είναι ισομερές με το υπόστρωμα
- Ένζυμα καρβοξυλίωσης : καταλύουν την καρβοξυλίωση του υποστρώματος
- Δεσμολάσες : καταλύουν τον σχηματισμό ή τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ 2 ανθράκων

Προκειμένου ένα ένζυμο να μπορέσει να καταλύσει μία αντίδραση πρέπει να ληφθούν υπόψη οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες αυτό δρα. Έτσι πρέπει να δοθεί προσοχή στη συγκέντρωση του ενζύμου, στο χρόνο και στη θερμοκρασία επώασης καθώς και στο βέλτιστο pH, ώστε αυτό να δράσει βέλτιστα.

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για την προκατεργασία της φυτικής ύλης προκειμένου στη μετέπειτα εκχύλιση να επιτευχθεί μεγαλύτερος βαθμός απόδοσης αλλά και οι βιοδραστικές ενώσεις να παραληφθούν σε όσο καλύτερη ποιότητα γίνεται. Έρευνες δείχνουν πως τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται περισσότερο για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από τα φυτά είναι τα εξής (Industries, 2013) :

- Κυτταρινάσες
- Ημικυτταρινάσες
- Πηκτινάσες

- Συνδυασμός των παραπάνω
- Α-αμυλάσες
- Πρωτεάσες

3.2.1.1 Πηκτινάσες - Εφαρμογές

Οι πηκτινάσες ήταν τα πρώτα ένζυμα που έγιναν εμπορικώς διαθέσιμα και χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή κρασιού και χυμών. Σήμερα, χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες παρασκευής χυμών λόγω της ικανότητάς τους να προσφέρουν μεγαλύτερη απόδοση και καλύτερο φιλτράρισμα του χυμού, ενώ ταυτόχρονα μειώνουν το ιξώδες του και αυξάνουν την καθαρότητά του. Χρησιμοποιούνται επίσης στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας και σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Gligor et al., 2019).

3.2.1.2 Κυτταρινάσες - Εφαρμογές

Οι κυτταρινάσες συνεισφέρουν κυρίως στις διεργασίες εκχύλισης και διαύγασης των χυμών από φρούτα και λαχανικά, στην εκχύλιση ελαίων και τέλος στη εξασφάλιση ορισμένων συστατικών των τροφίμων.

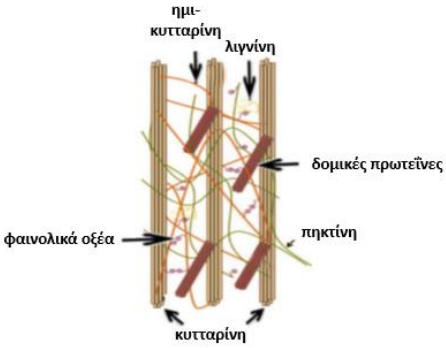
3.2.1.3 Ημικυτταρινάσες - Εφαρμογές

Συνήθως οι ημικυτταρινάσες χρησιμοποιούνται ως μέρη ενζυμικών μιγμάτων που χρησιμοποιούνται εμπορικά, και μαζί με τις κυτταρινάσες επιτρέπουν την ολική αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, αποτελώντας παράλληλα ένα οικονομικά αποδεκτό μέτρο.

3.2.2 Ένζυμα και τρόποι που επηρεάζουν τις βιοδραστικές ενώσεις

Οι βιοδραστικές ενώσεις βρίσκονται μέσα στα κύτταρα είτε ως διαλυτές είτε ως αδιάλυτες δομές συζευγμένες με σάκχαρα (γλυκοζίτες). Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις βρίσκονται εγκλεισμένες μέσα σε πολυσακχαρίτες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος όπως είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη, οι οποίοι συνδέονται μέσω υδρόφοβων δεσμών και δεσμών υδρογόνου. Πολλά φαινολικά οξέα βρίσκονται συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο της λιγνίνης μέσω τον υδροξυλικών ομάδων είτε σχηματίζουν δεσμούς με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες του

κυτταρικού τοιχώματος μέσω των καρβοξυλικών ομάδων. Τα φλαβονοειδή συνδέονται με ομοιοπολικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς με τμήματα σακχάρων είτε μέσω ομάδων υδροξυλίου είτε μέσω δεσμών άνθρακα-άνθρακα, ενώ οι τανίνες τείνουν να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα. Η θέση των βιοδραστικών ενώσεων στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων του δείγματος φυτικής ύλης φαίνονται στην (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 Βιοδραστικές ενώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων

Έτσι, οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες, οι πηκτινάσες και οι πρωτεάσες έχουν ως στόχο να αποικοδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων του φυτικού δείγματος και να απελευθερώσουν αυτές τις ενδομοριακές βιοδραστικές ενώσεις. Αυτά τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διασπούν της άμορφες περιοχές των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργώντας έτσι μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, από τους οποίους μπορεί να γίνει εύκολα η εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων. Υδρολυτικά ένζυμα όπως οι λιπάσες λειτουργούν είτε σε υδατικό περιβάλλον είτε παρουσία υποστρωμάτων όπως αλκοολών και αμινών (Nadar et al., 2018).

3.2.3 Επίδραση των παραμέτρων της ΕΥΕ στην απόδοση της εκχύλισης

3.2.3.1 Επίδραση του ενζυμικού τύπου

1. Κυτταρινάσες: Έρευνες έχουν αποδείξει ότι (Gligor et al., 2019):
    - Οι κυτταρινάσες είναι πιο αποτελεσματικές από τη β-γλυκοζιδάση για την εκχύλιση σεζοϊσολαρυσιριζίνης από το κέλυφος λιναριού.

- Η κυτταρινάση που προέρχεται από τον *Penicillium decumbens* υδρολύει καλύτερα το κυτταρικό τοίχωμα των φύλλων του *Ginkgo biloba L.* απ' ότι η πηκτινάση που προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Aspergillus niger*
- Η ΕΥΕ με κυτταρίνη που έγινε σε τζίντζερ για την παραλαβή ελαιορητίνης, είναι πιο αποτελεσματική από την χρήση αμυλάσης, πηκτινάσης ή πρωτεάσης.

2. Πηκτινάσες:
   - Η χρήση μόνο του ενζύμου πηκτινάση, είχε συγκρίσιμο αποτέλεσμα στην εκχύλιση προανθοκυανιδίνων από σταφύλια (*Vitis vinifera L. 'País')* με αυτό από τη χρήση μίγματος ενζύμων που περιείχε κυτταρινάση, ταννάση και πηκτινάση μαζί.
   - Αντίστοιχα, η χρήση γαλακτορουνάσης (διπολυμεράση της πηκτίνης) για την εκχύλιση ανθοκυανίνων, ολιγομερών και πολυμερών φλαβονοειδών από το περίβλημα μαραμένου σταφυλιού *(Vitis vinifera L.*), είχε πολύ καλή απόδοση λόγω της υδρόλυσης των α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών του γαλακτουρονικού οξέος.

3.2.3.2 Επίδραση των ενζυμικών μιγμάτων

Προκειμένου να γίνει πλήρης υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων, είναι απαραίτητο τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα να έχουν συμπληρωματικές ιδιότητες. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η κυτταρινάση σε συνδυασμό με την ημικυτταρινάση, είχε πολύ καλύτερη απόδοση στην υδρόλυση της κυτταρίνης των φύλλων θυμαριού *(Thymus capitatus L.)* για την εκχύλιση ελαίων. Αντιθέτως, το ίδιο ενζυμικό μίγμα δε βελτίωσε την απόδοση της εκχύλισης ελαίων από δείγμα δεντρολίβανου *(Rosmarinus officinalis L.)*, γεγονός που οφείλεται στη διαφορετική δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων των δύο φυτών. Η χρήση ενζυμικού μίγματος που περιείχε πηκτινάση και ταννάση, οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης γαλλικού οξέος δείγματος μαύρου τσαγιού *(C. sinensis L.),* καθώς η πηκτινάση συνέβαλλε στην πλήρη υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος και η ταννάση στην αποτελεσματική ανάκτηση του φαινολικού περιεχομένου του δείγματος (Gligor et al., 2019).

3.2.3.3 Επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης

Ο χρόνος της εκχύλισης συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση του ενζύμου, καθώς διπλασιασμός της ενζυμικής συγκέντρωσης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του χρόνου της εκχύλισης κατά το ήμισυ. Παρόλα αυτά, μεγάλη αύξηση του χρόνου της

ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να προκαλέσει αποσύνθεση των βιοδραστικών ενώσεων λόγω της παρατεταμένης παραμονής αυτών σε υψηλή θερμοκρασία είτε λόγω οξείδωσής τους. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης σε δείγματα σταφυλιού *(Vitis rotundifolia Michx.)*, οδήγησε σε μειωμένη απόδοση στην ανάκτηση φαινολικών ενώσεων που οφειλόταν στην θερμική αποσταθεροποίηση της χημικής δομής του δείγματος (Gligor et al., 2019).

3.2.3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης

Η θερμοκρασία της εκχύλισης επηρεάζει τις ρεολογικές ιδιότητες των διαλυμένων βιοδραστικών ενώσεων αλλά και την ενζυμική ενεργότητα. Γενικά η ενζυμική ενεργότητα αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της θερμοκρασίας , ενώ το ιξώδες του μέσου εκχύλισης μειώνεται , γεγονός που οδηγεί σε καλύτερη διαλυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων. Παρόλα αυτά η μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει μεταβολή της τριτοταγούς δομής του ενζύμου, γεγονός που οδηγεί σε παύση της υδρόλυσης και διάσπαση των ουσιών ενδιαφέροντος. Παραδείγματος χάριν, η ανάκτηση οργανικών ενώσεων που περιέχουν θείο από δείγματα σκόρδου *(Allium sativum L.),* μειώθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 60 ˚C, ενώ το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων παρέμεινε σταθερό. Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ενός σημείου ενίσχυσε τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας και τη διαλυτότητα τον εκχυλιζόμενων ανθοκυανιδίνων από δείγματα φρούτων του είδους *Prunus nepalensis L.,* ενώ η μετέπειτα αύξησή της οδήγησε σε μετουσίωση αυτών αλλά και των ίδιων των ενζύμων (Gligor et al., 2019).

3.2.3.5 Επίδραση του pH στην ΕΥΕ

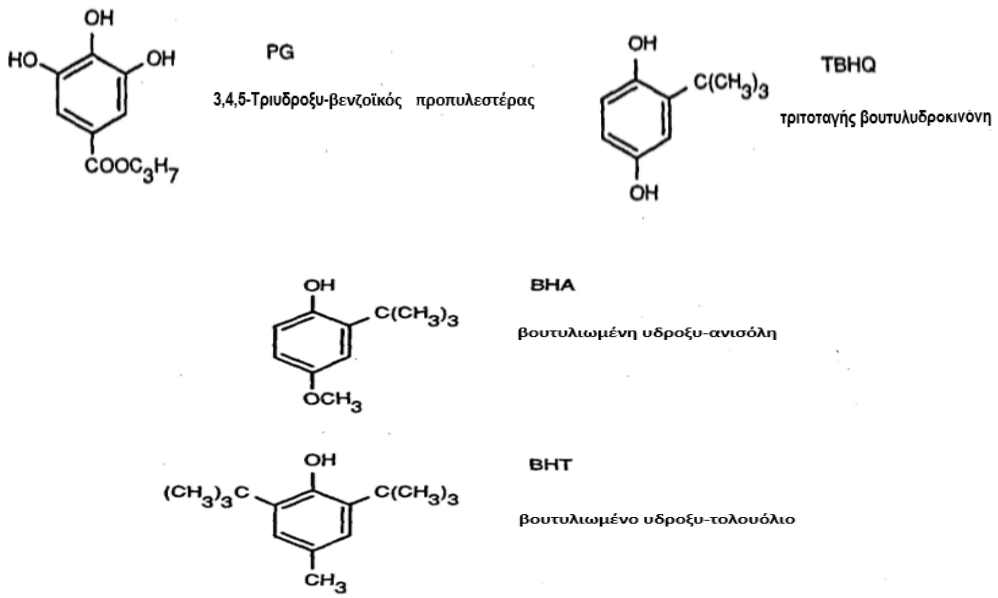
Το pH αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της ΕΥΕ καθώς επηρεάζει άμεσα την ενζυμική ενεργότητα και το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων. Έτσι, η ΕΥΕ σε όξινο περιβάλλον οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των δεσμών υδρογόνου του κυτταρικού τοιχώματος, άρα και σε αύξηση της πλαστικότητας αυτού. Παράλληλα το όξινο περιβάλλον προκαλεί μεταβολές στη δομή των πρωτεϊνών, επηρεάζοντας την καταλυτική ικανότητα των ενζύμων και τη δυνατότητα πρόσδεσης αυτών στο εκάστοτε υπόστρωμα. Για παράδειγμα, η χρήση ενζυμικού μίγματος που περιείχε πηκτινάση και κυτταρινάση για την εκχύλιση ταξιφιλίνης, είχε βέλτιστη απόδοση σε pH που κυμαινόταν από 5,0 έως 6,5, ενώ περαιτέρω αύξηση αυτού οδήγησε σε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας (Gligor et al., 2019).

Κεφάλαιο 4: Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ενώσεις η παρουσία των οποίων (ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις) επιβραδύνει ή αναστέλλει τελείως την οξείδωση ευπαθών υποστρωμάτων (Τσιμογιάννης, 2008). Τα αντιοξειδωτικά εμποδίζουν την διαδικασία της οξείδωσης αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες, τα χηλικά μέταλλα και δεσμεύοντας άτομα οξυγόνου (Shahidi et al., 1992). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα φυσικά και τα συνθετικά χωρίς όμως η διάκριση αυτή να συνεπάγεται ότι όλα τα φυσικά ή συνθετικά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Μία πιο ακριβής ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση τον τρόπο λειτουργίας τους. Επομένως, ανάλογα με τις χημικές τους ιδιότητες, διακρίνονται σε πρωτογενή και παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά και σε συνεργιστικά συστήματα.

4.1 Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται κυρίως στα τρόφιμα προκειμένου να καταστέλλουν τα φαινόμενα οξείδωσης αυτών, να προστατεύουν τη γεύση και το χρώμα και γενικότερα να παρατείνουν το χρόνο ζωής τους. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι: το βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT), η βουτυλιωμένη υδροξυ-ανισόλη (BHA), το γαλλικό προπύλιο (GP), το γαλλικό δωδεκύλιο (DG) και η τριτοταγής βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ), οι δομές των οποίων φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 12).

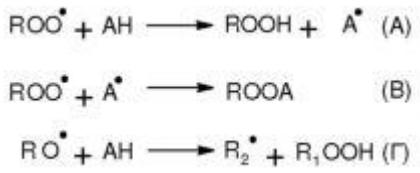


Εικόνα 12. Οι δομές των PG, TBHQ, BHA και BHT

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι κυρίως φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις που μπορούν να εμφανιστούν σε όλα τα μέρη του φυτού. Οι φαινολικές ενώσεις δρουν με πολλούς τρόπους ως φυσικά αντιοξειδωτικά, καθώς λειτουργούν ως αναγωγικοί παράγοντες διακόπτοντας τις αντιδράσεις του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών, ως δεσμευτές μεταλλικών χηλικών ιόντων και ως δεσμευτές οξυγόνου (βλ. παράγραφο 4.2, 4.3). Παραδείγματα φυσικών φυτικών αντιοξειδωτικών είναι τα φλαβονοειδή, τα παράγωγα του κιναμωμικού οξέος, οι κουμαρίνες, οι τοκοφερόλες και τα φαινολικά οξέα (Shahidi et al., 1992).

4.2 Πρωτογενή αντιοξειδωτικά

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης του μηχανισμού ελευθέρων ριζών, αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές ή αλκαλοξυ- ρίζες σύμφωνα με τις αντιδράσεις Α, Β και Γ του παρακάτω σχήματος (Εικόνα 13). Οι φαινολικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή, ανήκουν στην κατηγορία των πρωτογενών αντιοξειδωτικών αφού παρεμποδίζουν της αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 13. Αντιδράσεις πρωτογενών αντιοξειδωτικών με υπεροξειδικές και αλκαλοξυ- ρίζες

Ουσιαστικά οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν ως αναγωγικά, αφού ανάγουν τις υπεροξειδικές ρίζες ενώ οι ίδιες ταυτοχρόνως οξειδώνονται. Έτσι, το σύστημα έχει χαμηλότερη ενέργεια και δραστικότητα από τις υπεροξειδικές ρίζες οπότε δεν προωθούνται οι αντιδράσεις διάδοσης του μηχανισμού ελευθέρων ριζών (Τσιμογιάννης, 2008),(Shahidi et al., 1992).

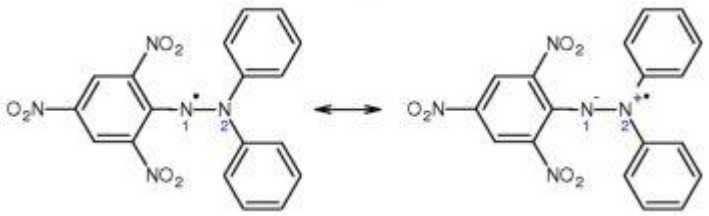
4.3 Παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά

Τα παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά παρεμποδίζουν ή καθυστερούν τον ρυθμό διεξαγωγής των αντιδράσεων έναρξης μέσω της διάσπασης των υδρο-υπεροξειδίων (Τσιμογιάννης, 2008),(Shahidi et al., 1992). Επομένως λειτουργούν περισσότερο προληπτικά κατά των οξειδωτικών φαινομένων, παρά κατασταλτικά. Στη βάση των φυσικών ενώσεων, τα παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες (Τσιμογιάννης, 2008):

1. Χηλικοί παράγοντες μετάλλων
   Οι χηλικοί παράγοντες δημιουργούν σύμπλοκα με τα μέταλλα μειώνοντας το δυναμικό οξειδοαναγωγής τους, σταθεροποιώντας την οξειδωμένη μορφή του μεταλλικού ιόντος. Ως εκ τούτου αυξάνεται η ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων έναρξης. Τα φλαβονοειδή, ενώ ανήκουν στην κατηγορία των πρωτογενών αντιοξειδωτικών, μπορούν να λειτουργήσουν και ως χηλικοί παράγοντες εφόσον η οξείδωση καταλύεται από μέταλλα.
2. Αποδιεγέρτες του οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης O_2^*
   Τα καροτενοειδή μπορούν να αποδιεγείρουν μη χημικά το O_2^*, μέσω της μεταφοράς ενέργειας από το οξυγόνο της απλής διεγερμένης κατάστασης στο καροτενοειδές. Έτσι, γίνεται αποσύζευξη των δύο ηλεκτρονίων ενός διπλού δεσμού και αποεντοπισμός τους μέσω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού.
3. Παράγοντες απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας
   Η φωτοοξείδωση των λιπαρών υλών βασίζεται στην απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας από φωτοευαισθητοποιητές με μετέπειτα μεταβίβαση αυτής στο οξυγόνο τριπλής βασικής κατάστασης, το οποίο μεταβαίνει στην πολύ δραστική απλή διεγερμένη κατάσταση. Τα καροτενοειδή, όπως τα φλαβονοειδή και το ασκορβικό οξύ, μπορούν να απορροφήσουν την υπεριώδη ακτινοβολία από τους φωτοευαισθητές, με αποσύζευξη των ηλεκτρονίων ενός διπλού δεσμού.
4. Δεσμευτές οξυγόνου
   Είναι ενώσεις που μπορούν να αντιδράσουν απευθείας με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, απομακρύνοντάς το από ένα κλειστό σύστημα.
5. Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά
   Στοχεύουν στην πρόληψη του σχηματισμού των ενώσεων που προσδίδουν τα χαρακτηριστικά του ταγγισμού (οξείδωση λιπών και ελαίων που τους προσδίδει αλλοιωμένα χαρακτηριστικά) στις λιπαρές ύλες.

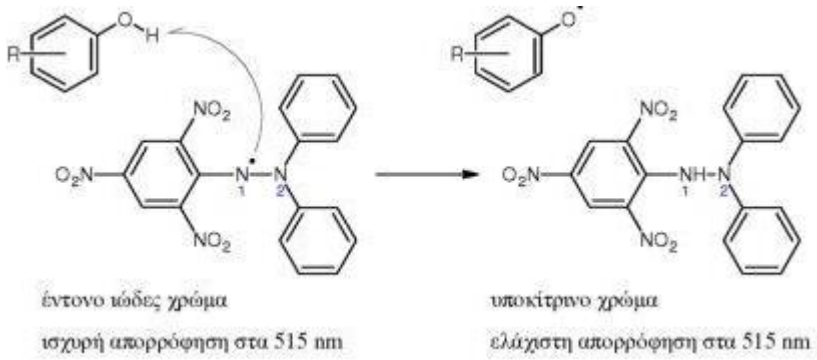
4.4 Μέθοδος DPPH για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών

Αυτή η μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης προτάθηκε από τους Brand-Williams et al., (1995). Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων ενώσεων ή εκχυλισμάτων, γίνεται μέσω της αντίδρασης αυτών με τη ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH˙) σε μεθανολικό διάλυμα. Η ρίζα αυτή φέρει έντονο ιώδες χρώμα και είναι πολύ σταθερή λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού (Εικόνα 14) (Τσιμογιάννης, 2008).



Εικόνα 14. Δομές συντονισμού της ρίζας DPPH

Κατά την αντίδρασή της με το εκχύλισμα ή την ένωση, η ρίζα αποσπά ένα άτομο Η και παράγει την αντίστοιχη υδραζίνη, η οποία λόγω της έλλειψης του μονήρους ηλεκτρονίου απορροφά ελάχιστα σε μήκη κύματος της ορατής ακτινοβολίας. Κατά την αναγωγή της ρίζας αυτής παρατηρείται μείωση της απορρόφησής της σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (Εικόνα 15) (Τσιμογιάννης, 2008).



Εικόνα 15. Αντίδραση DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών

Στη ριζική μορφή του, το DPPH˙ απορροφά σε μήκος κύματος λ=515 nm, αλλά καθώς αυτό ανάγεται από ένα αντιοξειδωτικό AH ή από ένα είδος ρίζας R˙, η απορρόφηση αρχίζει και εξαφανίζεται (Εικόνα 16) (Brand-Williams et al., 1995).

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$
$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Εικόνα 16 Αναγωγή του DPPH από αντιοξειδωτικό AH ή άλλη ρίζα R

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων εκφράζεται μέσω του δείκτη IC_{50} σε mol_{antiox}/mol_{DPPH} ή σε g_{antiox}/kg_{DPPH} ο οποίος υποδηλώνει την απαιτούμενη ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για να δεσμεύσει το 50% της ρίζας (Τσιμογιάννης, 2008).

Μέθοδοι και Υλικά

Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι & Υλικά

5.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

5.1.1 Όργανα και Συσκευές

Επωαστήρες

1. Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
2. Επωαστήρας Orbital Incubator S150, Styart Scientific (Μ. Βρετανία)

Φωτόμετρα

1. Φωτόμετρο S-22 UV-VIS Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)
2. Φωτόμετρο Microplate reader Spectramax 250, Molecular devices (ΗΠΑ)
3. Φωτόμετρο Hitachi UV 2000

Φυγόκεντροι

1. Φυγόκεντρος TJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ)
2. μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)

Συσκευές

1. Συσκευή διήθησης υπό κενό
2. Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
3. Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
4. Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
5. Θερμοστατούμενα υδατόλουτα

Ζυγοί

1. Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας Bell Engineering (Ιταλία), KernABS (Γερμανία)

Ξηραντήρες

1. Ξηραντήρας WTEbinder 7200 Tutteigen (Γερμανία)

Πυριαντήριο

1. Φούρνος Muffle Furnace, Size 1, Gallenkamp (Γερμανία)
2. Αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO.

5.1.2 Πρώτη Ύλη

Σαν πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν οι καρποί του τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.* που προμηθεύτηκαν από την εταιρία Κορρές.

5.1.3 Αντιδραστήρια - Τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα

Τα αντιδραστήρια και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma (Η.Π.Α), Aldrich, Novozymes

- Αιθανόλη (EtOH), (absolute και 98% καθαρότητας)
- Μεθανόλη (MeOH) (absolute και 98% καθαρότητας)
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Γαλλικό οξύ
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau
- Νιτρώδες Νάτριο ($NaNO_2$)
- Χλωριούχο Αργίλιο ($AlCl_3$)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
- Κατεχίνη
- Όξινο Φωσφορικό Νάτριο (Na_2HPO_4)
- Ένυδρο Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$)
- Ενζυμικό σκεύασμα *God Pap*
- Ενζυμικό διάλυμα *Cellic CTec2*
- Ενζυμικό διάλυμα *Viscozyme L.*
- Ενζυμικό διάλυμα *Bioprep*

5.2 Μέθοδοι

5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση

Πραγματοποιήθηκε συμβατική εκχύλιση σε αιθανολικό διάλυμα 40% EtOH/H_2O (v/v) τελικού όγκου 100 mL σε δείγμα φλοιού και σπόρου μαζί (μετά τον τεμαχισμό της πρώτης ύλης) με συγκέντρωση του στερεού 2% (w/v). Η εκχύλιση αυτή πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες.

Μετά την εκχύλιση πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό. Στο διήθημα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ολικών φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών, και αντιοξειδωτικής δράσης. Το στερεό υπόλειμμα αφέθηκε για ξήρανση σε πυριαντήριο 60˚C για 16h μέχρι σταθερού βάρους.

5.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Στην περίπτωση της MAE, τα διαλύματα δημιουργήθηκαν με αναλογία στερεού/υγρού 2% (w/v) και αναλογία EtOH/H_2O 40% (v/v). Στην MAE εξετάστηκαν εις διπλούν οι εξής περιπτώσεις: 1) φλοιός και σπόρος μαζί, 2) φλοιός μόνο και 3) σπόρος μόνο. Η MAE έλαβε χώρα για 1 ώρα στους 50 ˚C.

Μετά την κάθε εκχύλιση ακολούθησε διήθηση υπό κενό, με αποθήκευση του εκάστοτε διηθήματος, ενώ τα στερεά υπολείμματα αφέθηκαν να ξηρανθούν για 24 ώρες σε φούρνο στους 60 ˚C. Στη συνέχεια (μετά το πέρας των 24 ωρών) τα στερεά υπολείμματα αφέθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι σταθεροποίησης του βάρους τους και έπειτα ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας.

5.2.3 Μέθοδος Taguchi

Η μέθοδος Taguchi είναι μία τεχνική σχεδιασμού πειραμάτων (*design of experiments – DOE*), που χρωστάει το όνομά της στον εφευρέτη της Dr. Genichi Taguchi, και χρονολογείται λίγο μετά το 1980. Σύμφωνα με τον Dr. Taguchi, η βελτίωση της ποιότητας μίας διεργασίας πρέπει να βασίζεται και να αναπτύσσεται σύμφωνα με τη φιλοσοφία της πρόληψης (Davis & John, 2018). Η φιλοσοφία του Taguchi βασίζεται σε τρείς βασικές αρχές που αφορούν την ποιότητα (Μητρόπουλος, 2017):

1. Η ποιότητα πρέπει να σχεδιάζεται από πριν στο προϊόν και όχι να ελέγχεται μετά την κατασκευή του.
2. Καλύτερη ποιότητα επιτυγχάνεται με ελαχιστοποίηση της απόκλισης από μία τιμή στόχο. Το προϊόν θα έπρεπε να σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε εν τέλει να είναι ανεπηρέαστο από τους μη ελεγχόμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες.
3. Το κόστος της ποιότητας θα πρέπει να μετράται ως συνάρτηση της απόκλισης από το στόχο και οι απώλειες θα πρέπει να υπολογίζονται σε όλο το σύστημα.

Σύμφωνα λοιπόν με τον Taguchi, το πρώτο βήμα για τη βελτίωση της ποιότητας είναι η σωστή επιλογή των παραμέτρων να γίνεται κοντά στην τελική τιμή - στόχο. Γι’ αυτό το λόγο σχεδίασε τα πειράματά του με τη χρήση ορθογώνιων πινάκων. Η απόκλιση

ενός προϊόντος από τον επιθυμητό στόχο οφείλεται σε δύο είδη παραγόντων (Μητρόπουλος, 2017):

1. Τους παράγοντες ελέγχου, τους οποίους μπορούμε να ελέγχουμε, και
2. Τους παράγοντες θορύβου (noise factors), τους οποίους δεν μπορούμε να ελέγξουμε και συνδέονται συνήθως με το περιβάλλον της παραγωγής ή της λειτουργίας. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται στους:
    i. Εξωτερικούς παράγοντες θορύβου (όπως υγρασία, σκόνη, θερμοκρασία περιβάλλοντος κ.α.) και στους
    ii. Εσωτερικούς παράγοντες θορύβου (όπως οι αποκλίσεις των μηχανημάτων από τι προδιαγραφές της παραγωγικής διαδικασίας)

Προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα, ο Taguchi σχεδίασε μια μέθοδο κλασματικού σχεδιασμού πειραμάτων με στόχο τη μείωση της διασποράς της απόδοσης του προϊόντος σε σχέση με την τιμή στόχο, με την τροποποίηση των τιμών των ελεγχόμενων παραγόντων. Θέτοντας τους ελεγχόμενους παράγοντες στα βέλτιστα επίπεδά τους, το προϊόν και η διεργασία θα είναι σταθερά έναντι των παραγόντων θορύβου (Μητρόπουλος, 2017). Σε αντίθεση με την πλήρη ανάλυση παραγόντων, η μέθοδος Taguchi με τη χρήση ορθογώνιων πινάκων, μειώνει των αριθμό των πειραμάτων που πρέπει να σχεδιαστούν οπότε πλεονεκτεί όσον αφορά το κόστος της διεργασίας αλλά και όσον αφορά το χρόνο που απαιτείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων (Davis & John, 2018). Τα κριτήρια επιλογής του κατάλληλου ορθογώνιου πίνακα για ένα σχεδιασμένο πείραμα είναι τα εξής, καταταγμένα από το περισσότερο στο λιγότερο σημαντικό (Μητρόπουλος, 2017):

- Ο αριθμός των παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνονται υπόψη.
- Ο αριθμός των επιπέδων για τους υπόψη παράγοντες.
- Η επιθυμητή ανάλυση του πειράματος ή η ύπαρξη περιορισμών χρόνου και κόστους.

Ο Taguchi πρότεινε επίσης τη χρήση της συνάρτησης απώλειας ελέγχου, η οποία είναι μια συνεχής συνάρτηση που ορίζεται με βάση την απόκλιση μιας παραμέτρου σχεδιασμού από την τιμή – στόχο. Η τιμή αυτής της συνάρτησης μετατρέπεται στη συνέχεια σε λόγο σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise (S/N) ratio). Για τον προσδιορισμό του λόγου S/N, τα χαρακτηριστικά της απόδοσης διατίθενται στις εξής τρείς κατηγορίες:

- Το βέλτιστο είναι το καλύτερο (Nominal-the-Best)
- Το μέγιστο είναι το καλύτερο (Larger-the-Best)
- Το μικρότερο είναι το καλύτερο (Smaller-the-Best)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τύποι προβλημάτων και οι αντίστοιχες συναρτήσεις σήματος προς θόρυβο (Πίνακας 3), όπου: y_i οι παρατηρήσεις της μεταβλητής απόκρισης, μ^2 ο μέσος των παρατηρήσεων στο τετράγωνο, σ^2 η τυπική απόκλιση και n ο αριθμός των παρατηρήσεων.

Πίνακας 3. Τύποι προβλημάτων και η αντίστοιχη συνάρτηση S/N

Κατηγορία	Συνάρτηση S/N	Στόχος
Smaller-the-Best	$S/N = -10\log[\frac{1}{n}\sum_{n=1}^{n} y_i^2]$	Η ελαχιστοποίηση της απόκρισης
Nominal-the-Best	$S/N = 10\log\frac{\mu^2}{\sigma^2}$	Ο εντοπισμός της απόκρισης και η συνάρτηση σήματος/θόρυβο να βασίζεται στο μέσο όρο και την τυπική απόκλιση
Larger-the-Best	$S/N = -10\log[\frac{1}{n}\sum_{n=1}^{n} \frac{1}{y_i^2}]$	Η μεγιστοποίηση της απόκρισης

Οι τέσσερις βασικές φάσεις για τη βελτιστοποίηση ενός προϊόντος ή μιας διεργασίας σύμφωνα με τον Taguchi είναι οι εξής:

1. Αρχικά, προσδιορίζονται έγκαιρα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και καθορίζονται οι παράμετροι που είναι σημαντικές για το προϊόν ή τη διεργασία.
2. Στη δεύτερη φάση σχεδιάζεται η ακολουθία των πειραμάτων και εκτελείται αναλόγως.
3. Στην τρίτη φάση γίνεται η στατιστική ανάλυση για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών, και τελικά
4. Στην τέταρτη φάση γίνεται η δοκιμή επιβεβαίωσης των βέλτιστων συνθηκών.

Επομένως σύμφωνα με τις 4 προαναφερθείσες φάσεις, τα βήματα για την πειραματική διεξαγωγή του σχεδιασμού Taguchi είναι τα εξής:

1. Επιλογή των παραμέτρων εξόδου ή στόχου.
2. Αναγνώριση των παραμέτρων εισόδου και των επιπέδων τους.
3. Προσδιορισμός του κατάλληλου ορθογώνιου πίνακα (OA).
4. Ανάθεση των παραμέτρων και των αλληλεπιδράσεών τους στις στήλες του πίνακα.
5. Διεξαγωγή των πειραμάτων με βάση τους συνδυασμούς που προκύπτουν από τον ορθογώνιο πίνακα.
6. Στατιστική ανάλυση με εύρεση του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N ratio) και προσδιορισμός της βέλτιστης ρύθμισης των επιπέδων των παραγόντων.

7. Εκτέλεση επιβεβαιωτικού πειράματος (αν είναι απαραίτητο).

Η μέθοδος Taguchi χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, όπως σε περιβαλλοντικές επιστήμες, σε γεωργικές επιστήμες, στη φυσική, στη στατιστική, στη διοίκηση και τις επιχειρήσεις, αλλά και σε χημικές διεργασίες. Βασικό της πλεονέκτημα είναι η αύξηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος με μικρή επίδραση στο κόστος και χωρίς αυτή να επηρεάζεται από τη μεταβολή των παραγόντων θορύβου. Επίσης εφαρμόζεται σε πολλές βιομηχανίες καθώς είναι πολύ απλή και γρήγορη. Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος Taguchi έχει χαρακτηριστεί ανεπαρκής και αναποτελεσματική για κάποιες περιπτώσεις, καθώς τα αποτελέσματά της είναι σχετικά και δεν είναι σε θέση να υποδείξει ακριβώς ποιες παράμετροι έχουν την υψηλότερη επίδραση στην απόδοση ή την απόκριση. Επίσης ενώ εφαρμόζεται κατά τον καλύτερο τρόπο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη ενός προϊόντος, δεν μπορεί να βοηθήσει στην διόρθωση της ποιότητας αυτού αφού σχεδιαστεί (Davis & John, 2018)

5.2.4 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση συνδυασμένη με συμβατική εκχύλιση

Στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, εφαρμόστηκε σχεδιασμός Taguchi (Davis & John, 2018), προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. Σύμφωνα με αυτόν τον σχεδιασμό, επιλέχθηκαν ως παράγοντες (factors) σχεδιασμού ο χρόνος (σε h) και το ενζυμικό φορτίο (σε units ενζύμου/ gr ξηρού δείγματος) σε 3 επίπεδα ο καθένας (levels) (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Παράγοντες και τα επίπεδά του που μελετήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο Taguchi

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A: χρόνος (h)	2	5	7,5
B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)	2.5	5	7.5

Έτσι, σύμφωνα με τον σχεδιασμό Taguchi ο L9 ορθογώνιο πίνακας παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Αριθμός πειραμάτων σύμφωνα με τον σχεδιασμό Taguchi

Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5
7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6 Ένζυμα, στοιχεία γι' αυτά και πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα	Είδος ενζύμου	Περιεχόμενο	Ενεργότητα	Βέλτιστες συνθήκες	Πειραματικές συνθήκες
Cellic CTec2 (novozymes, 2010)	Κυτταρινολυτικό	Κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάσες	220 units/ mL σκευάσματος	T=45-50 ˚C pH 5,0–5,5	T=50˚C pH 5,0
Viscozyme L (Novozymes, 2002)	Κυτταρινολυτικό	Μίγμα καρβοϋδρασών (αραβινάση, κυτταρινάση, β-γλυκανάση, ημικυτταρινάση και ξυλαναση)	120 units/ mL σκευάσματος	T=25-55˚C pH 3,5-5,5	T=50˚C pH 5,0
Bioprep (Choudhury, n.d.)	Πηκτινολυτικό	Αλκαλική πηκτινάση (EC 4.2.2.2, πηκτική λυάση)	300 units/ mL σκευάσματος	T=50-60˚C pH 7,0-9,5	T=50˚C pH 8,0

Για όλες τις ΕΥΕ που έγιναν , χρησιμοποιήθηκε 1 gr φλοιού του rosehip, το οποίο προστέθηκε σε 20 mL του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος ενώ στη συνέχεια προστέθηκε και η απαιτούμενη ποσότητα του εκάστοτε ενζύμου προκειμένου να επιτευχθεί το ζητούμενο ενζυμικό φορτίο.

Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε επωαστήρα υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm σε θερμοκρασία 50 ˚C για τους χρόνους που αναγράφονται στον Πίνακα 4. Στη συνέχεια έγινε ψύξη των δειγμάτων και προσθήκη αιθανόλης ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 40% (v/v). Έπειτα, πραγματοποιείται επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 30 ˚C για 24 ώρες. Τέλος πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό. Το

στερεό υπόλειμμα αφέθηκε για ξήρανση σε πυριαντήριο 60˚C για 16h μέχρι σταθερού βάρους. Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν. Στο διήθημα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ολικών φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών, και αντιοξειδωτικής δράσης.

5.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

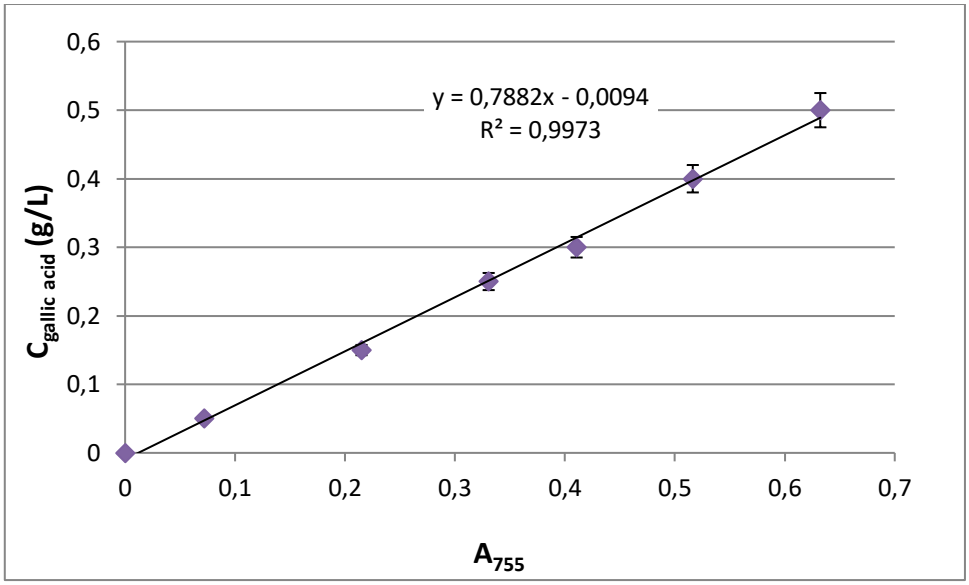
5.3.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, για κάθε δείγμα αναμειγνύονται τα παρακάτω αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες και με την αναγραφόμενη σειρά (A Agbor et al., 2014):

- 50 μL δείγματος
- 3 mL απιονισμένο H_2O
- 0,25 mL Folin-Ciocalteu (επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 έως 8 min)
- 0,75 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3
- 0,95 mL απιονισμένο H_2O (ώστε η συνολικός όγκος του δείγματος να είναι 5 mL)

Παρασκευάστηκε επίσης και ένα δείγμα που αντί για εκχύλισμα του καρπού προστέθηκε απιονισμένο νερό, προκειμένου αυτό να λειτουργήσει ως τυφλό δείγμα. Τα δείγματα μετά την προσθήκη του κάθε αντιδραστηρίου οδηγήθηκαν για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι, για t=1h, καθώς το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι φωτοευαίσθητο. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με φωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος λ=755 nm. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, προκειμένου να αποφευχθούν σφάλματα λόγω της ευαισθησίας των αντιδραστηρίων.

Το σύνολο των υπολογισμών έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Διάγραμμα 1), η οποία παρασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος αρχικής συγκέντρωσης 0,5 g/L.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Με βάση τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς, αλλά και τις απορροφήσεις που καταγράφηκαν, έγινε στη συνέχεια ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων (εκφρασμένος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος) που περιέχονταν σε κάθε δείγμα σύμφωνα με τον τύπο:

$$\boldsymbol{Total\ Phenolic\ Content\ (TPC)}\left(\frac{\mu g}{g}\right) = \frac{C_{ga} \cdot V_{ext}}{m_{ext}} \quad \textbf{(1)}$$

Όπου:

- C_{ga}: η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς
- V_{ext}: ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα
- m_{ext}: η μάζα του δείγματος

5.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών – Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου

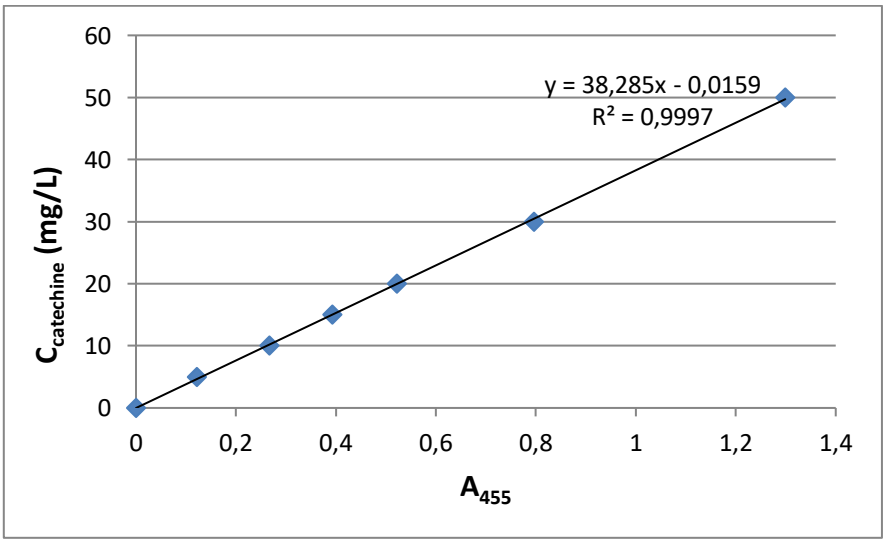
Ο προσδιορισμός των φλαβονοειδών στα δείγματα έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, για κάθε δείγμα αναμειγνύονται τα παρακάτω αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες και με την αναγραφόμενη σειρά (Anokwuru et al., 2011):

- 125 μL δείγματος
- 75 μL υδατικού διαλύματος $NaNO_2$ 5% (w/v) (επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για t=6min)

- 150 μL υδατικού διαλύματος $AlCl_3$ 10% (w/v) (επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για t=5min)
- 750 μL υδατικού διαλύματος NaOH 1M
- 1400 μL απιονισμένου H_2O (ώστε η συνολικός όγκος του δείγματος να είναι 2,5 mL)

Παρασκευάστηκε επίσης και ένα δείγμα που αντί για εκχύλισμα του καρπού προστέθηκε απιονισμένο νερό, προκειμένου αυτό να λειτουργήσει ως τυφλό δείγμα. Τα δείγματα μετά την προσθήκη του κάθε αντιδραστηρίου οδηγήθηκαν για ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για t=15min. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με φωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος λ=495 nm. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε φλαβονοειδή, έγινε κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτό των ολικών φαινολικών, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 2) των φλαβονοειδών η οποία έγινε με χρήση πρότυπου διαλύματος κατεχίνης αρχικής συγκέντρωσης 0,5 g/L.



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για τον προσδιορισμό ολικών φλαβονοειδών

Με βάση τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς, αλλά και τις απορροφήσεις που καταγράφηκαν, έγινε στη συνέχεια ο υπολογισμός των φλαβονοειδών (εκφρασμένος σε ισοδύναμα κατεχίνης) που περιέχονταν σε κάθε δείγμα σύμφωνα με τον τύπο:

$$\boldsymbol{Total\ Flavonoid\ Content\ (TFC)}\left(\frac{\mu g}{g}\right) = \frac{C_{cat} \cdot V_{ext}}{m_{ext}} \qquad \textbf{(2)}$$

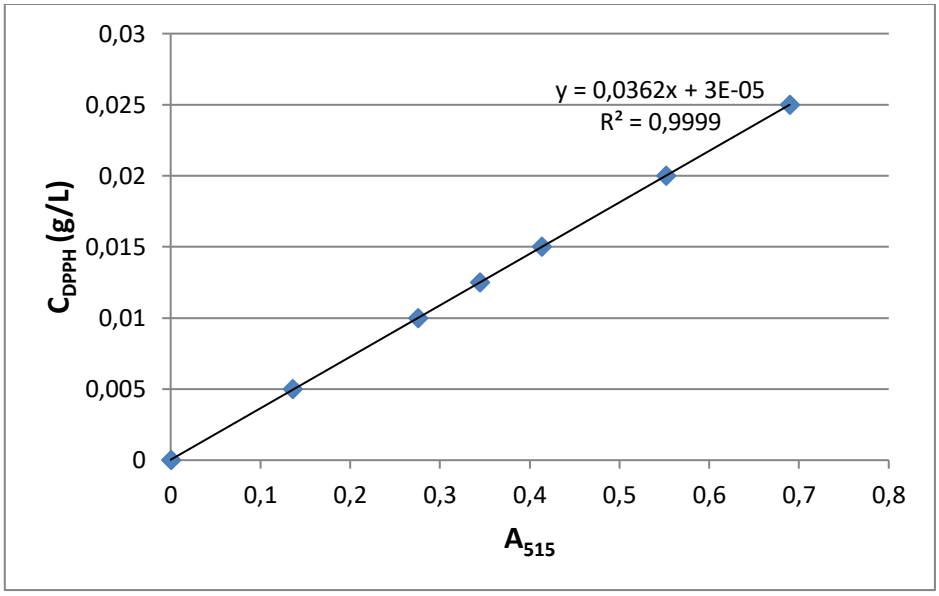
Όπου:

- C_{cat}: η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς
- V_{ext}: ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα
- m_{ext}: η μάζα του δείγματος

5.3.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – δοκιμή DPPH

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος των Brand-Williams et al., 1995. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, παρασκευάζεται ένα stock μεθανολικό διάλυμα DPPH. Ζυγίζονται 2,5mg DPPH και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία εν συνεχεία προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Η προσθήκη της μεθανόλης γίνεται σιγά σιγά και ακολουθεί έντονη ανακίνηση της φιάλης (καθώς το DPPH διαλύεται δύσκολα), μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως το DPPH, το οποίο προσδίδει ένα σκούρο μωβ χρώμα στο διάλυμα. Το μεθανολικό διάλυμα DPPH είναι φωτοευαίσθητο, επομένως το διάλυμα αυτό φτιαχνόταν κάθε φορά που ακολουθούνταν η συγκεκριμένη μέθοδος (ώστε να είναι φρέσκο), ενώ τα δείγματα φυλάσσονταν στο σκοτάδι. Τα εκχυλίσματα του φλοιού του καρπού, αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρις ότου να δημιουργηθούν οι συγκεντρώσεις $0,025C_0$, $0,05C_0$, $0.1C_0$ και $0.2C_0$. Μετά την παρασκευή των εκάστοτε συγκεντρώσεων, αναμίχθηκαν 3,9 mL διαλύματος DPPH και 0,1 mL του εκάστοτε εκχυλίσματος και ακολούθησε ανάδευση σε μηχάνημα τύπου Vortex. Παράλληλα παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα από την ανάμειξη 3,9 mL διαλύματος DPPH και 0,1 mL απιονισμένου νερού, το οποίο λειτούργησε ως τυφλό. Τα δείγματα στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για t=30min. Ο χρόνος αυτός ήταν αρκετός για να ολοκληρωθεί η αντίδραση της οξείδωσης. Τέλος μετά το πέρας της μισής ώρας, ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος λ=515nm.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του εκάστοτε εκχυλίσματος έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 3). Αυτή κατασκευάστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trolox ως πρότυπο διάλυμα. Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς για την αντιοξειδωτική δράση, και είναι ανάλογο της βιταμίνης D.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς DPPH

Με βάση την καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH και του μη ανηγμένου DPPH, μετά το πέρας της εκάστοτε αντίδρασης οξείδωσης, μέσω της εξίσωσης που προκύπτει από το άνωθι διάγραμμα:

$C_{DPPH} = 0{,}0362 \times A_{515} + 10^{-5}$ **(3)** με R^2=0,9999

Για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αντιοξειδωτικού-DPPH, έγινε αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση DPPH, και στη συνέχεια κατασκευάστηκε το γράφημα C_{ant}-ΔC_{DPPH}. Τέλος, έγινε προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας, από την οποία υπολογίστηκε το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο (μέσω της κλίσης), αλλά και ο δείκτης IC_{50}.

5.3.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων του εκάστοτε δείγματος έγινε με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε 250μL δείγματος προστίθενται 250μL αντιδραστηρίου DNS. Το δείγμα αφήνεται να βράσει για 5 λεπτά, στη συνέχεια προστίθενται 2 mL απιονισμένου νερού και το δείγμα φωτομετρείται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος λ=540 nm. Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο αυτή έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι η εξής:

$C_{gl} = 1{,}4838 * A_{540}$ **(4)** με R^2=0,995

5.3.5 Προσδιορισμός γλυκόζης

Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο *GOD/PAP* (Glucotest) με χρήση ενζυμικού σκευάσματος (kit). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 240 μL ενζυμικού σκευάσματος *GOD/PAP* τοποθετούνται σε πλακέτα *ELISA microplate* και στη συνέχεια προστίθενται 10 μL δείγματος. Η πλακέτα στη συνέχεια τοποθετείται στο θάλαμο του φωτόμετρου microplate reader ο οποίος έχει θερμοκρασία 37˚C, όπου μετά το πέρας 15 λεπτών γίνεται φωτομέτρηση σε μήκος κύματος λ=510 nm. Ο προσδιορισμός των σακχάρων σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, γίνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, η εξίσωση της οποίας είναι η εξής:

$C_{gl} = 1{,}0344 * A_{510}$ **(5)** με R^2=0,9967

5.3.6 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας

Τα φασματόμετρα μάζας (mass spectrometers – MS), λειτουργούν μετατρέποντας τα μόρια της προς ανάλυση ουσίας στην ιονισμένη τους κατάσταση, με την επακόλουθη ανάλυση των ιόντων και τον ιοντικών θραυσμάτων που προκύπτουν κατά τον ιονισμό των μορίων, με βάση το λόγο μάζας προς το φορτίο τους (m/z) (Pitt, 2009). Επομένως με την φασματομετρία μάζας είναι δυνατός ο προσδιορισμός μίας ένωσης με βάση το φάσμα μάζας της, καθώς η μορφή αυτού είναι χαρακτηριστική για κάθε ένωση.

Η υγρή χρωματογραφία (*liquid chromatography – LC*) είναι μια χρωματογραφική τεχνική που προσδιορίζει με μεγάλη ακρίβεια τα φάσματα οργανικών και ανόργανων χημικών ενώσεων μέσω μίας στατικής και μίας κινητής φάσης.

Προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων μέσω της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με τη φασματομετρία μάζας (*LC-MS*), αυτά προετοιμάστηκαν με έγχυση μέσα από φιλτράκι *Nylon Valuprep*, διαμέτρου 0,45 μm, ούτως ώστε να απομακρυνθούν οποιαδήποτε στερεά υπολείμματα με διάμετρο μεγαλύτερη από 0,45 nm. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με χρήση υγρού χρωματογράφου (*VARIAN 212 – LC*) συζευγμένου με φασματόμετρο μάζας. Η εισαγωγή των δειγμάτων στον υγρό χρωματογράφο έγινε μέσω βαλβίδας 6 οπών - 2 θέσεων. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται μίγμα νερού με μικρή ποσότητα (1 ppm) φορμικού οξέος (A) και ακετονυτριλίου (B) μεταβαλλόμενης σύστασης. Η παροχή των διαλυτών ήταν 1 mL/min με αρχική σύσταση 90% (A) και 10% (B), η οποία σταδιακά μεταβαλλόταν έτσι ώστε να επιτευχθεί η τελική σύσταση 10% (A) και 90% (B) μετά το πέρας 40 λεπτών. Ο χρόνος ανάλυσης κάθε δείγματος ήταν 40 λεπτά περίπου. Τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με την τεχνική του αρνητικού και θετικού χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (*APCI negative positive*). Ο

διαχωρισμός επετεύχθη με χρωματογραφική στήλη *HYPERSIL BDS C18* 5 μm διαστάσεων 250×4,6mm. Για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε *Mass Spectrometer Varian 500* με παγίδα ιόντων (*Ion Trap*) και εύρος μαζών (*Mass Range*) 40-650. Πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των ενώσεων των προς ανάλυση δειγμάτων, έγινε αρχικά ανάλυση ορισμένων πρότυπων ενώσεων.

Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα - Συζήτηση

6.1 Συμβατική εκχύλιση και εκχύλιση με μικροκύματα

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7), παρουσιάζεται η απώλεια βάρους του κάθε δείγματος μετά την εκχύλιση (συμβατική ή ΜΑΕ).

Πίνακας 7. Ποσοστό απώλειας βάρους του εκάστοτε δείγματος μετά την εκχύλιση

	% απώλεια βάρους
Συμβατική Εκχύλιση	75,63%
Καρπός / ΜΑΕ (1)	43,42%
Καρπός / ΜΑΕ (2)	58,35%
Σπόρος / ΜΑΕ (1)	11,84%
Σπόρος / ΜΑΕ(2)	10,55%
Φλοιός / ΜΑΕ (1)	58,00%
Φλοιός / ΜΑΕ (2)	51,37%

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 7, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το δείγμα που υπέστη τη μεγαλύτερη απώλεια βάρους ήταν αυτό που εκχυλίστηκε με συμβατική εκχύλιση σε 40% αιθανολικό διάλυμα. Αναλογικά και συγκρίνοντας μόνο μεταξύ των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με ΜΑΕ, μεγαλύτερη απώλεια βάρους είχε το δείγμα φλοιού του τριαντάφυλλου. Μικρότερη απώλεια βάρους είχε το δείγμα του σπόρου του καρπού.

6.1.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις

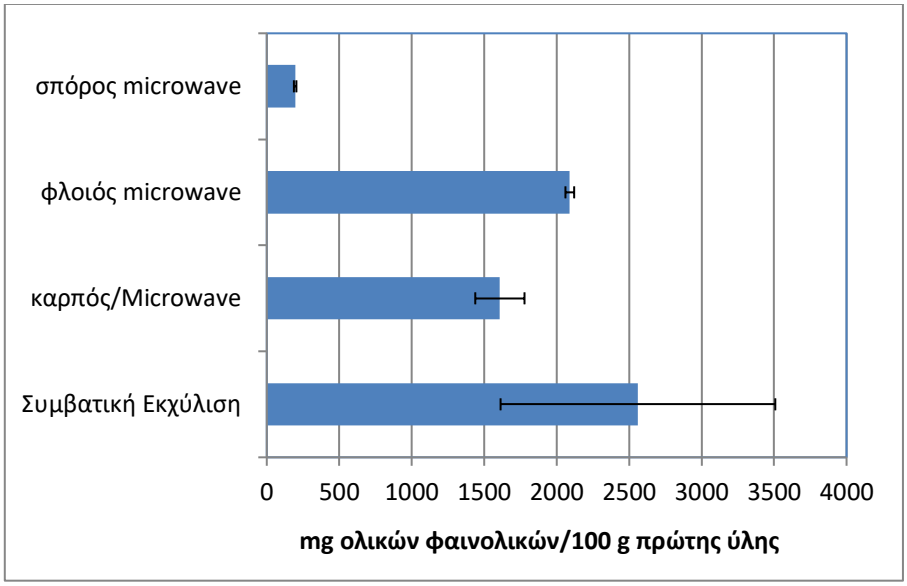
Ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων έγινε στα εκχυλίσματα των αιθανολικών διαλυμάτων που αναφέρονται στα κεφάλαια 4.2.1 και 4.2.2 και βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 1). Ως εκ τούτου οι ολικές φαινολικές ενώσεις εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις στο εκάστοτε εκχύλισμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Ολικές φαινολικές ενώσεις στα δείγματα εκφρασμένες σε και mg/100 g καρπού

Ολικά φαινολικά	mg φαινολικών/100 g καρπού	± SD
Συμβατική Εκχύλιση	2560,70	947,61
Καρπός / MAE	1608,29	169,80
Φλοιός / MAE	2090,67	30,10
Σπόρος / MAE	195,83	8,55

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται οι ποσότητες (σε mg/100 g πρώτης ύλης) των ολικών φαινολικών ενώσεων κάθε εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 4. Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε εκχύλισμα (σε mg) ανά 100 g πρώτης ύλης

Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι μεγαλύτερο περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις περιέχει το εκχύλισμα που προήλθε από τη συμβατική εκχύλιση του καρπού σε 40% αιθανολικό διάλυμα. Αντίστοιχα, προκύπτει ότι μικρότερο περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζει το εκχύλισμα που προήλθε από την MAE του σπόρου του καρπού σε 40% αιθανολικό διάλυμα. Παρατηρούμε επίσης ότι το εκχύλισμα του καρπού που προήλθε από συμβατική εκχύλιση, περιείχε μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων από το εκχύλισμα του καρπού που προήλθε από τη MAE. Ως εκ τούτου συμπεραίνουμε ότι η συμβατική εκχύλιση έδωσε καλύτερη απόδοση σε ολικές φαινολικές ενώσεις απ' ότι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Παρόλα αυτά, συγκρίνοντας μεταξύ των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο της MAE, αυτό που είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές φαινολικές ενώσεις ήταν το δείγμα του φλοιού, ενώ αυτό με τη μικρότερη ήταν το δείγμα σπόρου του καρπού. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το μεγαλύτερο

ποσοστό των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στον καρπό του τριαντάφυλλου βρίσκεται στον φλοιό αυτού.

6.1.2 Ολικά φλαβονοειδή

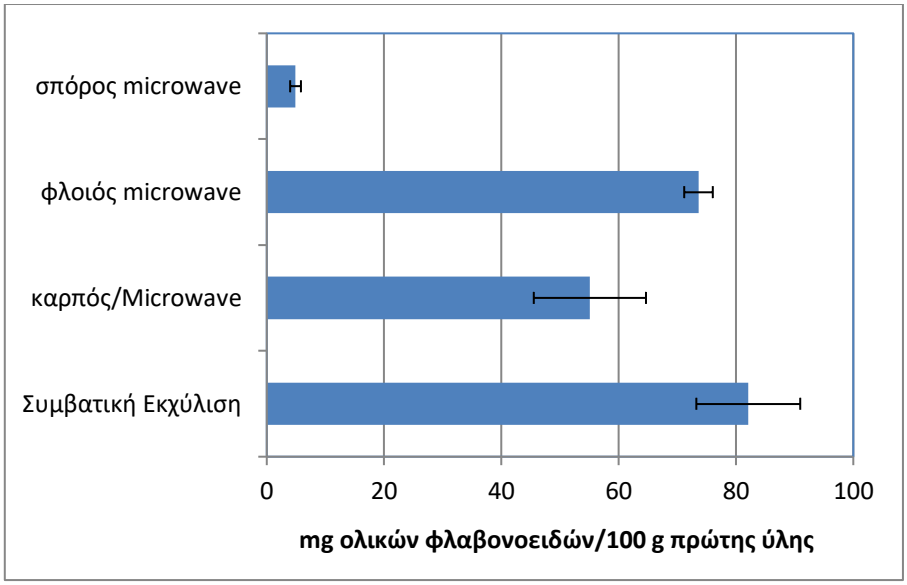
Ο υπολογισμός των ολικών φλαβονοειδών έγινε στα εκχυλίσματα των αιθανολικών διαλυμάτων που αναφέρονται στα κεφάλαια 4.2.1 και 4.2.2 και βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (Διάγραμμα 2). Ως εκ τούτου τα ολικά φλαβονοειδή εκφράζονται σε ισοδύναμα κατεχίνης.

Τα ολικά φλαβονοειδή στο εκάστοτε εκχύλισμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Ολικά φλαβονοειδή σε κάθε εκχύλισμα εκφρασμένα σε mg/L εκχυλίσματος και σε mg/ 100 g πρώτης ύλης

Ολικά φλαβονοειδή	mg φλαβονοειδών/ 100 g πρώτης ύλης	± SD
Συμβατική Εκχύλιση (40% ο/ο, αιθανολικό διάλυμα)	82,09	8,86
Καρπός / ΜΑΕ	55,09	9,57
Φλοιός / ΜΑΕ	73,61	2,44
Σπόρος / ΜΑΕ	4,91	0,92

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται οι ποσότητες (σε mg) των ολικών φλαβονοειδών κάθε εκχυλίσματος ανά 100 g πρώτης ύλης (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5 Ποσότητα ολικών φλαβονοειδών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε εκχύλισμα (σε mg) ανά 100 g πρώτης ύλης

Παρατηρούμε ότι τα ολικά φλαβονοειδή ακολουθούν παρόμοιο προφίλ με αυτό των ολικών φαινολικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, είναι εμφανές ότι το εκχύλισμα που εμφάνισε μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβοβονοειδών είναι αυτό της συμβατικής εκχύλισης σε αιθανολικό διάλυμα 40%, ενώ το αμέσως επόμενο συγκριτικά, ήταν το εκχύλισμα φλοιού του καρπού που εκχυλίστηκε με MAE σε 40% αιθανολικό διάλυμα. Παρόμοια επίσης συμπεριφορά με αυτή των ολικών φαινολικών ενώσεων, ακολουθούν τα ολικά φλαβονοειδή των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με MAE. Αναλυτικότερα, μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών εμφάνισε το εκχύλισμα του φλοιού, ενώ ακολούθησε αυτό του συνολικού καρπού. Μικρότερη συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή επέδειξε το εκχύλισμα σπόρου του καρπού. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, συμπεραίνουμε ότι καλύτερη απόδοση σε ολικά φλαβονοειδή δίνει η συμβατική εκχύλιση σε αιθανολικό διάλυμα συγκριτικά με την MAE. Από τα αποτελέσματα των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με MAE όμως, συμπεραίνουμε ότι από το σύνολο των ολικών φλαβονοειδών που υπάρχουν στον καρπό του τριαντάφυλλου, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών βρίσκεται στον φλοιό.

6.1.3 Αντιοξειδωτική Δράση

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του τριαντάφυλλου, βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 3) του αντιδραστηρίου DPPH. Βάση της συγκεκριμένης καμπύλης έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος DPPH αλλά και του μη ανηγμένου DPPH μετά το πέρας της εκάστοτε αντίδρασης.

Η ποσοστιαία αναστολή του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6, απ' όπου φαίνεται ότι η συγκέντρωση του προς εκχύλιση στερεού, η οποία θα οδηγήσει σε 50% αναστολή του DPPH, ποικίλει ανάλογα με τη μέθοδο προκατεργασίας και την πρώτη ύλη.

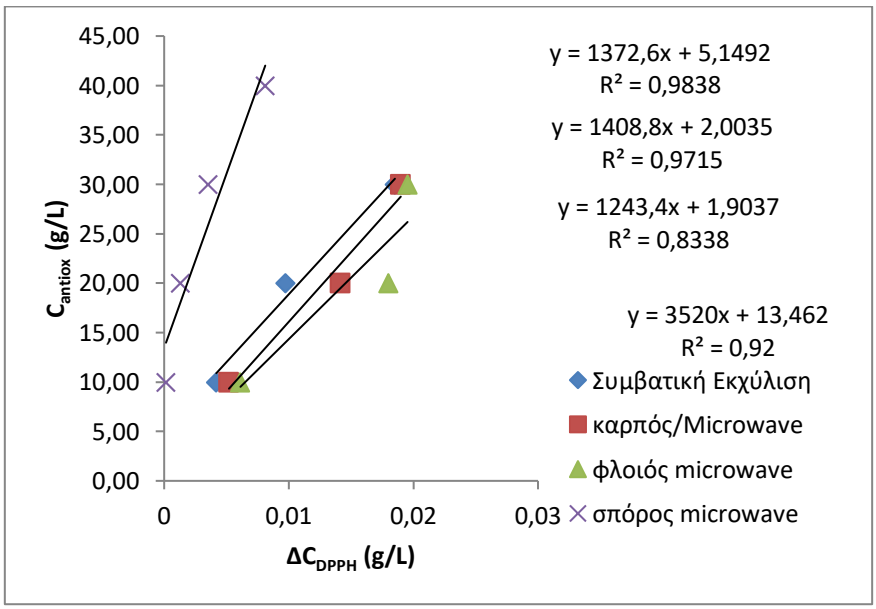
Προκειμένου να γίνει ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50}, ο οποίος υποδηλώνει την απαιτούμενη ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για να δεσμεύσει το 50% της ρίζας DPPH, άρα είναι ενδεικτικός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκάστοτε δείγματος, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε τιμές συγκέντρωσης DPPH, μέσω της καμπύλης αναφοράς.
- Κατασκευή του γραφήματος C_{antiox} - ΔC_{DPPH}, και προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας
- Υπολογισμός του δείκτη IC_{50} μέσω των συντελεστών της βέλτιστης ευθείας, σύμφωνα με τον τύπο:

  $$IC_{50}\left(\frac{mg}{L}\right) = 0{,}5 \times C_{0,DPPH} \times \alpha + \beta \quad \textbf{(6)}$$

  Όπου:
  - → α: η κλίση της ευθείας του εκάστοτε δείγματος
  - → β: ο σταθερός όρος της ευθείας του εκάστοτε δείγματος.

Στο παρακάτω γράφημα, παρουσιάζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε συνάρτηση με τη διαφορά συγκέντρωσης DPPH (αρχική συγκέντρωση – τελική μετά το πέρας της αντίδρασης) (Διάγραμμα 6).



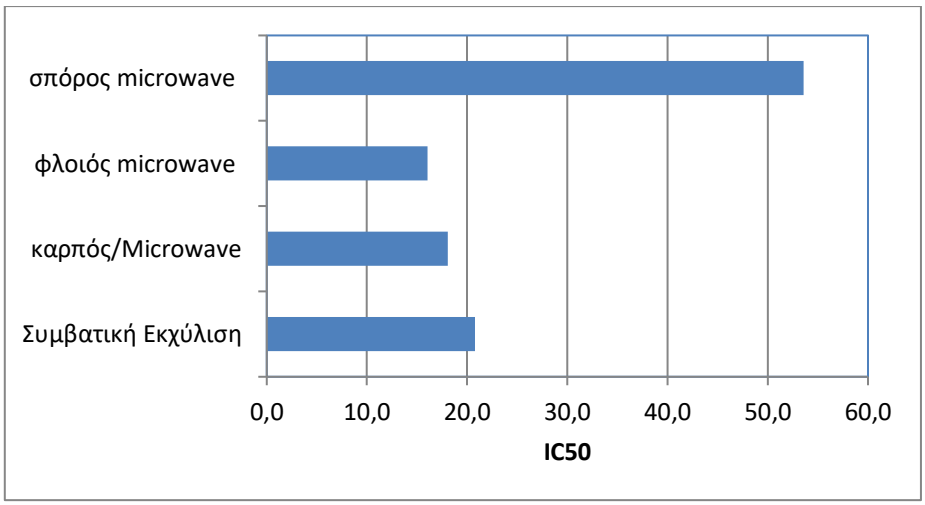
Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού του εκάστοτε δείγματος σε (g/L) σε συνάρτηση με τη διαφορά συγκέντρωσης DPPH σε (g/L)

Με βάση τις εξισώσεις που προκύπτουν από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50} του εκάστοτε δείγματος (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Δείκτης IC_{50} του εκάστοτε δείγματος υπολογισμένος με βάση τους συντελεστές της βέλτιστης ευθείας του γραφήματος 7

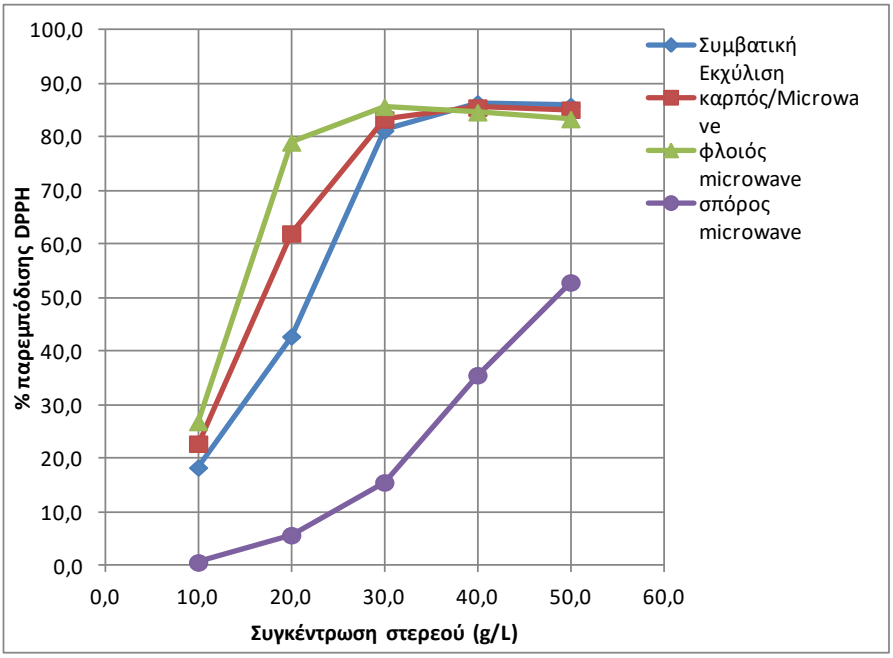
	IC_{50}
Συμβατική Εκχύλιση	20,78
Καρπός/ΜΑΕ	18,05
Φλοιός/ΜΑΕ	16,07
Σπόρος/ΜΑΕ	53,55

Με βάση τον υπολογισμό του δείκτη IC_{50} του εκάστοτε δείγματος, γίνεται η κατασκευή του παρακάτω γραφήματος.



Διάγραμμα 7. Δείκτης IC50 του εκάστοτε δείγματος

Ο δείκτης IC_{50} γίνεται φανερός και από το κάτωθι διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό παρεμπόδισης του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του στερεού στο εκάστοτε εκχύλισμα (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8 Ποσοστό παρεμπόδισης του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του στερεού στο εκάστοτε εκχύλισμα σε (g/L)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει το εκχύλισμα φλοιού του καρπού της MAE σε 40% αιθανολικό διάλυμα, ενώ μικρότερη παρουσιάζει το εκχύλισμα σπόρου που υπέστη την ίδια ακριβώς εκχύλιση. Συγκρίνοντας μεταξύ του εκχυλίσματος καρπού του τριαντάφυλλου της MAE και αυτού της συμβατικής εκχύλισης, παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασε το πρώτο. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε ότι η MAE είχε καλύτερη απόδοση συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για το δείγμα καρπού. Παρόλα αυτά αποδεικνύεται ότι ο φλοιός του καρπού του τριαντάφυλλου είναι αυτός που έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα για τις ολικές φαινολικές ενώσεις και τα ολικά φλαβονοειδή, που και τα δύο βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στον φλοιό του καρπού του τριαντάφυλλου.

Οι Nadpal et al., 2016, μελέτησαν τη συμβατική εκχύλιση του καρπού του τριαντάφυλλου Rosa Canina L. σε μεθανολικό διάλυμα 80% v/v με αναλογία στερεού/υγρού 10% w/v, για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και βρήκαν μέσω της μεθόδου DPPH τον δείκτη IC_{50} ίσο με 21,7 ± 2,04. Ο δείκτης αυτός φαίνεται ότι δεν έχει μεγάλη απόκλιση από τη δική μας πειραματική μέτρηση. Ωστόσο είναι φανερό ότι η χρήση της αιθανολικού διαλύματος με μικρότερη αναλογία $EtOH/H_2O$ οδηγεί σε αυξημένη αντιοξειδωτική δράση.

6.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση συνδυασμένη με συμβατική εκχύλιση

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συμβατική και την ΜΑΕ εκχύλιση, συμπεραίνουμε ότι το μέρος του καρπού το οποίο είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση βιοδραστικών ενώσεων ήταν ο φλοιός. Ως εκ τούτου οι ΕΥΕ σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση έγιναν σε δείγματα φλοιού του καρπού του τριαντάφυλλου.

6.2.1 ΕΥΕ με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2

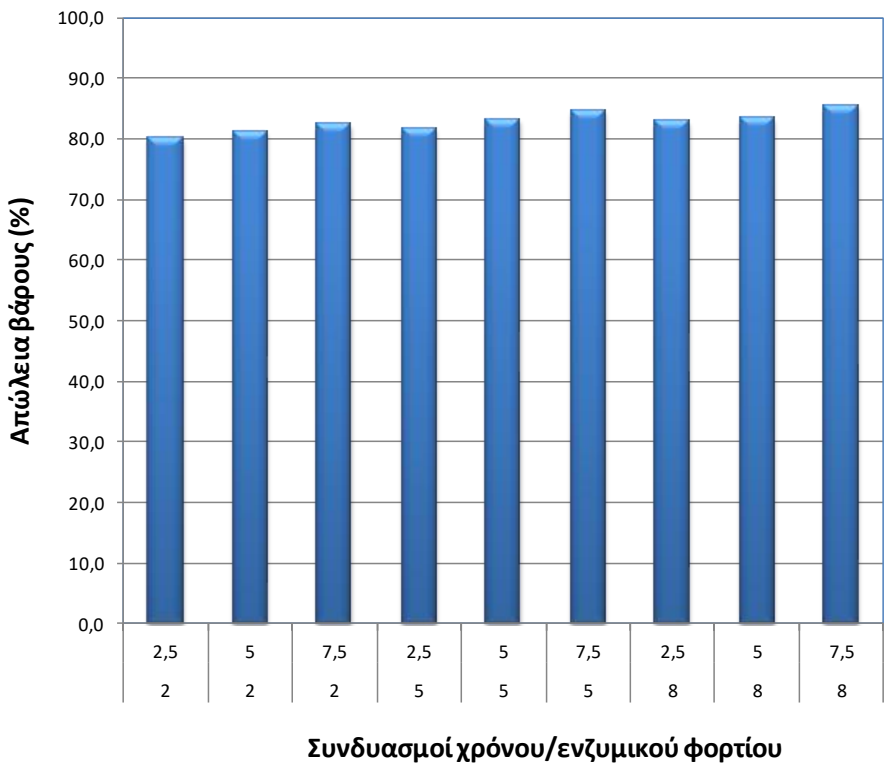
Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα *Cellic CTec2* παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

Μαζί με τις ΕΥΕ, έγινε και μία υδατική εκχύλιση του φλοιού του καρπού σε 40% αιθανολικό διάλυμα τελικού όγκου 50 mL, με αναλογία στερεού/υγρού (S/L) 2% (w/v).

Τα αποτελέσματα των πειραματισμών παρουσιάζονται στους πίνακες και τα διαγράμματα που ακολουθούν. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμού *Minitab 17* (2013, Minitab INC).

6.2.1.1 Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.



Διάγραμμα 9. Απώλεια βάρους (%) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 11. Απώλεια βάρους (%) μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	74,83
5	-	72,62
8	-	74,48
	Συμβατική Εκχύλιση	75,63

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η απώλεια βάρους κυμάνθηκε από 80 – 85 %, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη απώλεια βάρους που κυμάνθηκε από 73 – 76 %, με το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εξ' αυτών.

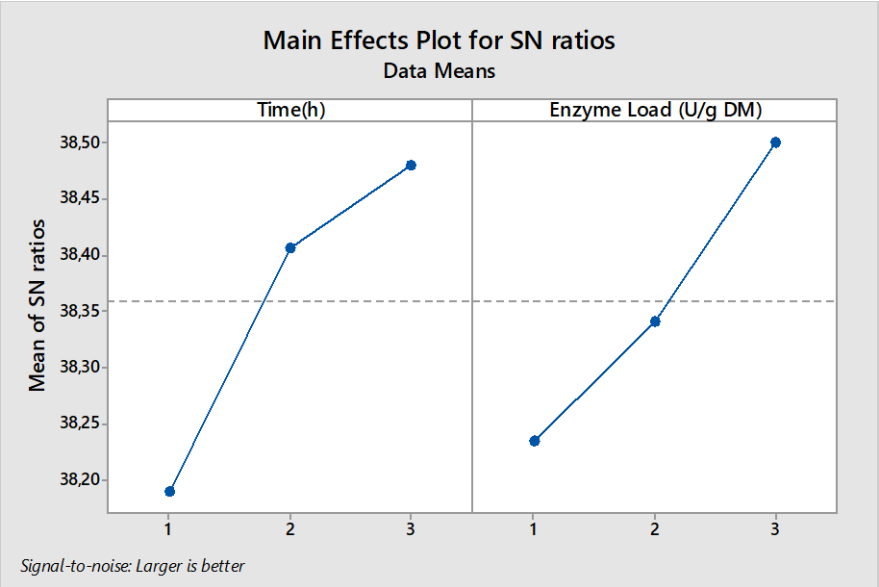
Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 12. Πειραματικές τιμές της απώλειας βάρους (%) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	80,20	38,08
1	2	81,09	38,18

1	3	82,27	38,30
2	1	81,74	38,25
2	2	83,27	38,41
2	3	84,76	38,56
3	1	82,92	38,37
3	2	83,50	38,43
3	3	85,44	38,63

Ανάλογα με τη φύση του κάθε ποιοτικού χαρακτηριστικού ο πειραματιστής μπορεί να επιθυμεί την μεγιστοποίησή του (Larger-the-Best), την ελαχιστοποίησή του (Smaller-the Best) ή όσο γίνεται την μικρότερη απόκλισή του από μια συγκεκριμένη τιμή (Nominal-the-Best) (βλ. παράγραφο 5.2.4). Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (*Main effect*) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 13 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 10. Τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους για τους δύο παράγοντες ελέγχου

Πίνακας 13. Μέσες τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους

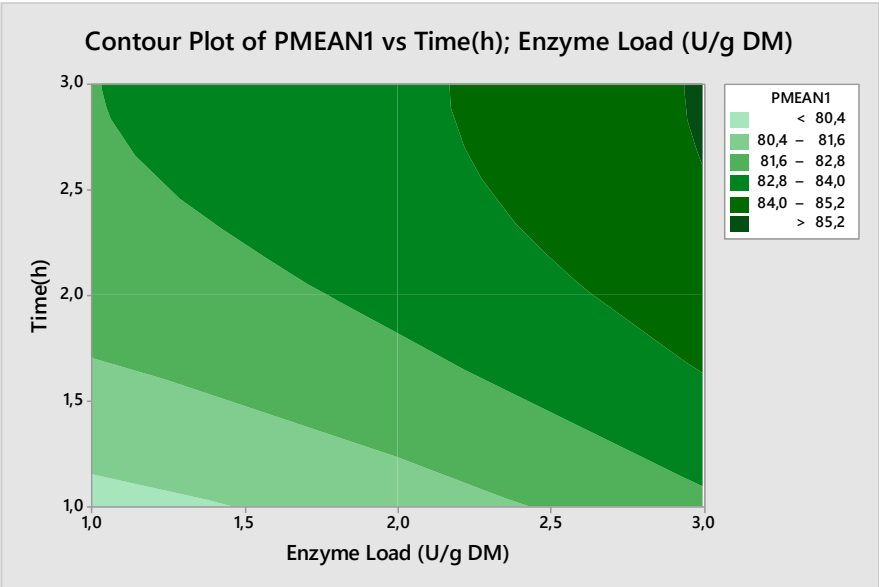
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	38,19	38,23
2	38,41	38,34
3	38,48[α]	38,50[α]
(max-min)	0,29	0,27
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 38,36

Σύμφωνα με τους Hasçalik & Çaydaş, (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 13, ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 3,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απώλεια βάρους.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απώλεια βάρους παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 11).

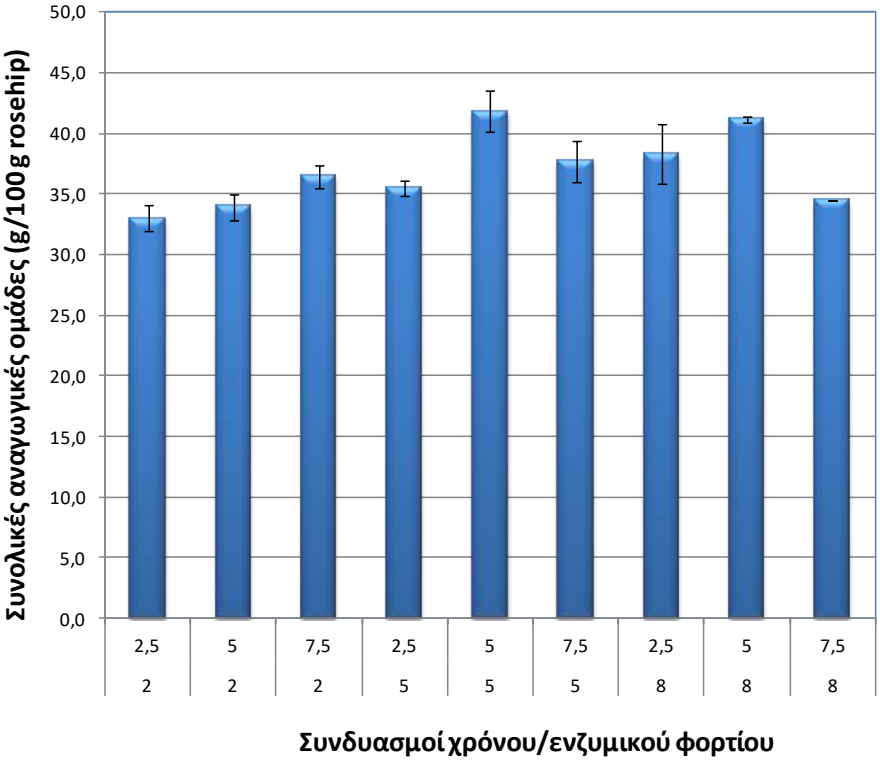


Διάγραμμα 11 Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό πως μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

6.2.1.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 12, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα των εκχυλισμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14



Διάγραμμα 12. Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g φλοιού) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 14. Ποσότητα ολικών αναγωγικών σακχάρων σε g/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	33,34	1,25
5	**Blank**	32,74	0,66
8	**Blank**	36,36	1,31
	Συμβατική Εκχύλιση	29,00	0,17

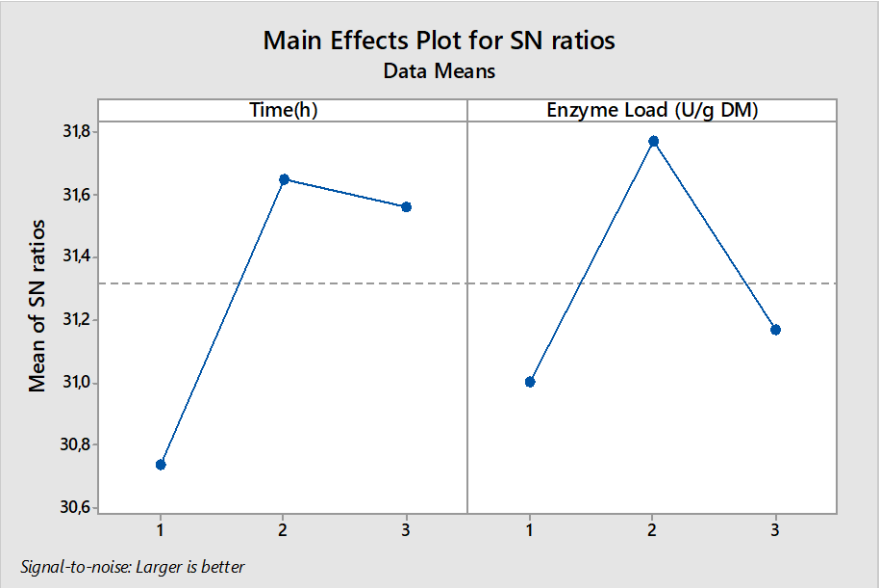
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα κυμάνθηκαν από 33 – 42 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη ποσότητα αναγωγικών σακχάρων που κυμάνθηκε από 29 – 36 g/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 15. Πειραματικές τιμές των ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	33,01	30,37
1	2	33,94	30,61
1	3	36,45	31,23
2	1	35,52	31,01
2	2	41,82	32,42
2	3	37,74	31,52
3	1	38,30	31,64
3	2	41,18	32,29
3	3	34,50	30,76

Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 16 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 13. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα για τους 2 παράγοντες ελέγχου

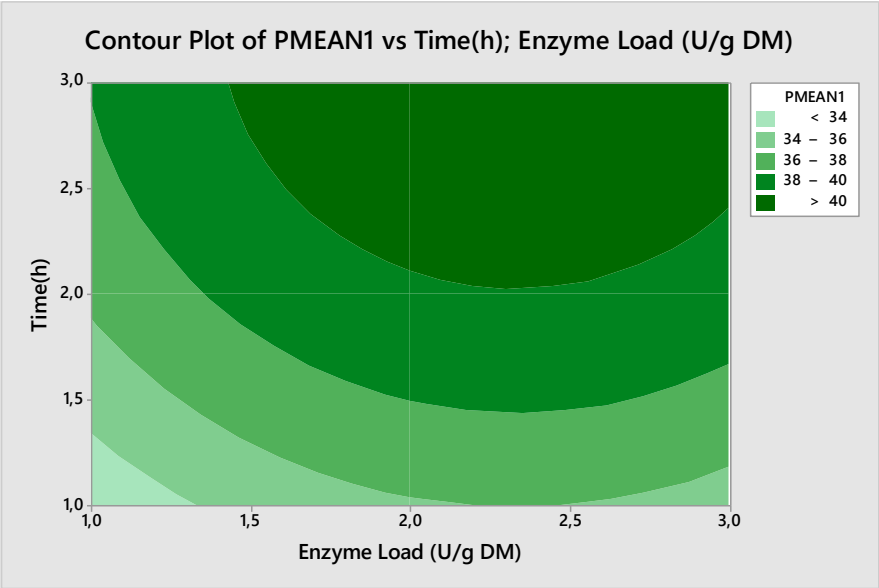
Πίνακας 16 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	30,73	31,00
2	31,65[α]	31,77[α]
3	31,56	31,17
(max-min)	0,91	0,77
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 31,31

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 16 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 2,2). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

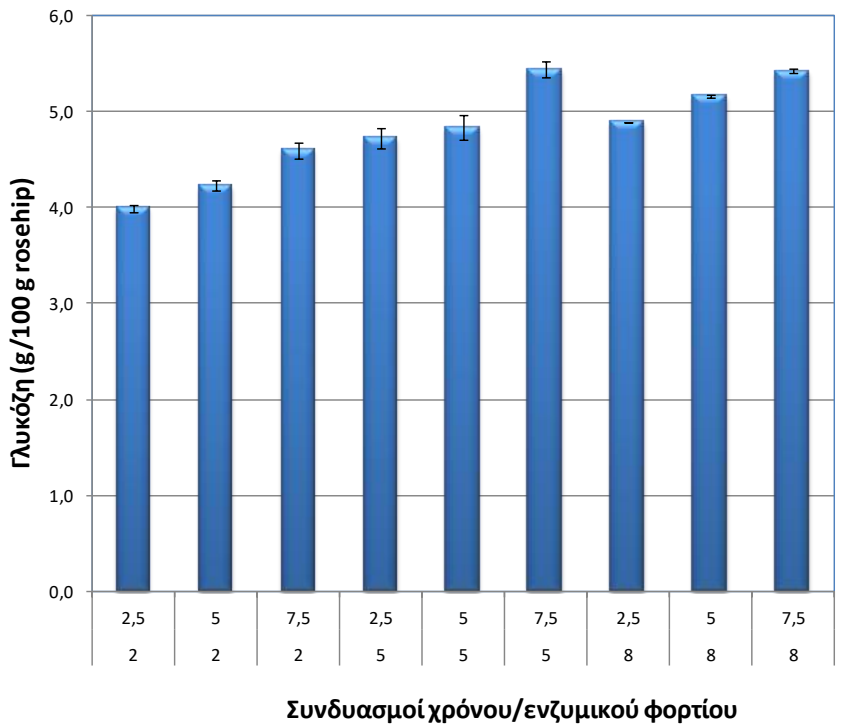
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι εμφανές ότι μεγάλη ποσότητα ολικών αναγωγικών σακχάρων απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

Η ποσότητα γλυκόζης της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 15, ενώ η ποσότητα γλυκόζης των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.



Διάγραμμα 15. Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 17 Ποσότητα γλυκόζης σε g/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	-	4,74	0,15
5	-	4,79	0,12
8	-	5,48	0,16
	Συμβατική Εκχύλιση	4,51	0,18

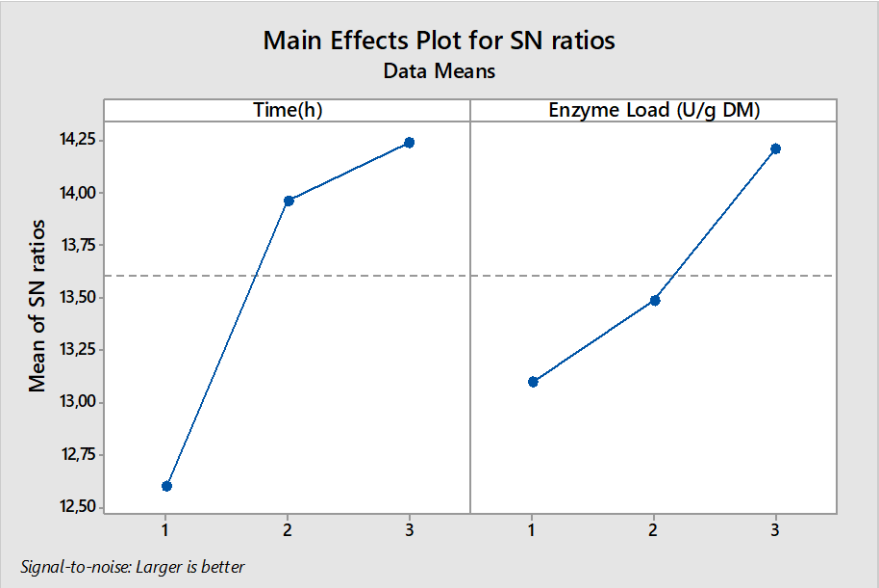
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η γλυκόζη κυμάνθηκε από 4 – 5,5 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν παραπλήσιες ποσότητες γλυκόζης που κυμάνθηκαν από 4,5 – 5,5 g/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 18 Πειραματικές τιμές της γλυκόζης (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	3,99	12,02
1	2	4,23	12,53
1	3	4,60	13,25
2	1	4,73	13,49
2	2	4,84	13,69
2	3	5,44	14,71
3	1	4,89	13,79
3	2	5,16	14,26
3	3	5,42	14,68

Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τη γλυκόζη και στον Πίνακα 19 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 16. Τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη για τους 2 παράγοντες ελέγχου

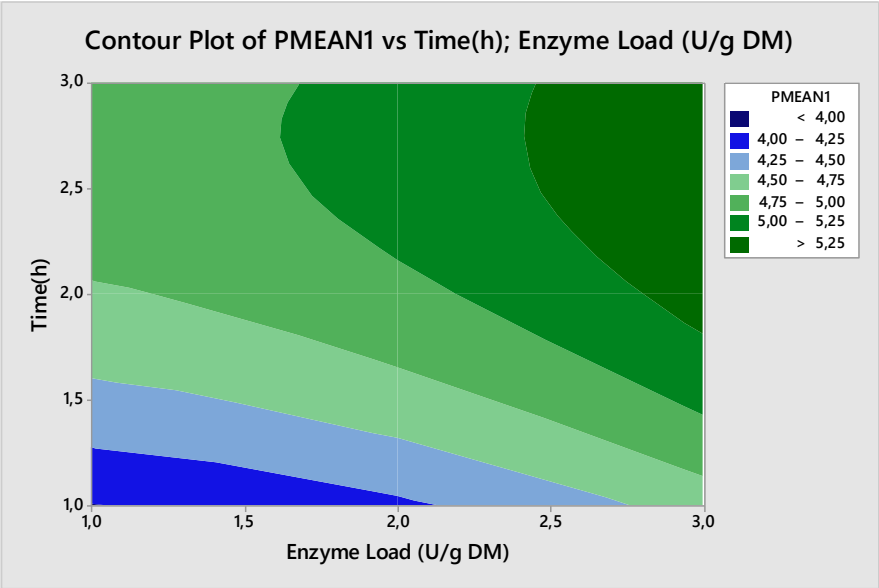
Πίνακας 19 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	12,60	13,10
2	13,96	13,49
3	14,24[α]	14,21[α]
(max-min)	1,65	1,11
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 13,6

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 19 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 3,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 17).

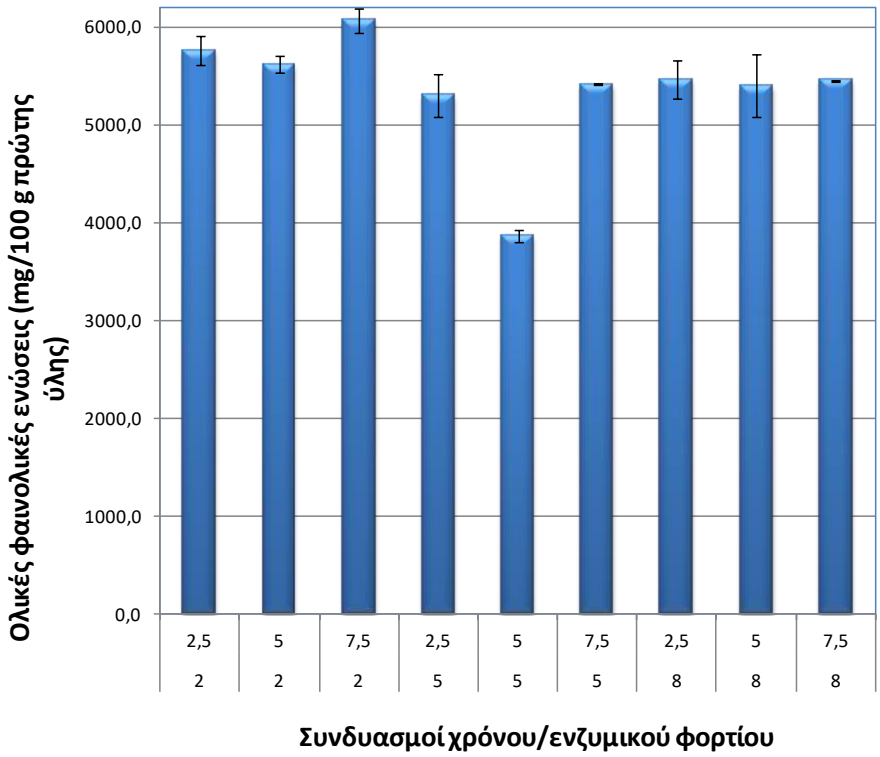


Διάγραμμα 17. Ισοϋψείς καμπύλες γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι εμφανές ότι μεγάλη ποσότητα γλυκόζης απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

6.2.1.3 Ολικές Φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18, ενώ αυτές των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.



Διάγραμμα 18. Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 20 Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων (mg/100 g πρώτης ύλης) μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	-	5585,00	114,96
5	-	5163,81	20,90
8	-	5198,29	195,07
	Συμβατική Εκχύλιση	2560,70	374,50

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), οι ολικές φαινολικές ενώσεις κυμάνθηκαν από 3868 – 6065 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερες ποσότητες από αυτά της ΕΥΕ που κυμάνθηκαν από 2561

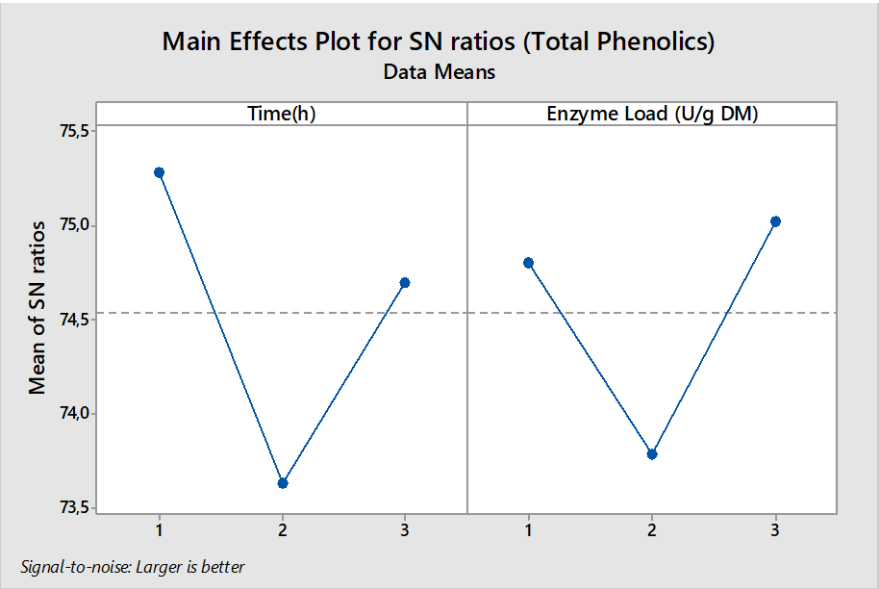
– 5585 mg/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 21. Πειραματικές τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων (mg/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	5759,52	75,20
1	2	5616,66	74,99
1	3	6064,94	75,65
2	1	5296,45	74,47
2	2	3867,84	71,75
2	3	5414,68	74,67
3	1	5459,02	74,73
3	2	5399,90	74,62
3	3	5454,09	74,73

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τις ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 22 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 19. Τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις για τους 2 παράγοντες

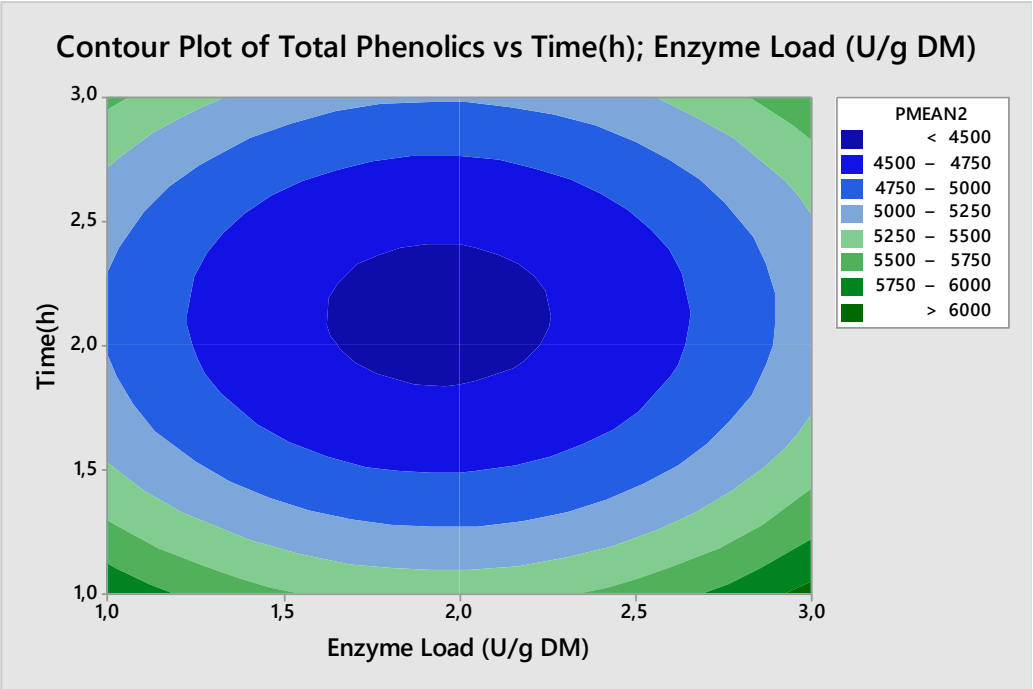
Πίνακας 22 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	75,28[α]	74,80
2	73,63	73,79
3	74,70	75,02[α]
(max-min)	1,65	1,23
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 74,54

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 1,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 20).

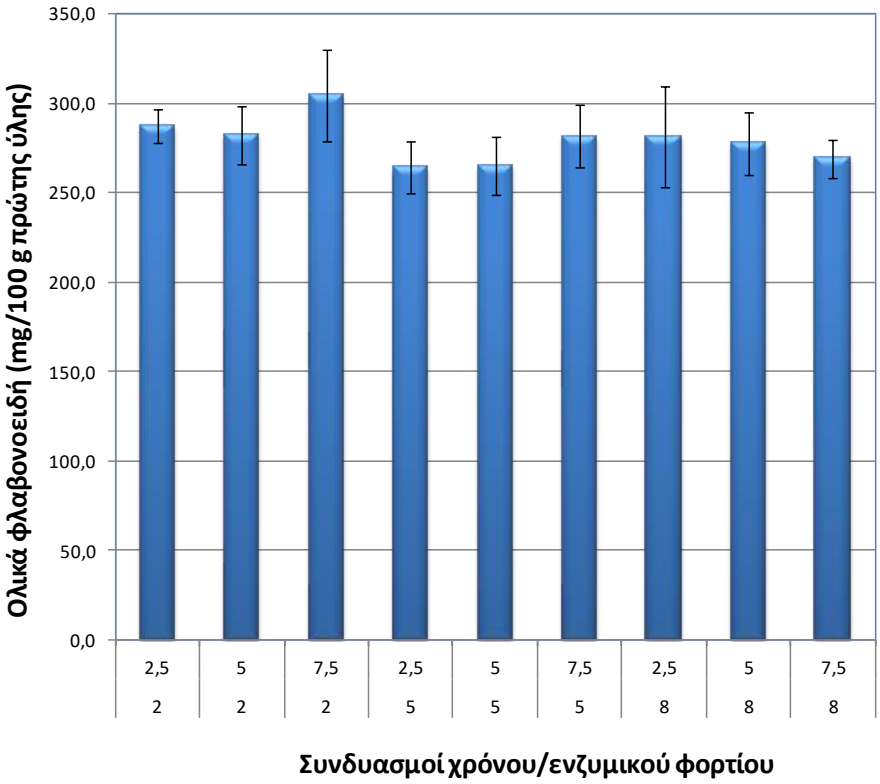


Διάγραμμα 20. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών φαινολικών ενώσεων απαιτούν είτε χαμηλά ενζυμικά φορτία σε μικρούς ή μεγάλους χρόνους κατεργασίας, είτε υψηλά ενζυμικά φορτία σε μικρούς ή μεγάλους χρόνους κατεργασίας.

6.2.1.4 Ολικά φλαβονοειδή

Τα ολικά φλαβονοειδή της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 21, ενώ αυτά των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 23.



Διάγραμμα 21. Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 23. Ποσότητα ολικών φλαβονοειδών (mg/100 g πρώτης ύλης) μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	290,17	2,71
5	**Blank**	288,26	27,07
8	**Blank**	217,43	35,20
	Συμβατική Εκχύλιση	82,09	8,86

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα ολικά φλαβονοειδή κυμάνθηκαν από 264 – 305 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν ελαφρώς μικρότερες ποσότητες από τα περισσότερα εκχυλίσματα

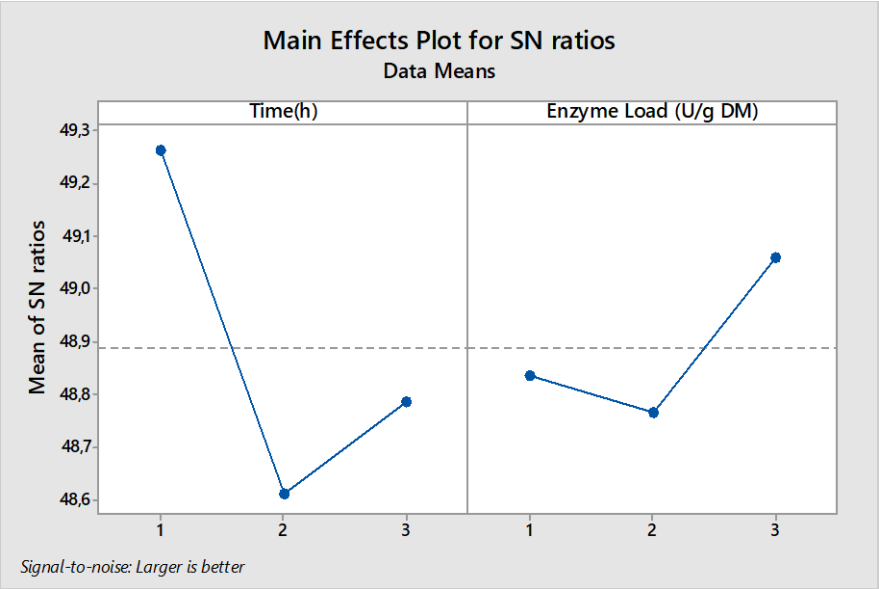
της ΕΥΕ που κυμάνθηκαν από 82 – 290 mg/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 24 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 24. Πειραματικές τιμές των ολικών φλαβονοειδών (mg/100 g πρώτης ύλης)και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	287,30	49,16
1	2	282,51	49,00
1	3	304,53	49,63
2	1	264,33	48,42
2	2	265,29	48,45
2	3	281,56	48,97
3	1	281,56	48,92
3	2	277,73	48,85
3	3	269,11	48,59

Στο Διάγραμμα 22 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά φλαβονοειδή και στον Πίνακα 25 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 22. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή για τους 2 παράγοντες ελέγχου

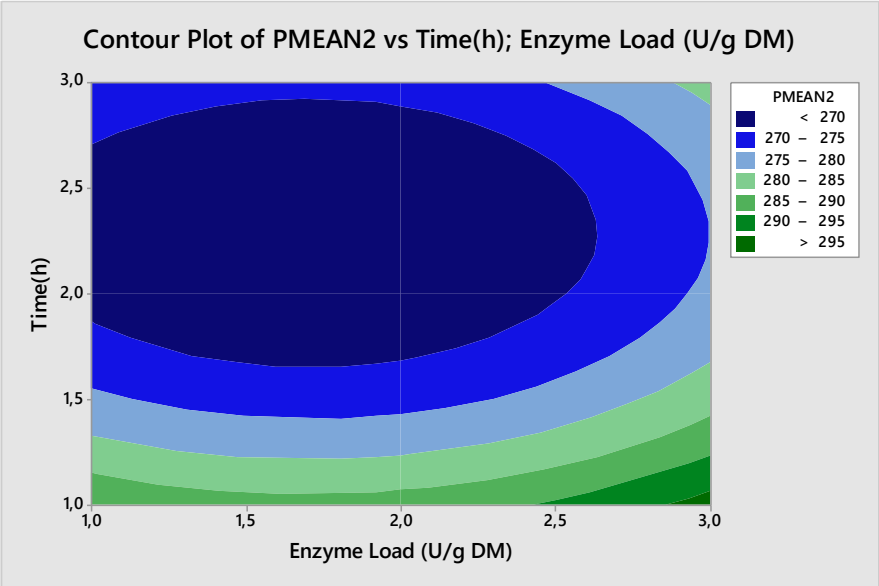
Πίνακας 25. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	49,26[α]	48,84
2	48,61	48,77
3	48,79	49,06[α]
(max-min)	0,65	0,29
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 48,89

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 25 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 1,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 23).

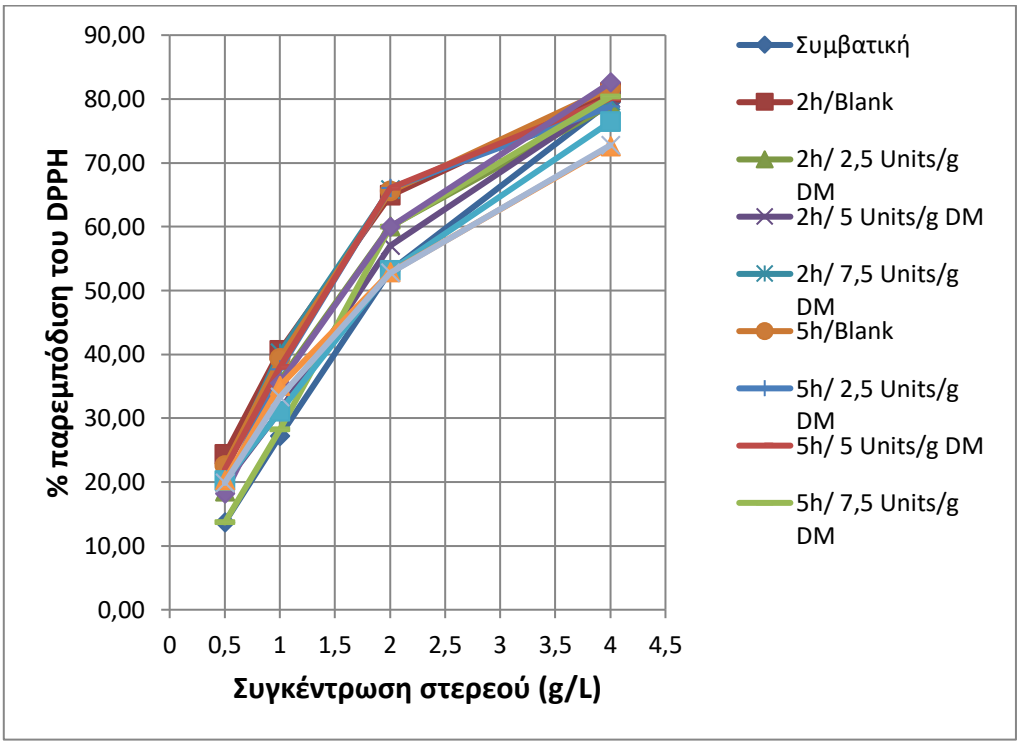


Διάγραμμα 23 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών φλαβονοειδών απαιτούν υψηλά ενζυμικά φορτία και μικρούς χρόνους κατεργασίας.

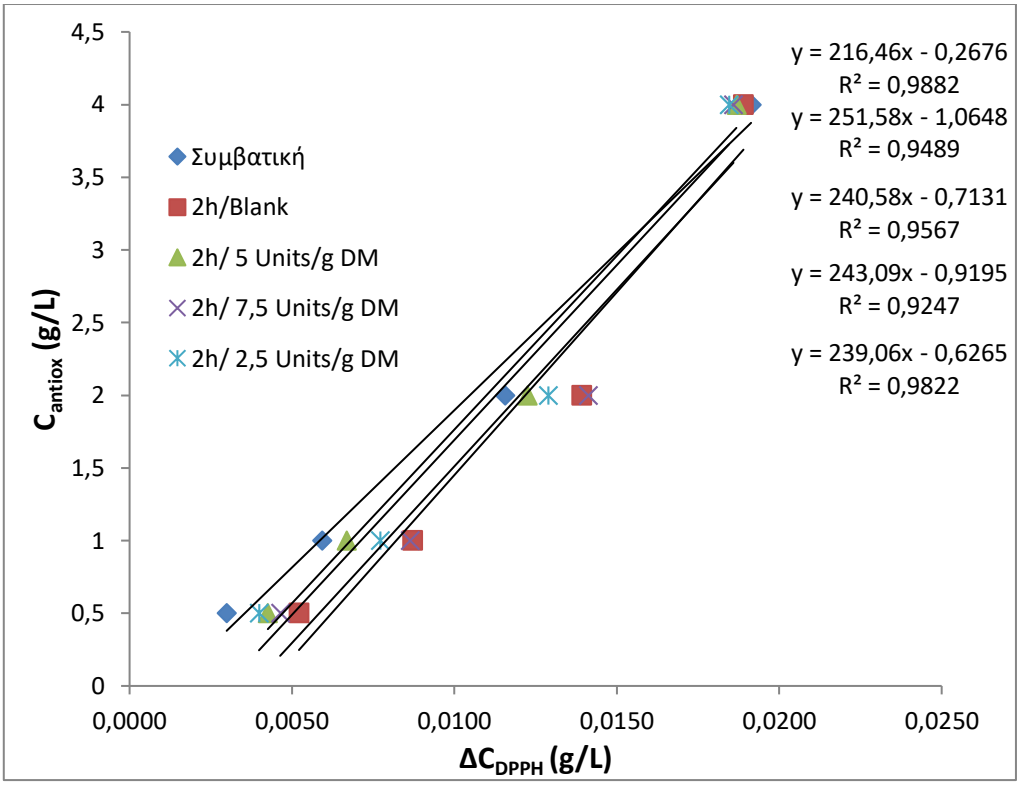
6.2.1.5 Αντιοξειδωτική δράση

Αντίστοιχα με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης στα εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης και της MAE (βλ. κεφάλαιο 6.1.3), για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (3) που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς του DPPH (Διάγραμμα 3). Η ποσοστιαία αναστολή του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος παρουσιάζεται στο διάγραμμα 24, απ' όπου φαίνεται η συγκέντρωση του προς εκχύλιση στερεού που θα οδηγήσει σε 50% αναστολή του DPPH δεν διαφοροποιείται πολύ μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών.

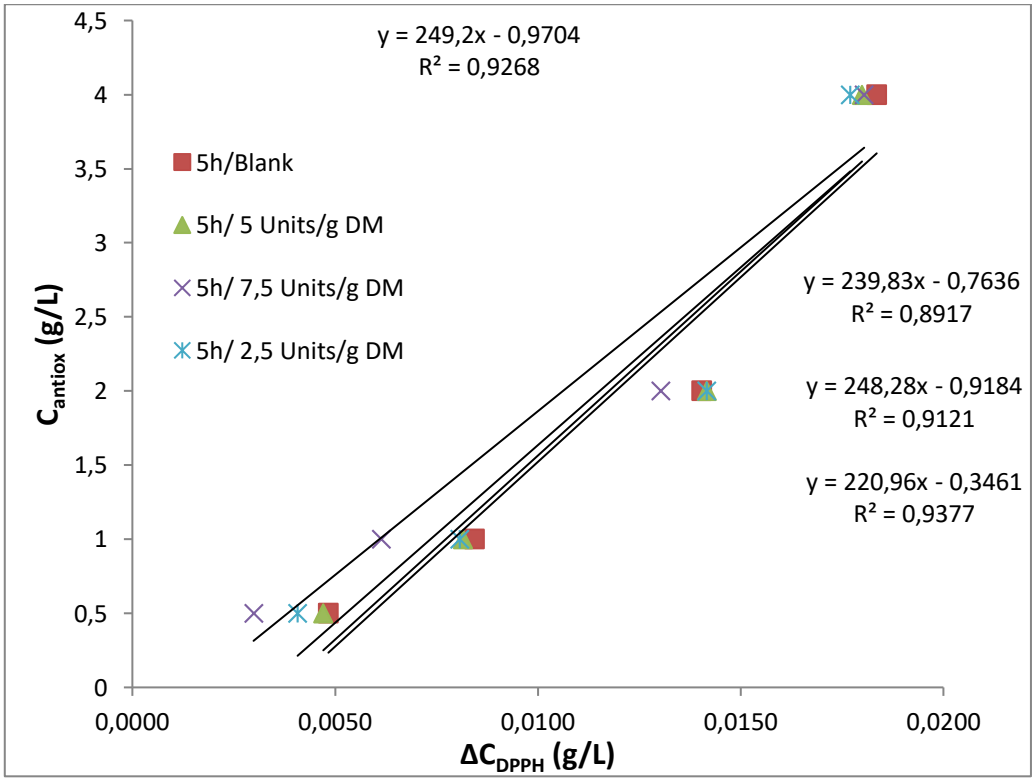


Διάγραμμα 24. Ποσοστό παρεμπόδισης του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του στερεού δείγματος (g/L)

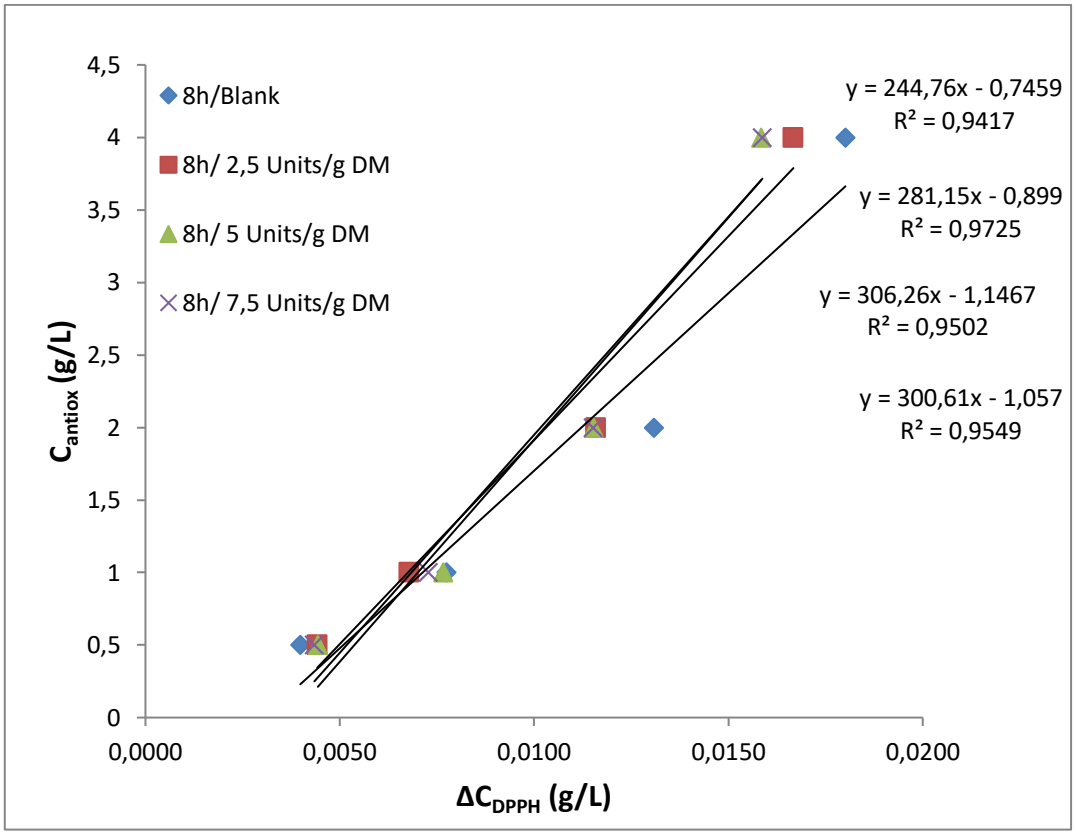
Στα παρακάτω γραφήματα, παρουσιάζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε συνάρτηση με τη διαφορά συγκέντρωσης DPPH για κάθε ένα από τα δείγματα (αρχική συγκέντρωση – τελική μετά το πέρας της αντίδρασης) (Διάγραμμα 25, 26, 27) και στη συνέχεια γίνεται ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50} μέσω των συντελεστών της βέλτιστης ευθείας όπως και στην παράγραφο 6.1.3.



Διάγραμμα 25. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 2 ώρες και για τη συμβατική εκχύλιση



Διάγραμμα 26. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 5 ώρες



Διάγραμμα 27. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 8 ώρες

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ο κάτωθι πίνακας με τις τιμές του IC_{50} για κάθε εκχύλισμα (Πίνακας 26).

Πίνακας 26 Τιμές του δείκτη IC_{50} για κάθε δείγμα

	IC_{50}
Συμβατική	2,2
2h / Blank	1,6
2h / 2,5 Units/g DM	1,9
2h / 5 Units/g DM	1,9
2h / 7 Units/g DM	1,7
5h / Blank	1,7
5h / 2,5 Units/g DM	1,8
5h / 5 Units/g DM	1,7
5h / 7,5 Units/g DM	2,0
8h / Blank	1,9
8h / 2,5 Units/g DM	2,2
8h / 5 Units/g DM	2,2
8h / 7,5 Units/g DM	2,2

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα και τους πίνακες, παρατηρούμε ότι η κατά 50% αναστολή του DPPH κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,6 – 2,2 g/L και ως εκ τούτου δεν διαφοροποιείται πολύ μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών. Παρόλα αυτά είναι φανερό ότι μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζουν τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία με το ένζυμο για 8 ώρες (ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης του ενζύμου), αλλά και το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης.

6.2.2 ΕΥΕ με χρήση του ενζύμου Viscozyme L.

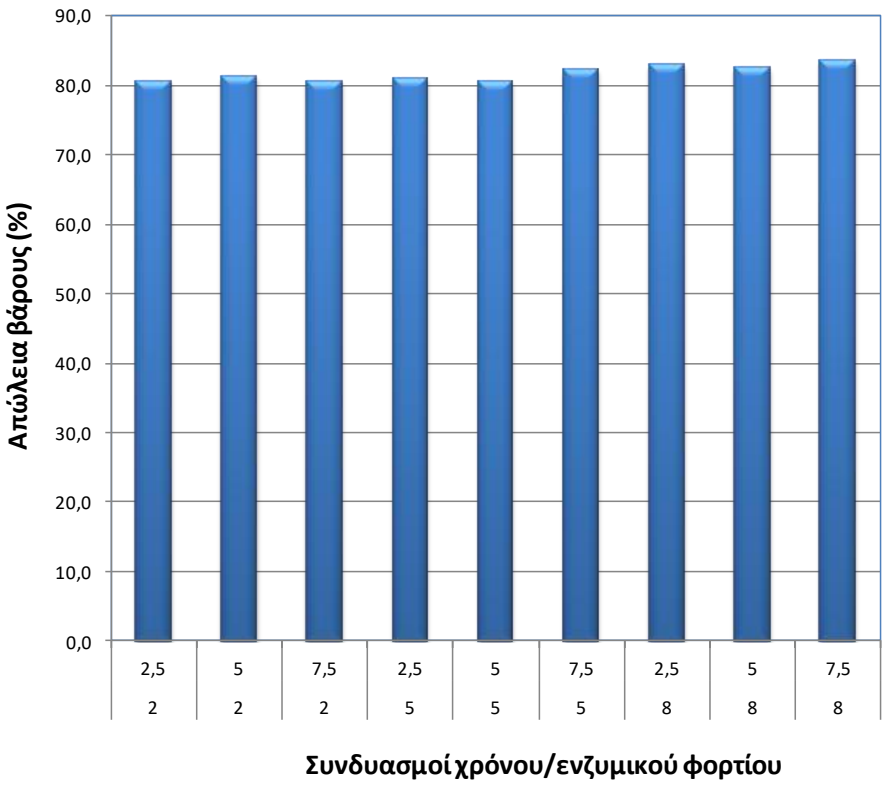
Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα *Viscozyme L.* παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

Μαζί με τις ΕΥΕ, έγινε και μία υδατική εκχύλιση του φλοιού του καρπού σε 40% αιθανολικό διάλυμα τελικού όγκου 50 mL, με αναλογία στερεού/υγρού (S/L) 2% (w/v).

Τα αποτελέσματα των πειραματισμών παρουσιάζονται στους πίνακες και τα διαγράμματα που ακολουθούν. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμού *Minitab 17* (2013, Minitab INC).

6.2.2.1 Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 28, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.



Διάγραμμα 28. Απώλεια βάρους (%) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 27 Απώλεια βάρους (%) μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας(h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	**Blank**	74,83
5	**Blank**	72,62
8	**Blank**	74,48
	Συμβατική Εκχύλιση	75,63

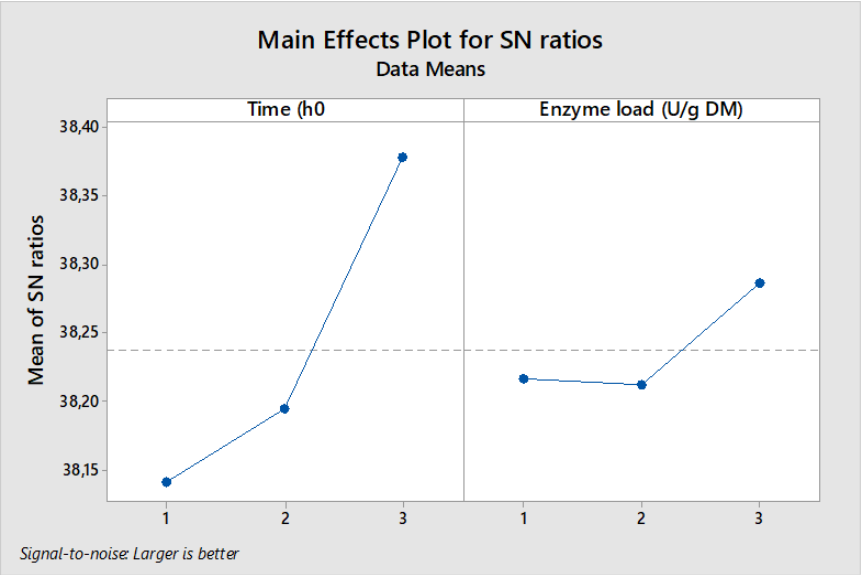
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η απώλεια βάρους κυμάνθηκε από 81 – 84 %, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη απώλεια βάρους που κυμάνθηκε από 73 – 76 %, με αυτό της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 28 Πειραματικές τιμές της απώλειας βάρους (%) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	80,60	38,13
1	2	81,20	38,19
1	3	80,40	38,11
2	1	80,90	38,16
2	2	80,50	38,12
2	3	82,30	38,31
3	1	82,80	38,36
3	2	82,50	38,33
3	3	83,60	38,44

Στο Διάγραμμα 29 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 29 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 29. Τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους για τους 2 παράγοντες ελέγχου

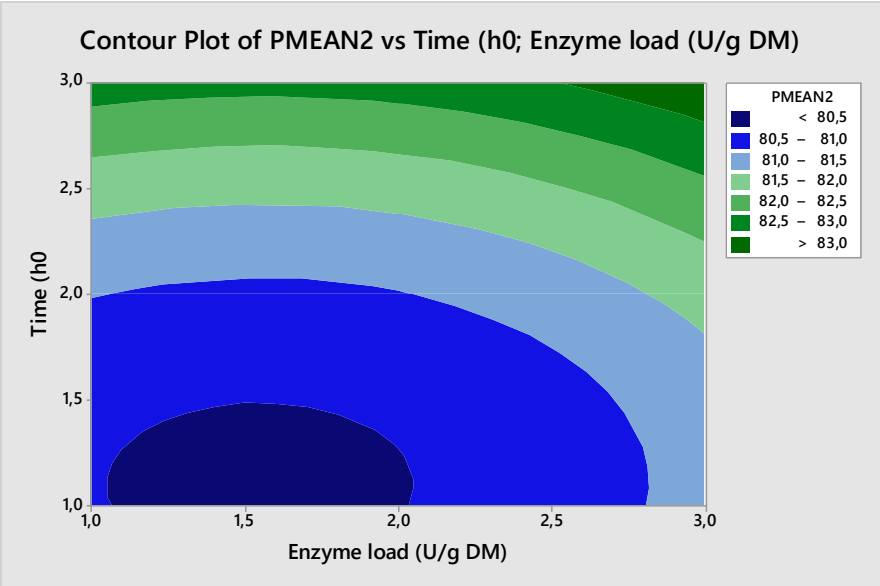
Πίνακας 29. Μέσες τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	38,14	38,22
2	38,19	38,21
3	38,38[α]	38,29[α]
(max-min)	0,24	0,07
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 38,24

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 29, ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 3,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απώλεια βάρους.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απώλεια βάρους παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 30).

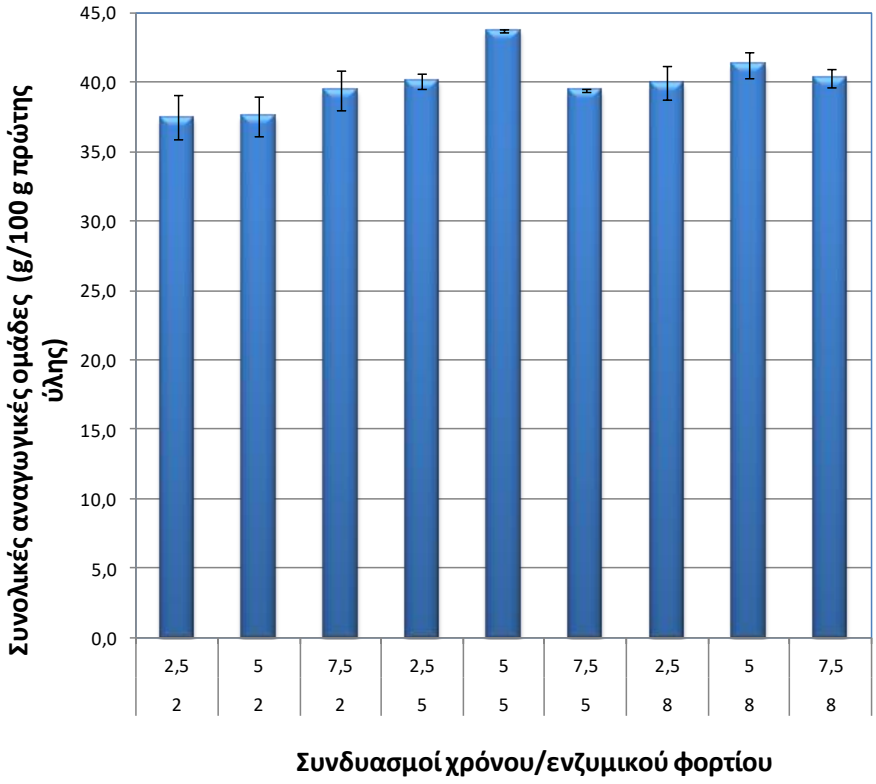


Διάγραμμα 30. Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

6.2.2.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 31, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 30.



Διάγραμμα 31. Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g φλοιού) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 30. Ποσότητα ολικών αναγωγικών σακχάρων σε g/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	33,34	1,25
5	**Blank**	32,74	0,66
8	**Blank**	36,36	1,31
	Συμβατική Εκχύλιση	29,00	0,17

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα κυμάνθηκαν από 37 – 44 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη ποσότητα αναγωγικών σακχάρων που κυμάνθηκε από 29

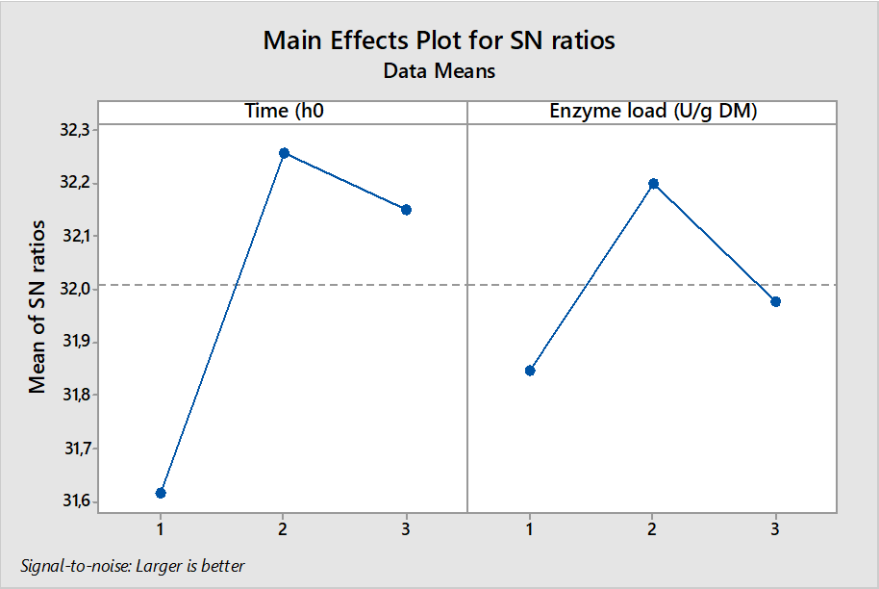
– 36 g/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 31. Πειραματικές τιμές των ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	37,47	31,46
1	2	37,56	31,48
1	3	39,41	31,90
2	1	40,06	32,05
2	2	43,68	32,81
2	3	39,41	31,91
3	1	39,97	32,03
3	2	41,27	32,31
3	3	40,34	32,11

Στο Διάγραμμα 32 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 32 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 32. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα για τους 2 παράγοντες ελέγχου

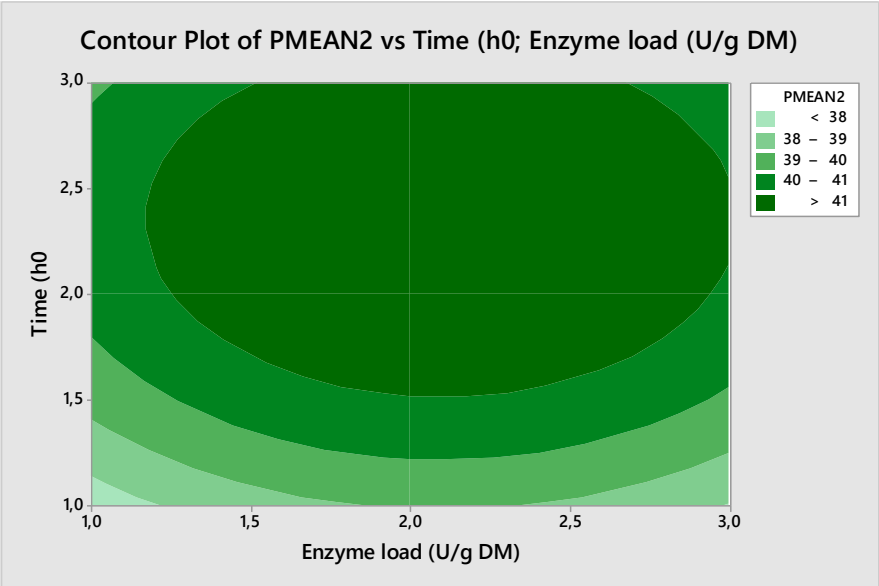
Πίνακας 32. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	31,62	31,85
2	32,26[α]	32,20[α]
3	32,15	31,98
(max-min)	0,64	0,35
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 32,01

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 32 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 2,2). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

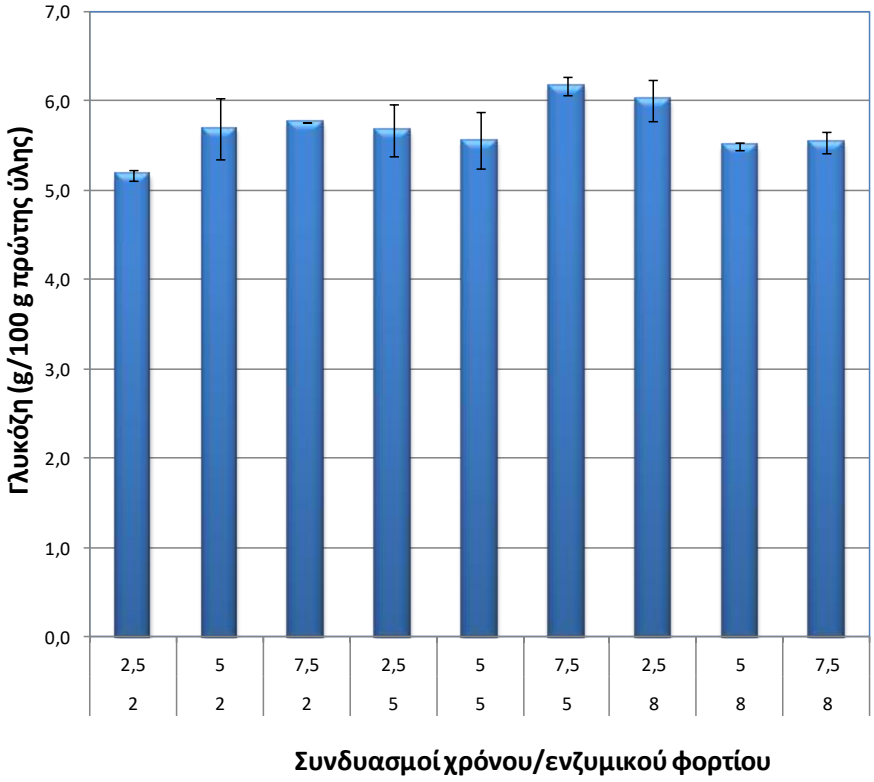
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 33).



Διάγραμμα 33. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών αναγωγικών σακχάρων απαιτούν μέσα ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

Η ποσότητα γλυκόζης της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 34, ενώ η ποσότητα γλυκόζης των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 33.



Διάγραμμα 34. Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 33. Ποσότητα γλυκόζης σε g/100 g πρώτης ύλης σύμφωνα με τη μέθοδο Glucotest

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	4,74	0,15
5	**Blank**	4,79	0,12
8	**Blank**	5,48	0,16
	Συμβατική Εκχύλιση	4,51	0,18

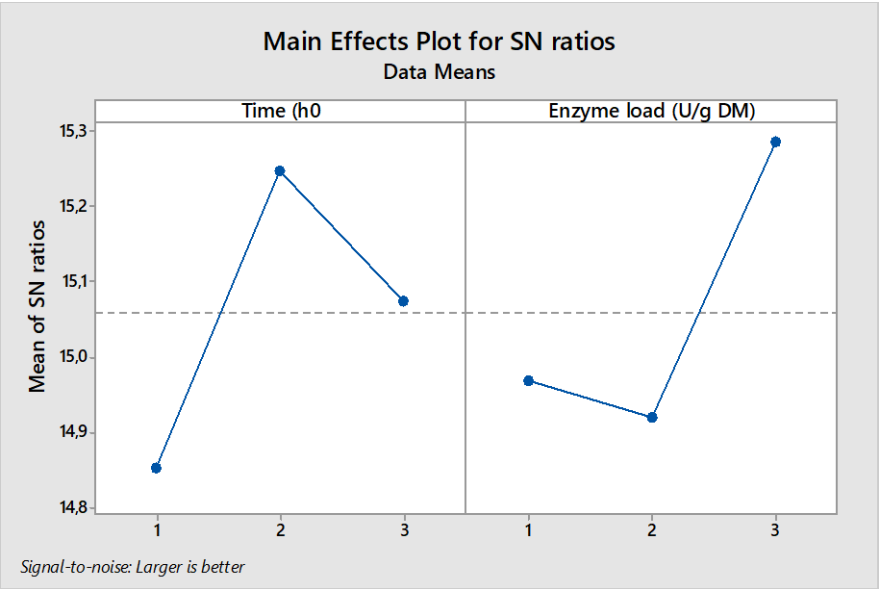
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η γλυκόζη κυμάνθηκε από 5,2 – 6,1 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη ποσότητα γλυκόζης που κυμάνθηκε από 4,5 – 5,5 g/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 34 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 34. Πειραματικές τιμές της γλυκόζης (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	5,18	14,28
1	2	5,69	15,07
1	3	5,76	15,21
2	1	5,68	15,06
2	2	5,56	14,88
2	3	6,17	15,80
3	1	6,01	15,57
3	2	5,50	14,80
3	3	5,53	14,85

Στο Διάγραμμα 35 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τη γλυκόζη και στον Πίνακα 35 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 35. Τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη για τους 2 παράγοντες ελέγχου

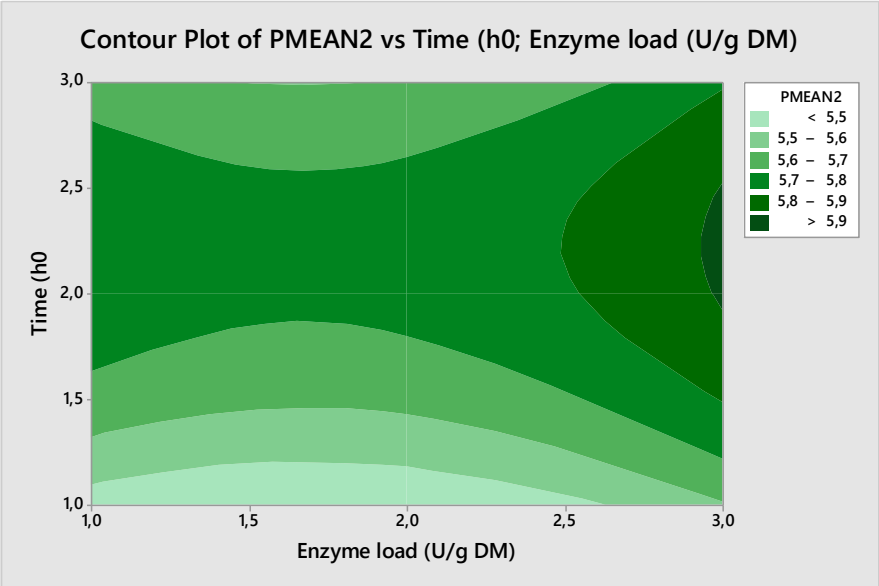
Πίνακας 35 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	14,85	14,97
2	15,25[α]	14,92
3	15,07	15,29[α]
(max-min)	0,40	0,37
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 15,06

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 35 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 2,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 36).

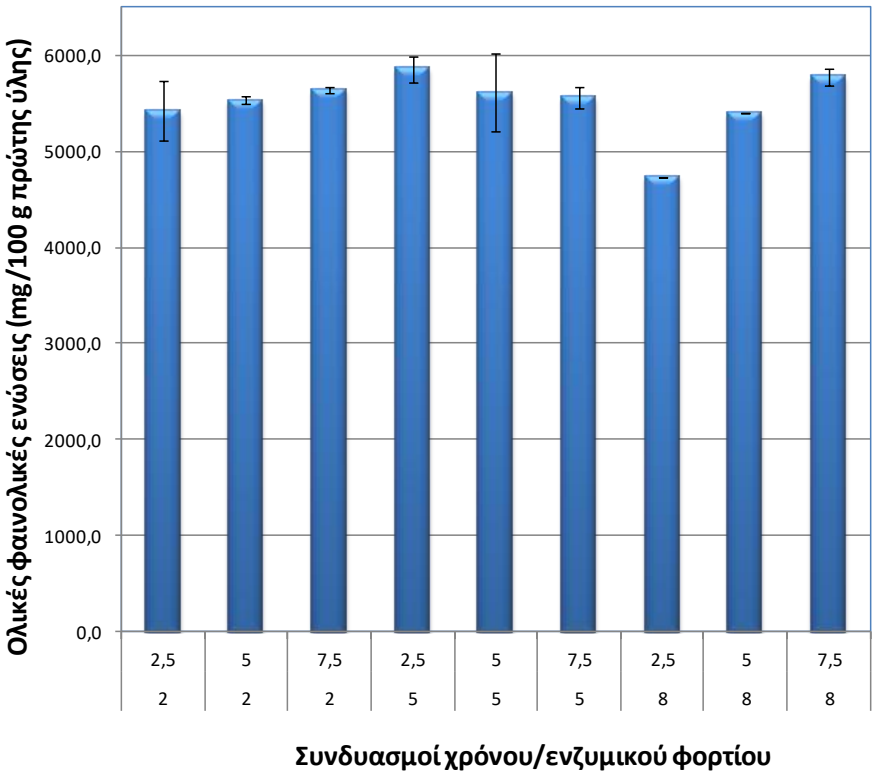


Διάγραμμα 36. Ισοϋψείς καμπύλες γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλη ποσότητα γλυκόζης απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

6.2.2.3 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 37, ενώ αυτές των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 36.



Διάγραμμα 37. Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 36. Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων σε mg/100 g πρώτης ύλης

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	5585,00	114,96
5	**Blank**	5163,81	20,90
8	**Blank**	5198,29	195,07
	Συμβατική Εκχύλιση	2560,70	374,50

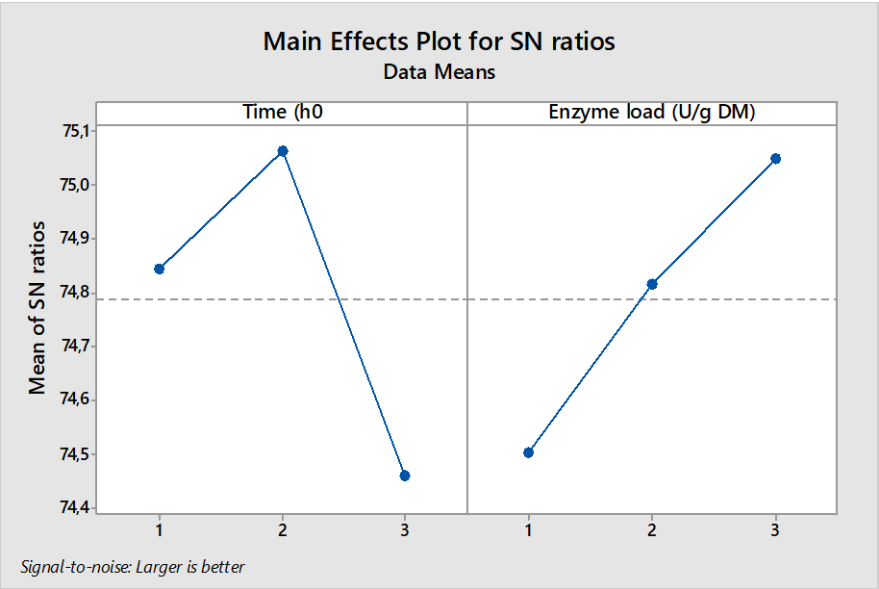
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), οι ολικές φαινολικές ενώσεις κυμάνθηκαν από 4731 – 5854 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερες ποσότητες που κυμάνθηκαν από 2561 – 5585 mg/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 37 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 37. Πειραματικές τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων (mg/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	5420,335	74,65968
1	2	5528,713	74,85211
1	3	5637,09	75,02094
2	1	5853,845	75,34513
2	2	5607,533	74,9416
2	3	5558,27	74,89617
3	1	4730,66	73,49843
3	2	5400,63	74,64889
3	3	5775,025	75,22971

Στο Διάγραμμα 38 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τις ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 38 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 38. Τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις για τους 2 παράγοντες ελέγχου

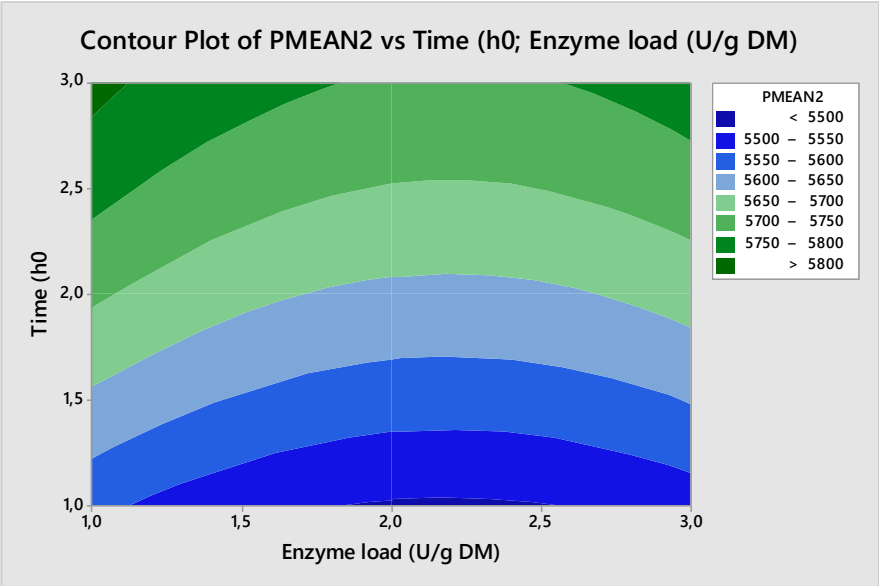
Πίνακας 38. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	74,84	74,50
2	75,06[α]	74,81
3	74,46	75,05[α]
(max-min)	0,60	0,55
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 74,79

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 38 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 2,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 39).

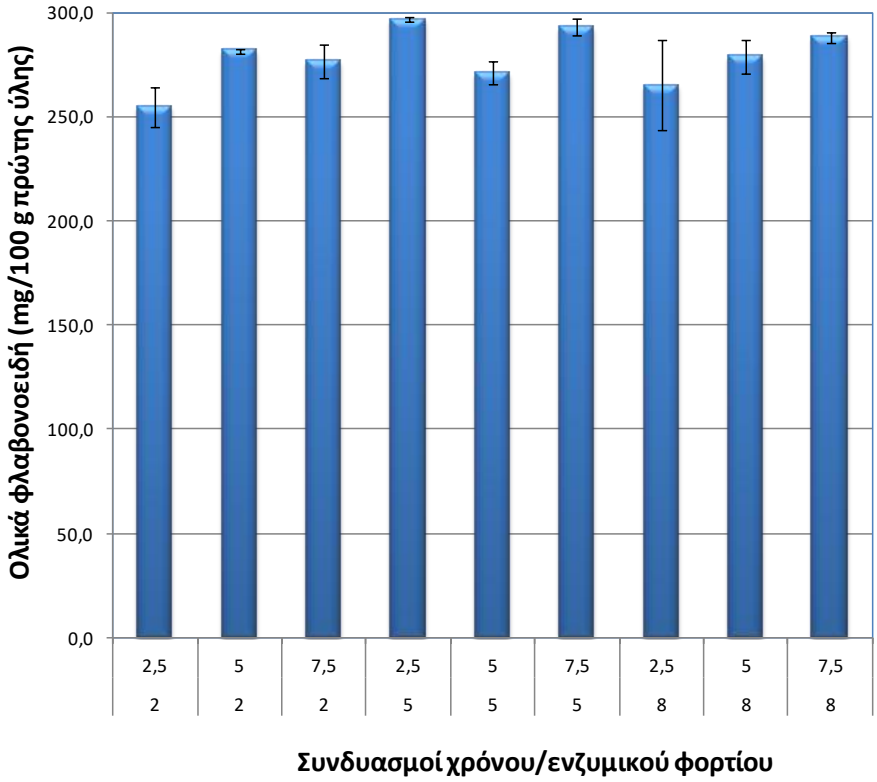


Διάγραμμα 39. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών φαινολικών ενώσεων απαιτούν είτε χαμηλά είτε υψηλά ενζυμικά φορτία σε μεγάλους χρόνους κατεργασίας.

6.2.2.4 Ολικά φλαβονοειδή

Τα ολικά φλαβονοειδή της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 40, ενώ αυτά των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 39.



Διάγραμμα 40. Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 39 Ποσότητα ολικών φλαβονοειδών σε mg/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	290,17	2,71
5	**Blank**	288,26	27,07
8	**Blank**	217,43	35,20
	Συμβατική Εκχύλιση	82,09	8,86

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα ολικά φλαβονοειδή κυμάνθηκαν από 255 – 297 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερες ποσότητες από τα εκχυλίσματα της ΕΥΕ που κυμάνθηκαν

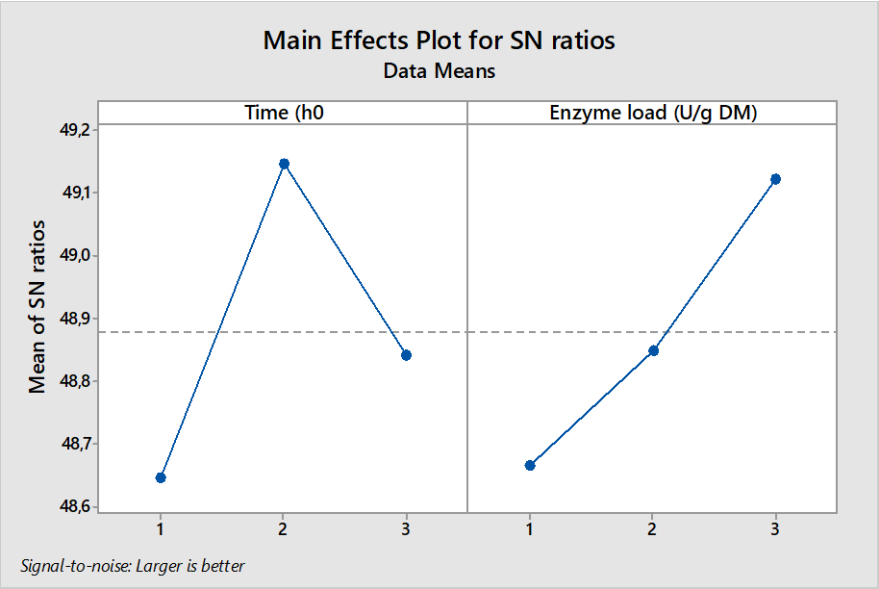
από 82 – 290 mg/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 40 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 40. Πειραματικές τιμές των ολικών φλαβονοειδών (mg/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	254,76	48,11
1	2	281,56	48,99
1	3	276,77	48,84
2	1	296,87	49,45
2	2	271,03	48,66
2	3	293,04	49,34
3	1	265,29	48,43
3	2	278,69	48,90
3	3	288,26	49,20

Στο Διάγραμμα 41 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά φλαβονοειδή και στον Πίνακα 41 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 41. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή για τους 2 παράγοντες ελέγχου

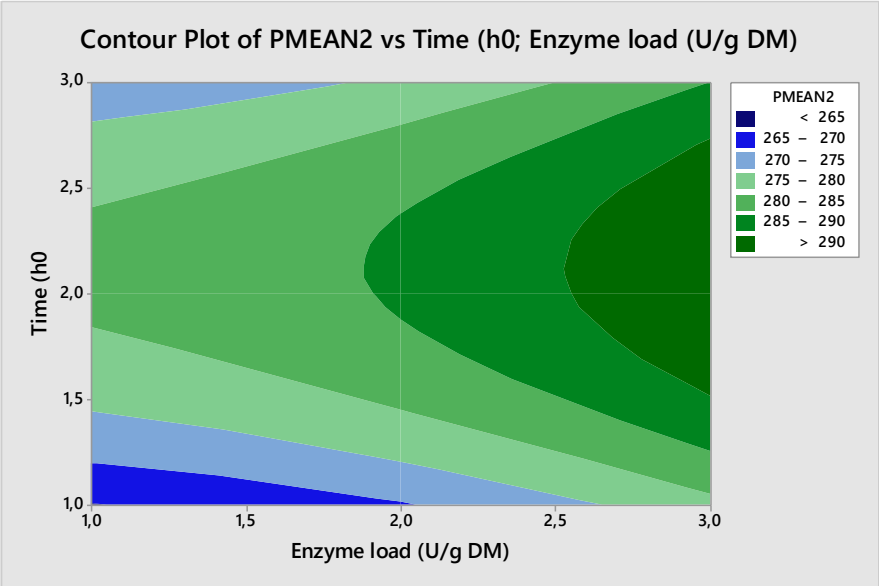
Πίνακας 41. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	48,65	48,67
2	49,15[α]	48,85
3	48,84	49,12[α]
(max-min)	0,50	0,46
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 48,88

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 41 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 2,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 42).



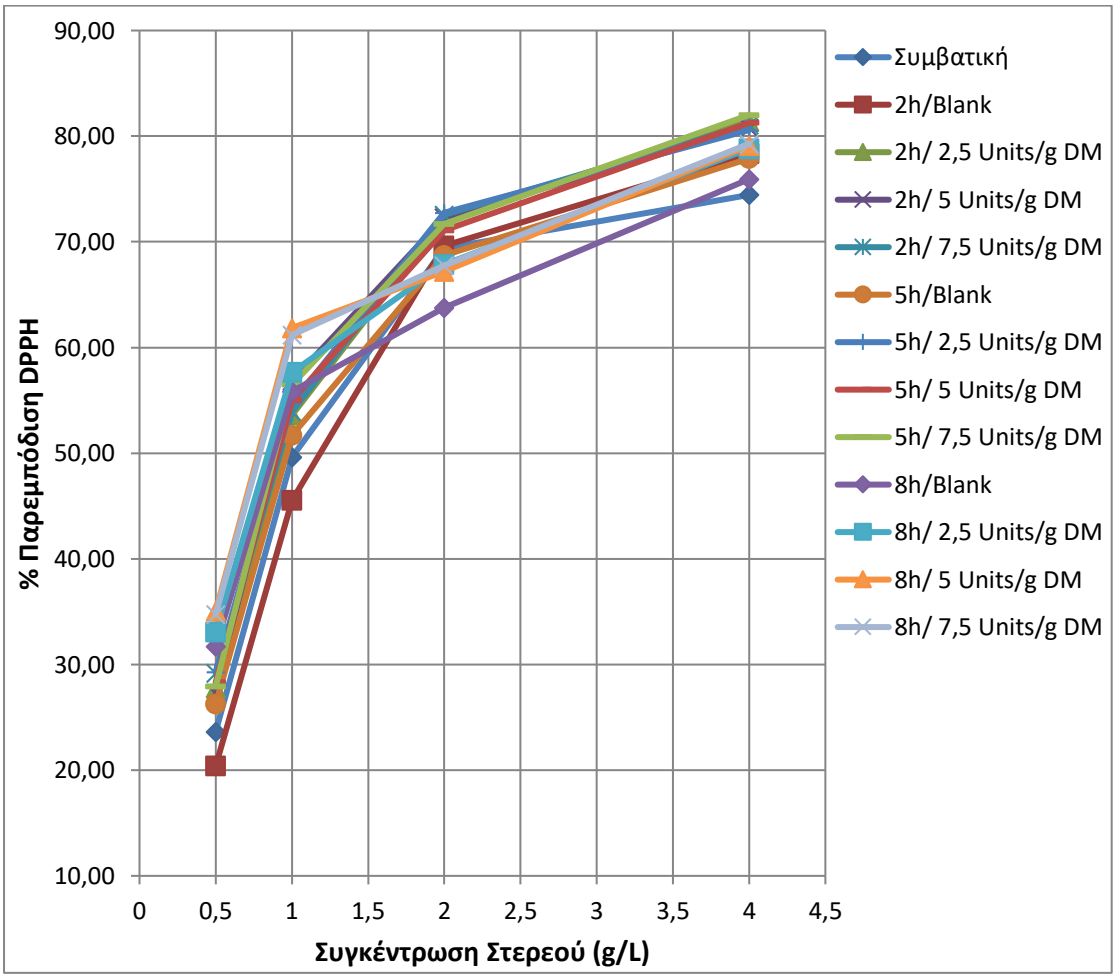
Διάγραμμα 42. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών φλαβονοειδών απαιτούν υψηλά ενζυμικά φορτία σε μέσους χρόνους κατεργασίας.

6.2.2.5 Αντιοξειδωτική δράση

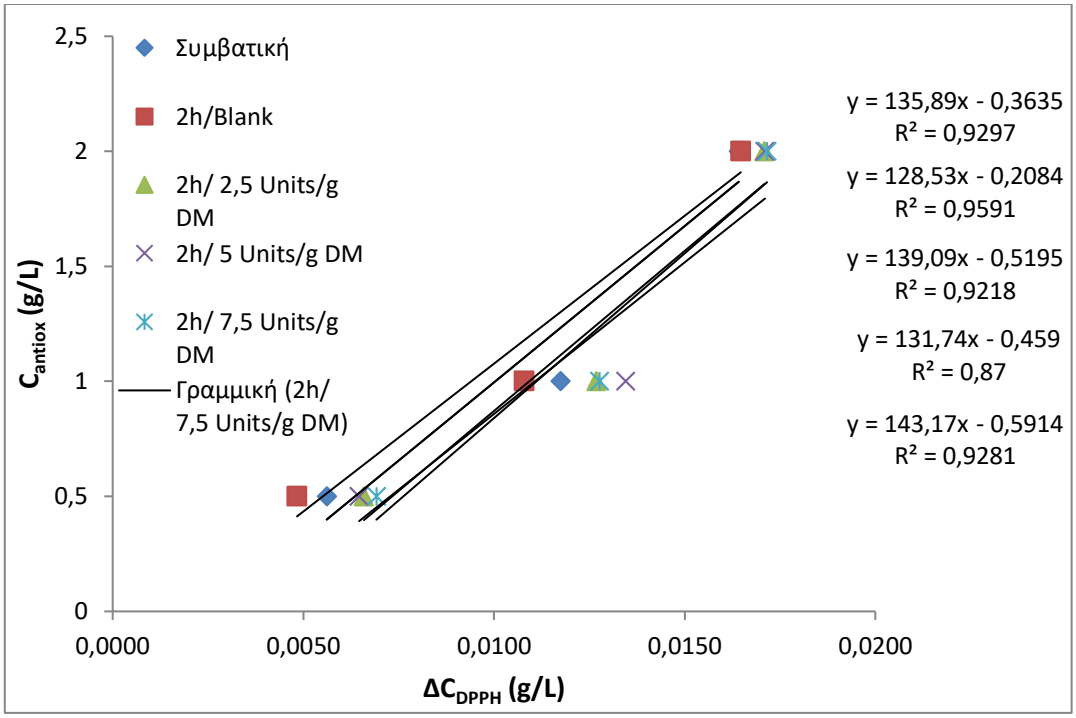
Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων γίνεται φανερή μέσω του δείκτη IC_{50}, ο οποίος υπολογίζεται όπως αναγράφεται στα κεφάλαια 6.1.3 και 6.2.1.5.

Η ποσοστιαία αναστολή του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του του εκάστοτε εκχυλίσματος παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 42.

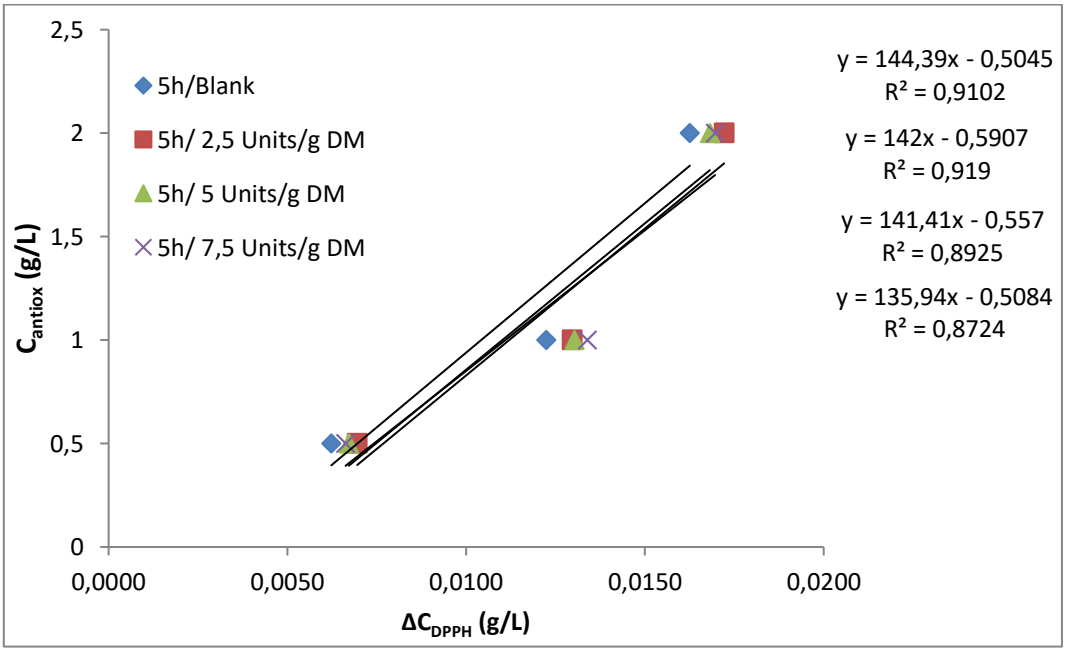


Διάγραμμα 43. Ποσοστό παρεμπόδισης του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του στερεού δείγματος (g/L)

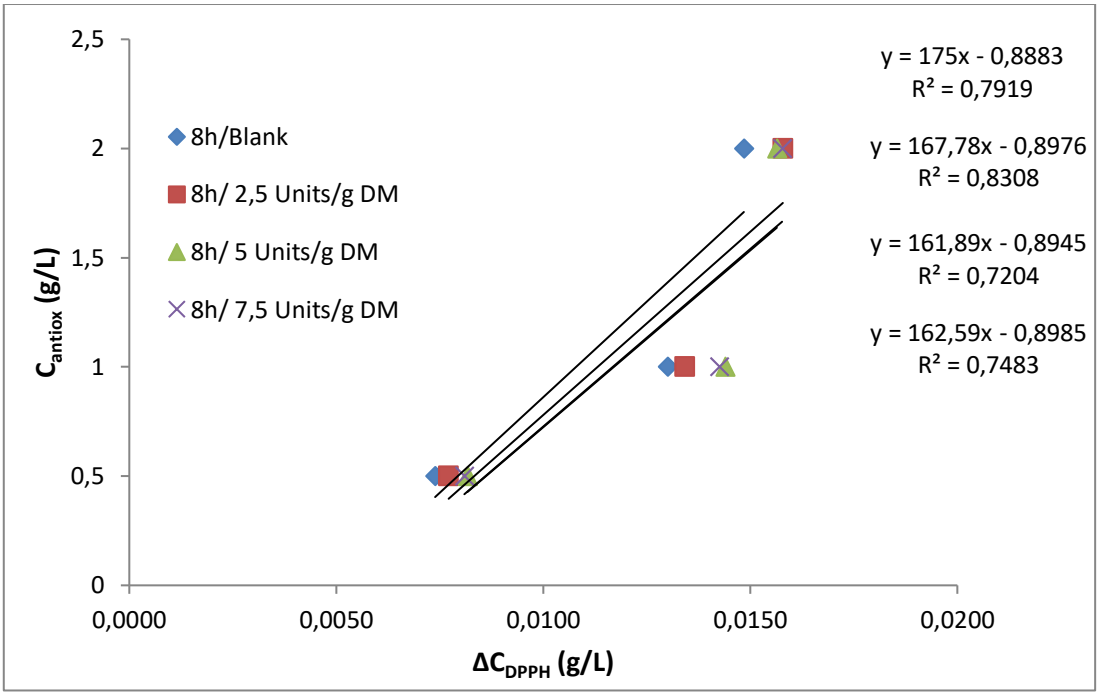
Στα παρακάτω γραφήματα, παρουσιάζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε συνάρτηση με τη διαφορά συγκέντρωσης DPPH για κάθε ένα από τα δείγματα (αρχική συγκέντρωση – τελική μετά το πέρας της αντίδρασης) (Διαγράμματα 44, 45 και 46).



Διάγραμμα 44. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 2 ώρες και για τη συμβατική εκχύλιση



Διάγραμμα 45. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 5 ώρες



Διάγραμμα 46. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 8 ώρες

Με βάση τις εξισώσεις που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα, γίνεται ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50} για κάθε εκχύλισμα (Πίνακας 42).

Πίνακας 42. Τιμές του δείκτη IC_{50} για κάθε δείγμα

	IC_{50}
Συμβατική	1,3
2h / Blank	1,3
2h / 2,5 Units/g DM	1,2
2h / 5 Units/g DM	1,1
2h / 7 Units/g DM	1,1
5h/Blank	1,2
5h / 2,5 Units/g DM	1,1
5h / 5 Units/g DM	1,1
5h / 7.5 Units/g DM	1,1
8h / Blank	1,2
8h / 2,5 Units/g DM	1,1
8h / 5 Units/g DM	1,0
8h / 7,5 Units/g DM	1,1

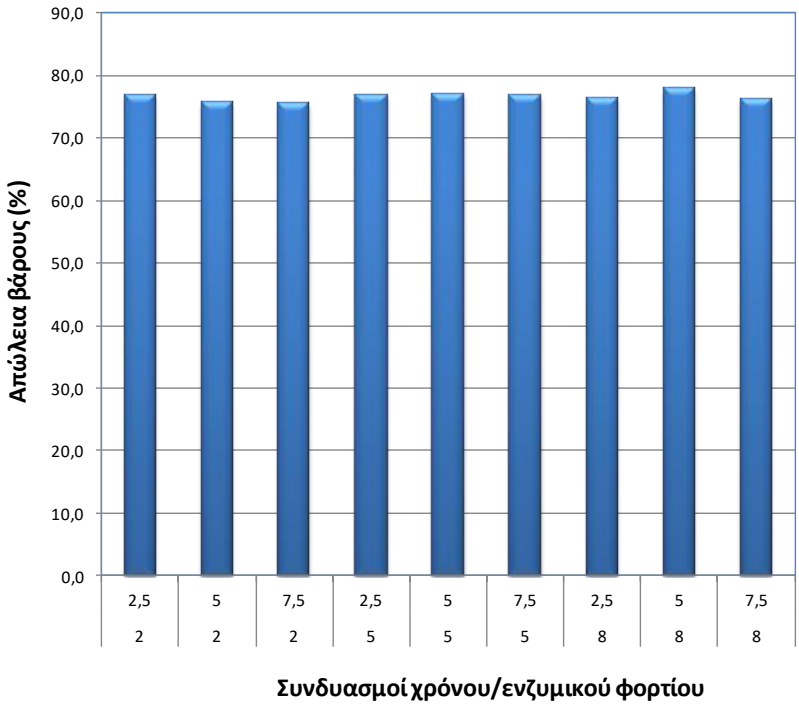
Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 42 και του διαγράμματος 43, παρατηρούμε ότι η κατά 50% παρεμπόδιση του DPPH κυμαίνεται από 1,0 – 1,3, επομένως δεν διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών. Ως εκ τούτου θεωρούμε ότι τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση.

6.2.3 ΕΥΕ με χρήση του ενζύμου BioPrep

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα *BioPrep* παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 8,0 για 2, 5 και 8 h (control). Μαζί με τις ΕΥΕ, έγινε και μία υδατική εκχύλιση του φλοιού του καρπού σε 40% αιθανολικό διάλυμα τελικού όγκου 50 mL, με αναλογία στερεού/υγρού (S/L) 2% (w/v). Τα αποτελέσματα των πειραματισμών παρουσιάζονται στους πίνακες και τα διαγράμματα που ακολουθούν. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμού *Minitab 17* (2013, Minitab INC).

6.2.3.1 Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 47, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 43.



Διάγραμμα 47 Απώλειες βάρους (%) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 43. Ποσοστό απώλειας βάρους μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	**Blank**	64,04
5	**Blank**	67,27
8	**Blank**	66,87
	Συμβατική Εκχύλιση	75,63

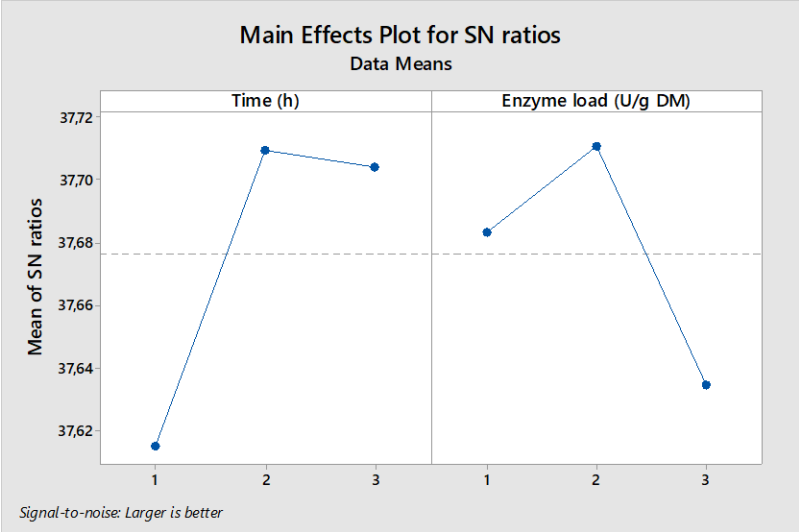
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η απώλεια βάρους κυμάνθηκε από 76 – 78 %, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη απώλεια βάρους που κυμάνθηκε από 64 – 76 %, με το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης να έχει τη μεγαλύτερη εξ αυτών.

Στον Πίνακα 44 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 44. Πειραματικές τιμές της απώλειας βάρους (%) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	76,70	37,70
1	2	75,75	37,59
1	3	75,52	37,56
2	1	76,69	37,70
2	2	76,95	37,72
2	3	76,82	37,71
3	1	76,37	37,66
3	2	77,81	37,82
3	3	76,14	37,63

Στο Διάγραμμα 48 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 45 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 48. Τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους για τους 2 παράγοντες ελέγχου

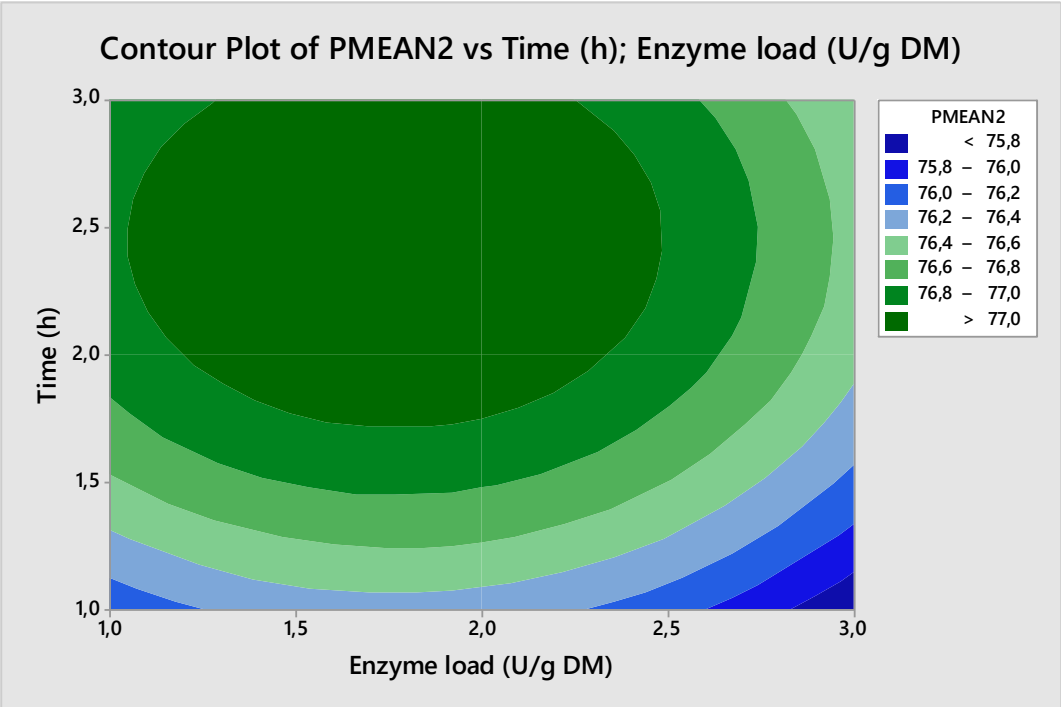
Πίνακας 45. Μέσες τιμές του λόγου S/N για την απώλεια βάρους

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	37,62	37,68
2	37,71$^{\alpha}$	37,71$^{\alpha}$
3	37,70	37,63
(max-min)	0,09	0,08
Ranking	1	2

$^{\alpha}$Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 37,68

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 45, ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 2,2). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απώλεια βάρους.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απώλεια βάρους παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 49).

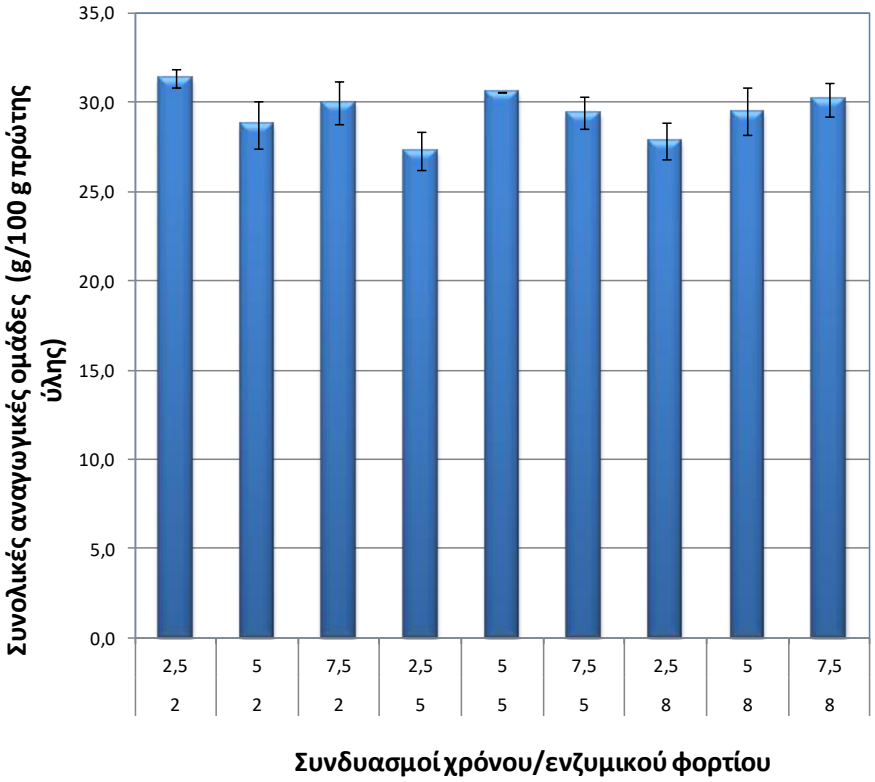


Διάγραμμα 49. Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί μέσο ενζυμικό φορτίο σε μέσους – υψηλούς χρόνους κατεργασίας.

6.2.3.2 Προσδιορισμός γλυκόζης και αναγωγικών σακχάρων

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 50, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 46.



Διάγραμμα 50. Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και φορτίου

Πίνακας 46 Ποσότητα ολικών αναγωγικών σακχάρων σε g/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	23,74	0,00
5	**Blank**	29,12	0,52
8	**Blank**	23,09	0,66
	Συμβατική Εκχύλιση	29,00	0,17

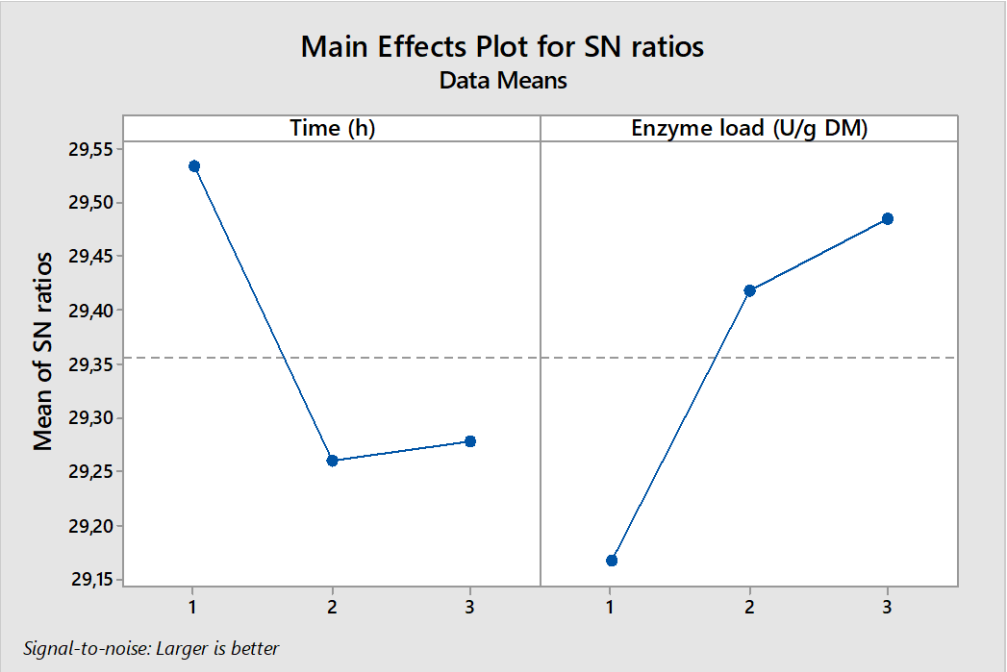
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα κυμάνθηκαν από 27 – 31 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα εκχυλίσματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερη ποσότητα αναγωγικών σακχάρων που κυμάνθηκε από 23 – 29 g/100 g πρώτης ύλης, με το εκχύλισμα (control) των 8 ωρών να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 47 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 47. Πειραματικές τιμές των ολικών αναγωγικών σακχάρων (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	31,35	29,92
1	2	28,75	29,16
1	3	29,95	29,52
2	1	27,26	28,70
2	2	30,60	29,72
2	3	29,40	29,36
3	1	27,82	28,88
3	2	29,49	29,38
3	3	30,14	29,58

Στο Διάγραμμα 51 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 48 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 51. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα για τους 2 παράγοντες ελέγχου

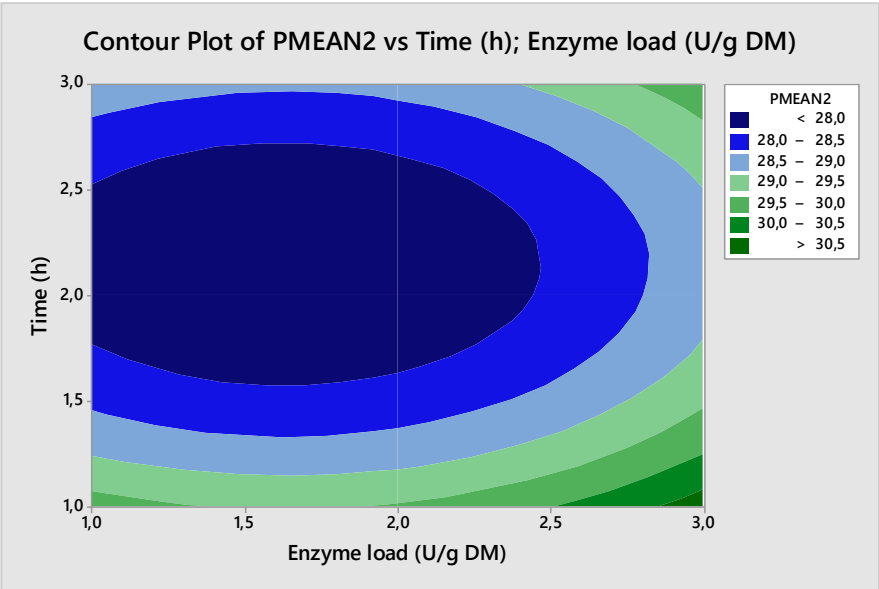
Πίνακας 48. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	29,53[α]	29,17
2	29,26	29,42
3	29,28	29,49[α]
(max-min)	0,27	0,32
Ranking	2	1

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 29,36

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 48 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 1,3). Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

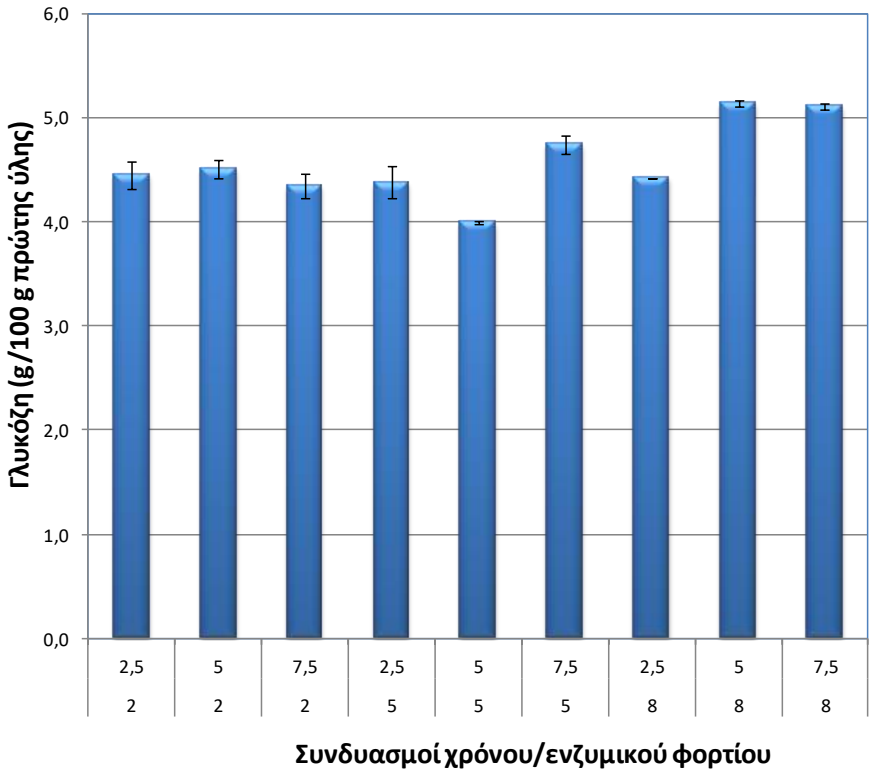
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 52).



Διάγραμμα 52. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Παρατηρούμε ότι υψηλές ποσότητες ολικών αναγωγικών σακχάρων απαιτούν υψηλό ενζυμικό φορτίο σε μικρούς αλλά και σε μεγάλους χρόνους κατεργασίας.

Η ποσότητα γλυκόζης της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 53, ενώ η ποσότητα γλυκόζης των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 49.



Διάγραμμα 53. Διάγραμμα γλυκόζης (g/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 49. Ποσότητα γλυκόζης σε g/100 g πρώτης ύλης μετά την υδατική σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	Blank	4,78	0,15
5	Blank	5,10	0,13
8	Blank	5,05	0,15
	Συμβατική Εκχύλιση	4,51	0,18

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), η γλυκόζη κυμάνθηκε από 4,0 – 5,1 g/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν παραπλήσια ποσότητα γλυκόζης που κυμάνθηκε από 4,5 – 5,1 g/100 g πρώτης ύλης, με το δείγμα (control) των 5 ωρών να παρουσιάζει ίδια ποσότητα γλυκόζης με αυτή του δείγματος

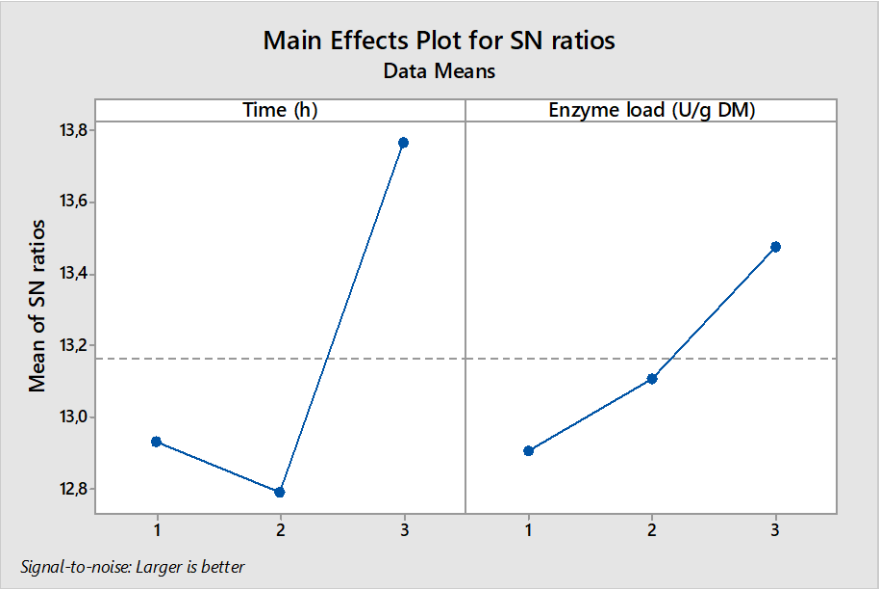
8h / 7,5 Units/ g DM , το οποίο εμφάνισε την υψηλότερη ποσότητα γλυκόζης μεταξύ των δειγμάτων της ΕΥΕ.

Στον Πίνακα 50 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 50. Πειραματικές τιμές της γλυκόζης (g/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	4,46	12,97
1	2	4,51	13,08
1	3	4,34	12,75
2	1	4,38	12,83
2	2	4,00	12,03
2	3	4,74	13,51
3	1	4,42	12,92
3	2	5,13	14,21
3	3	5,11	14,17

Στο Διάγραμμα 54 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τη γλυκόζη και στον Πίνακα 51 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 54. Τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη για τους 2 παράγοντες ελέγχου

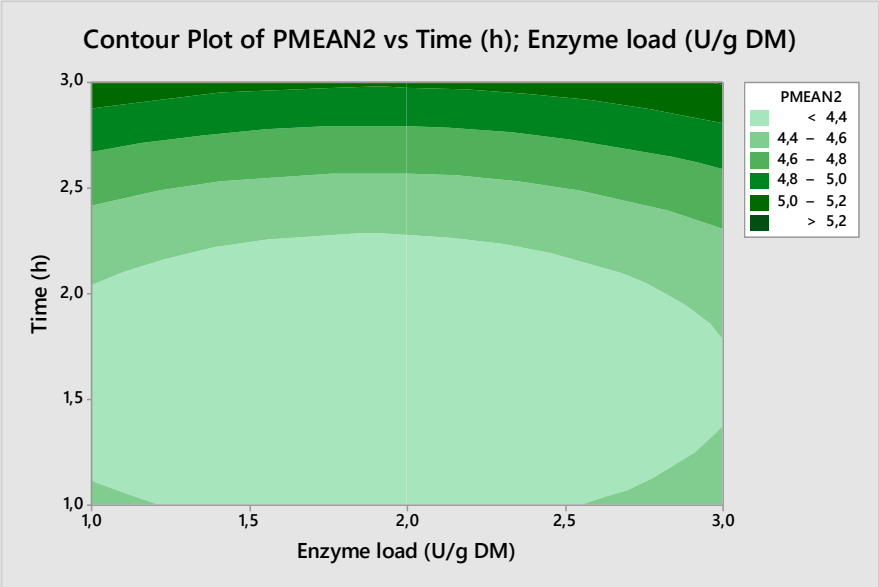
Πίνακας 51. Μέσες τιμές του λόγου S/N για τη γλυκόζη

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	12,93	12,90
2	12,79	13,11
3	13,77[α]	13,48[α]
(max-min)	0,98	0,57
Ranking	1	2

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 13,16

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 51 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 3,3). Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 55).

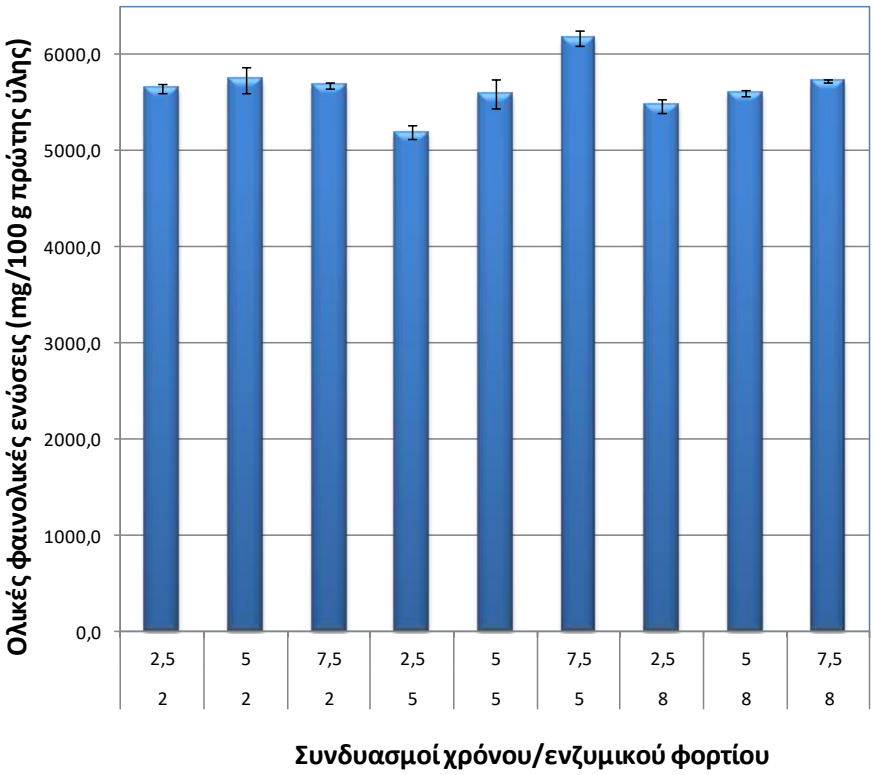


Διάγραμμα 55. Ισοϋψείς καμπύλες γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι υψηλές ποσότητες γλυκόζης απαιτούν χαμηλά ή υψηλά ενζυμικά φορτία σε υψηλούς χρόνους κατεργασίας.

6.2.3.3 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 56, ενώ αυτές των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 52.



Διάγραμμα 56. Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει ων συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 52. Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων σε mg/100 g πρώτης ύλης

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	Blank	4573,02	139,34
5	Blank	4927,71	83,60
8	Blank	4336,56	139,34
	Συμβατική Εκχύλιση	2560,70	374,50

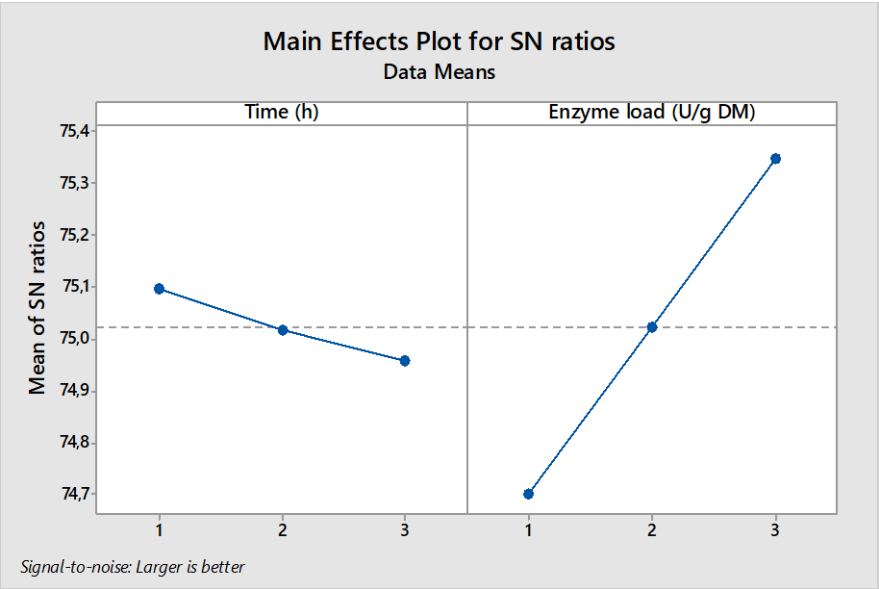
Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), οι ολικές φαινολικές ενώσεις κυμάνθηκαν από 5194 – 6169 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης είχαν μικρότερες ποσότητες που κυμάνθηκαν από 2561 – 5489 mg/100 g πρώτης ύλης, με το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 53 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 53. Πειραματικές τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων (mg/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	5646,94	75,04
1	2	5735,62	75,17
1	3	5676,50	75,08
2	1	5193,73	74,31
2	2	5587,83	74,94
2	3	6169,13	75,80
3	1	5469,60	74,76
3	2	5597,68	74,96
3	3	5725,76	75,16

Στο Διάγραμμα 57 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τις ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 54 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 57. Τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις για τους 2 παράγοντες ελέγχου

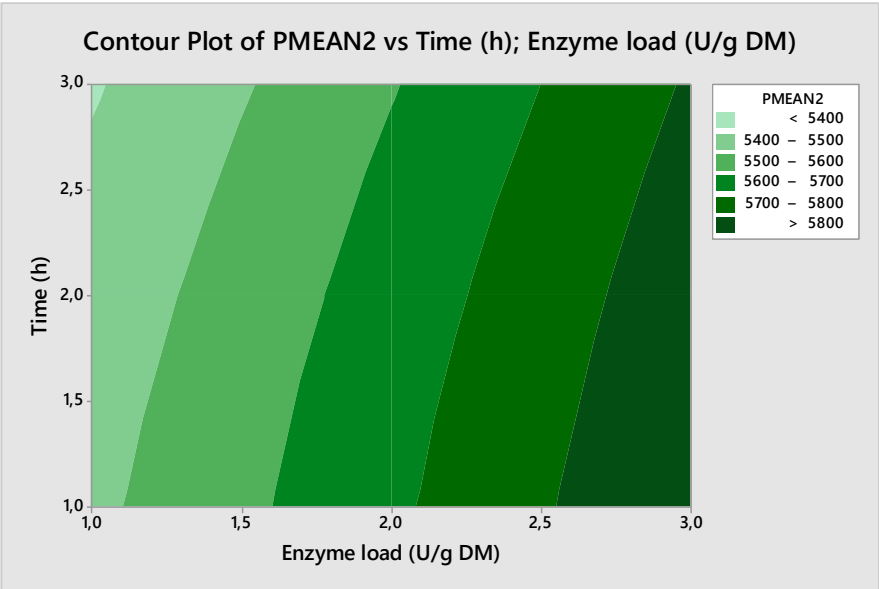
Πίνακας 54 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	75,10[α]	74,70
2	75,02	75,02
3	74,96	75,35[α]
(max-min)	0,14	0,65
Ranking	2	1

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 75,03

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 54 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/g DM (επίπεδα 1,3). Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 58).

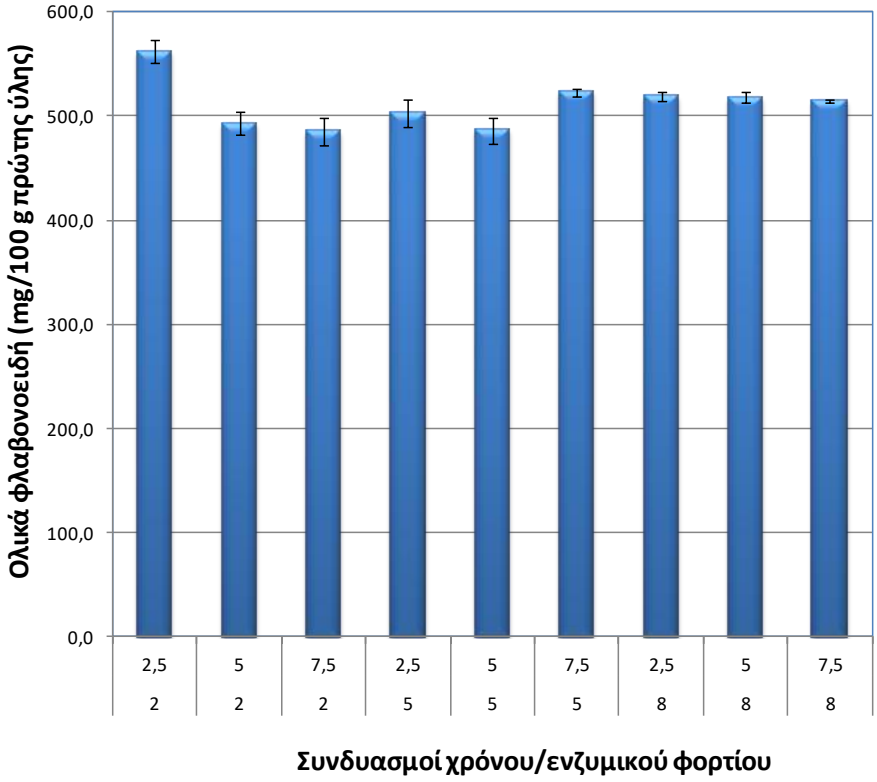


Διάγραμμα 58. Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι μεγάλες ποσότητες ολικών φαινολικών ενώσεων απαιτούν υψηλά ενζυμικά φορτία σε μικρούς χρόνους κατεργασίας.

6.2.3.4 Ολικά φλαβονοειδή

Τα ολικά φλαβονοειδή της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 59, ενώ αυτά των δειγμάτων απουσία ενζύμου και της συμβατικής εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 55.



Διάγραμμα 59. Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης) συναρτήσει των συνδυασμών χρόνου και ενζυμικού φορτίου

Πίνακας 55. Ποσότητα ολικών φλαβονοειδών σε mg/100 g πρώτης ύλης

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	± SD
2	**Blank**	424,17	5,41
5	**Blank**	419,38	6,77
8	**Blank**	399,28	10,83
	Συμβατική Εκχύλιση	82,09	8,86

Παρατηρούμε ότι στην ΕΥΕ για τους διάφορους συνδυασμούς των παραγόντων (χρόνος και ενζυμικό φορτίο), τα ολικά φλαβονοειδή κυμάνθηκαν από 485 – 562 mg/100 g πρώτης ύλης, ενώ τα δείγματα της συμβατικής και την υδατικής εκχύλισης

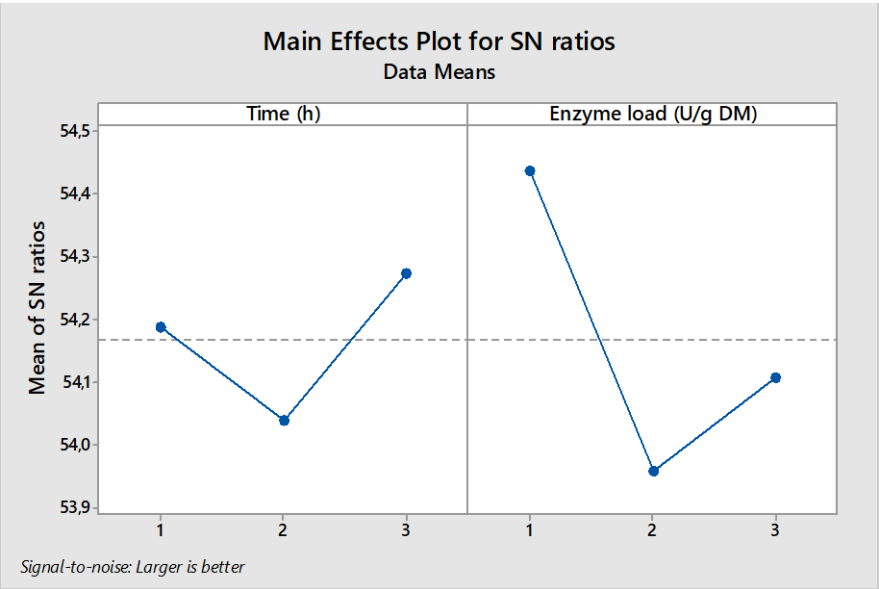
είχαν μικρότερες ποσότητες από τα δείγματα της ΕΥΕ που κυμάνθηκαν από 82 – 424 mg/100 g πρώτης ύλης, με το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης να παρουσιάζει τη μικρότερη εξ' αυτών.

Στον Πίνακα 56 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 56. Πειραματικές τιμές των ολικών φλαβονοειδών (mg/100 g πρώτης ύλης) και του λόγου S/N

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g πρώτης ύλης)	S/N
1	1	561,99	54,99
1	2	493,08	53,86
1	3	485,42	53,72
2	1	502,65	54,02
2	2	486,38	53,74
2	3	522,75	54,37
3	1	518,92	54,30
3	2	517,97	54,29
3	3	515,10	54,24

Στο Διάγραμμα 60 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά φλαβονοειδή και στον Πίνακα 57 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 60. Τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή για τους 2 παράγοντες ελέγχου

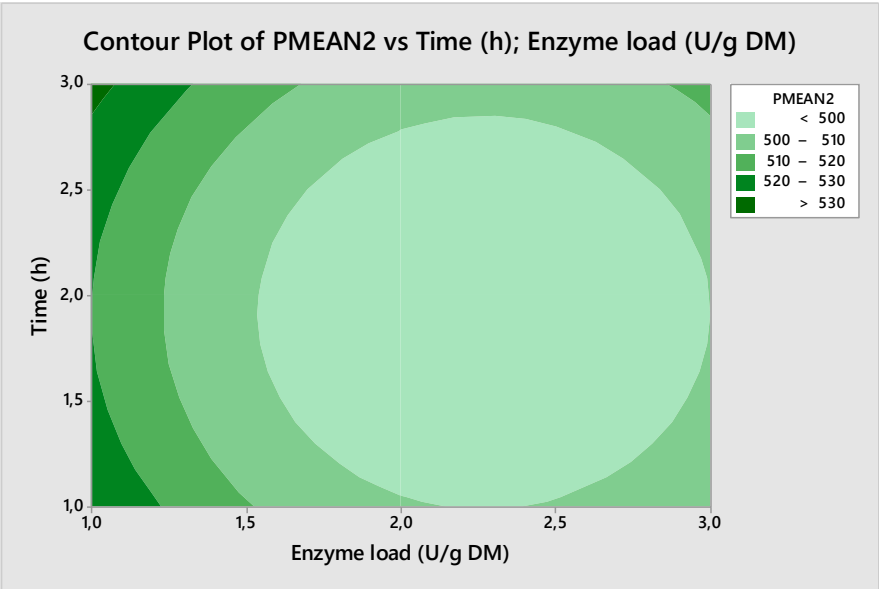
Πίνακας 57 Μέσες τιμές του λόγου S/N για τα ολικά φλαβονοειδή

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	54,19	54,44[α]
2	54,04	53,96
3	54,27[α]	54,11
(max-min)	0,23	0,48
Ranking	2	1

[α]Βέλτιστη τιμή
Μέση τιμή του S/N = 54,17

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 57 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 7,5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2,5 Units/g DM (επίπεδα 3,1). Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 61).

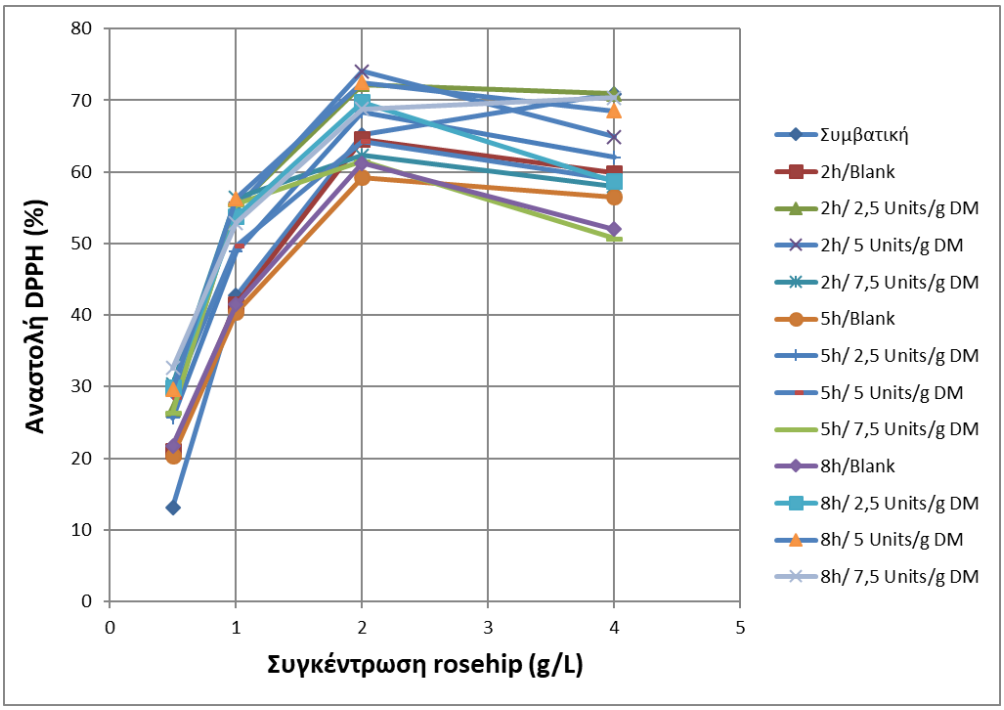


Διάγραμμα 61 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Είναι φανερό ότι υψηλές ποσότητες ολικών φλαβονοειδών απαιτούν χαμηλά ενζυμικά φορτία σε υψηλούς χρόνους κατεργασίας.

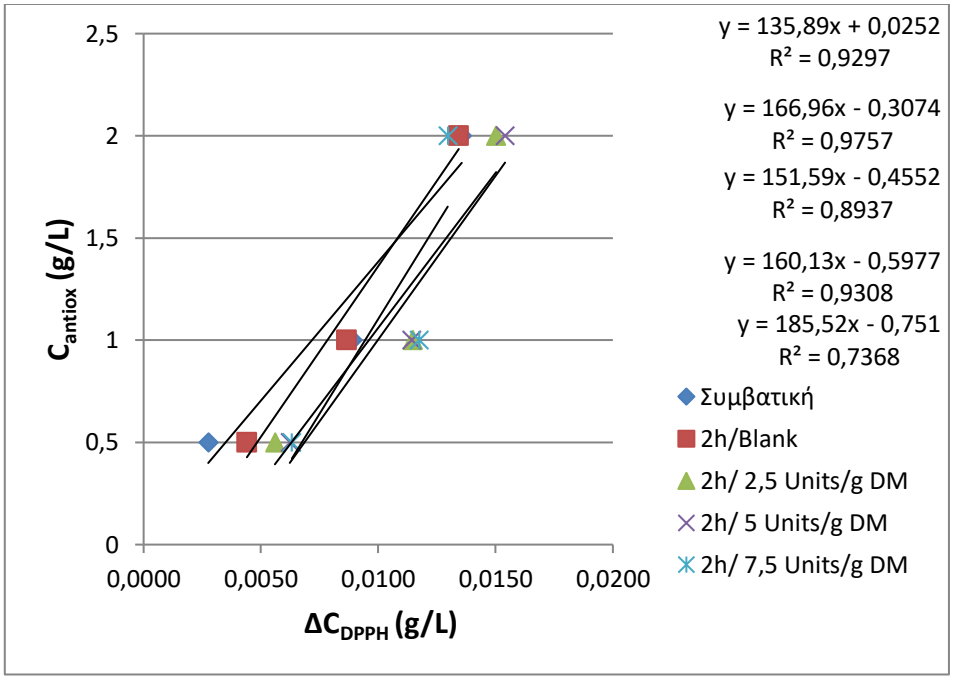
6.2.3.5 Αντιοξειδωτική δράση

Η ποσοστιαία αναστολή του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος παρουσιάζεται στο κάτωθι διάγραμμα (Διάγραμμα 62) απ' όπου φαίνεται ότι η συγκέντρωση του προς εκχύλιση στερεού η οποία θα οδηγήσει σε 50% αναστολή του DPPH δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών του δείγματος φλοιού του καρπού.

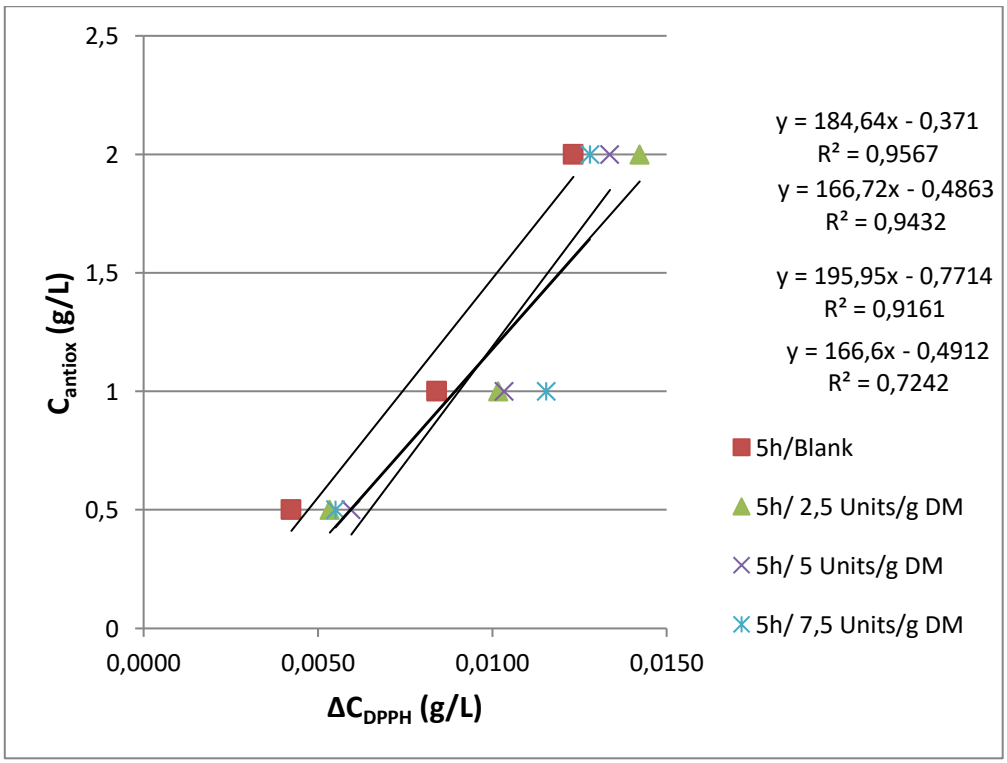


Διάγραμμα 62. Ποσοστό παρεμπόδισης του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του στερεού δείγματος (g/L)

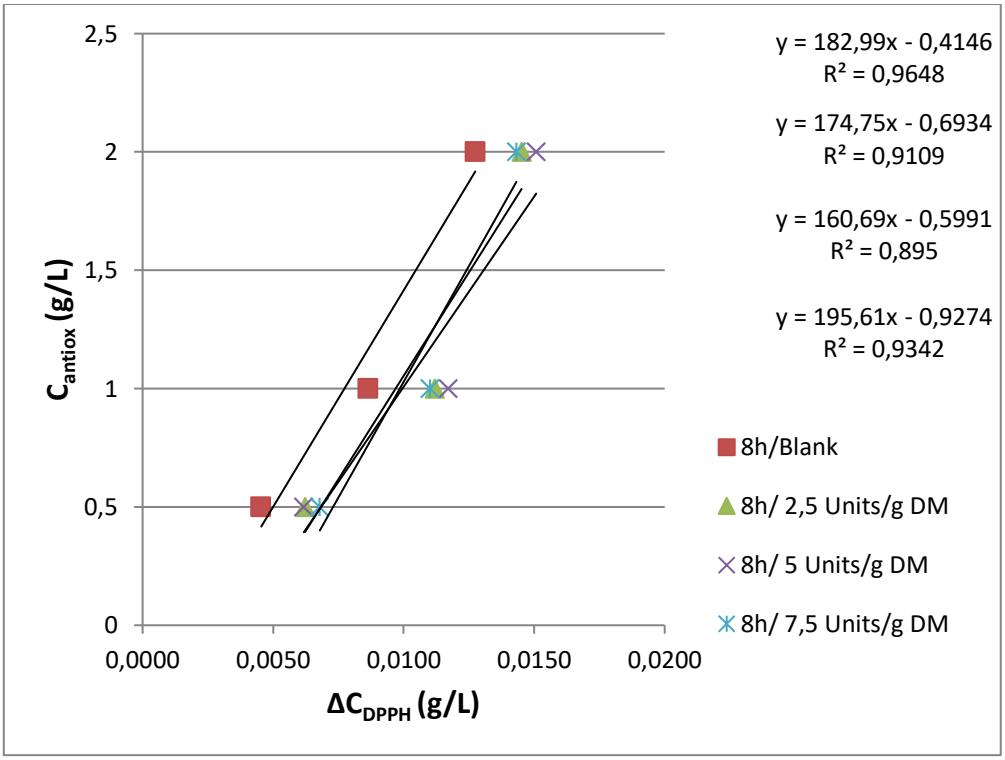
Ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50}, γίνεται όπως και στις παραγράφους 6.1.3 και 6.2.1.5. Στα παρακάτω γραφήματα, παρουσιάζεται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε συνάρτηση με τη διαφορά συγκέντρωσης DPPH για κάθε ένα από τα δείγματα (αρχική συγκέντρωση – τελική μετά το πέρας της αντίδρασης) (Διάγραμμα 63, 64, 65).



Διάγραμμα 63. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 2 ώρες και για τη συμβατική εκχύλιση



Διάγραμμα 64. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 5 ώρες



Διάγραμμα 65. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (g/L) συναρτήσει της διαφοράς συγκέντρωσης του DPPH για τα δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία για 8 ώρες

Με βάση τις εξισώσεις που προκύπτουν από τα παραπάνω γραφήματα γίνεται ο υπολογισμός του δείκτη IC_{50} του εκάστοτε εκχυλίσματος (Πίνακας 58).

Πίνακας 58. Τιμές του δείκτη IC_{50} για κάθε εκχύλισμα

	IC_{50}
Συμβατική	1,4
2h / Blank	1,4
2h / 2,5 Units/g DM	1,1
2h / 5 Units/g DM	1,1
2h / 7 Units/g DM	1,2
5h / Blank	1,5
5h / 2,5 Units/g DM	1,2
5h / 5 Units/g DM	1,3
5h / 7,5 Units/g DM	1,2
8h / Blank	1,5
8h / 2,5 Units/g DM	1,1
8h / 5 Units/g DM	1,1
8h / 7,5 Units/g DM	1,1

Σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω διαγράμματος 62 και του πίνακα 58, παρατηρούμε ότι η ποσοστιαία παρεμπόδιση του DPPH κυμαίνεται μεταξύ των τιμών

1,1-1,5 και δεν διαφοροποιείται πολύ μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών, όπως ακριβώς συνέβη και κατά την επεξεργασία του δείγματος φλοιού και με τα άλλα δύο ένζυμα. Ως εκ τούτου θεωρούμε ότι τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση.

6.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μεθόδου Taguchi

Από τα χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν, αυτά με τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα άρα και μείζουσας σημασίας, είναι οι ολικές φαινολικές ενώσεις, τα ολικά φλαβονοειδή και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η απώλεια βάρους, τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και η γλυκόζη πρακτικά είναι μία ένδειξη του κατά πόσο υδρολύθηκε το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αναφορικά με τον χρόνο προκατεργασίας και το χρησιμοποιούμενο ενζυμικό φορτίο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα βέλτιστα αποτελέσματα (πειραματικά και προβλεπόμενα) που προέκυψαν από τον σχεδιασμό Taguchi, αναφορικά με την παραλαβή ολικών φαινολικών ενώσεων, ολικών φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής δράσης, με τη χρήση των τριών ενζυμικών παρασκευασμάτων (Πίνακας 59). Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται μέσω του δείκτη IC_{50}. Οι παράγοντες και τα επίπεδά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Στον συγκεκριμένο πίνακα παρουσιάζονται επίσης τα βέλτιστα πειραματικά αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης του φλοιού σε 40% v/v αιθανολικό διάλυμα, αναφορικά με την παραλαβή των ενώσεων που αναφέρονται παραπάνω.

Πίνακας 59. Βέλτιστα αποτελέσματα (πειραματικά και προβλεπόμενα) βιοδραστικών ενώσεων με βάση το σχεδιασμό Taguchi

	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g ξηρής πρώτης ύλης)/ Βέλτιστο επίπεδο		**Ολικά φλαβονοειδή (mg/100 g ξηρής πρώτης ύλης)/ Βέλτιστο επίπεδο**		**IC_{50} (g/L)**
	Πειραματικό	Προβλεπόμενο	Πειραματικό	Προβλεπόμενο	Πειραματικό
Cellic CTec2	6064,94	6087,93	304,53	297,19	1,7
Viscozyme L.	5853,85	5709,34	296,87	294,53	1,0
BioPrep	6169,13	5898,73	561,99	533,60	1,1
Συμβατική	2560,70	-	82,09	-	20,78

Είναι φανερό ότι η ΕΥΕ σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση, οδήγησε στην παραλαβή μεγαλύτερων ποσοτήτων βιοδραστικών ενώσεων από αυτές που προέβλεψε το σχεδιαστικό μοντέλο Taguchi. Παράλληλα, παρατηρούμε ότι ο συνδυασμός των δύο μεθόδων εκχύλισης οδήγησε σε πολύ καλύτερη απόδοση στην

παραλαβή των βιοδραστικών ενώσεων συγκριτικά με το εκχύλισμα που προήλθε από απλή συμβατική εκχύλιση.

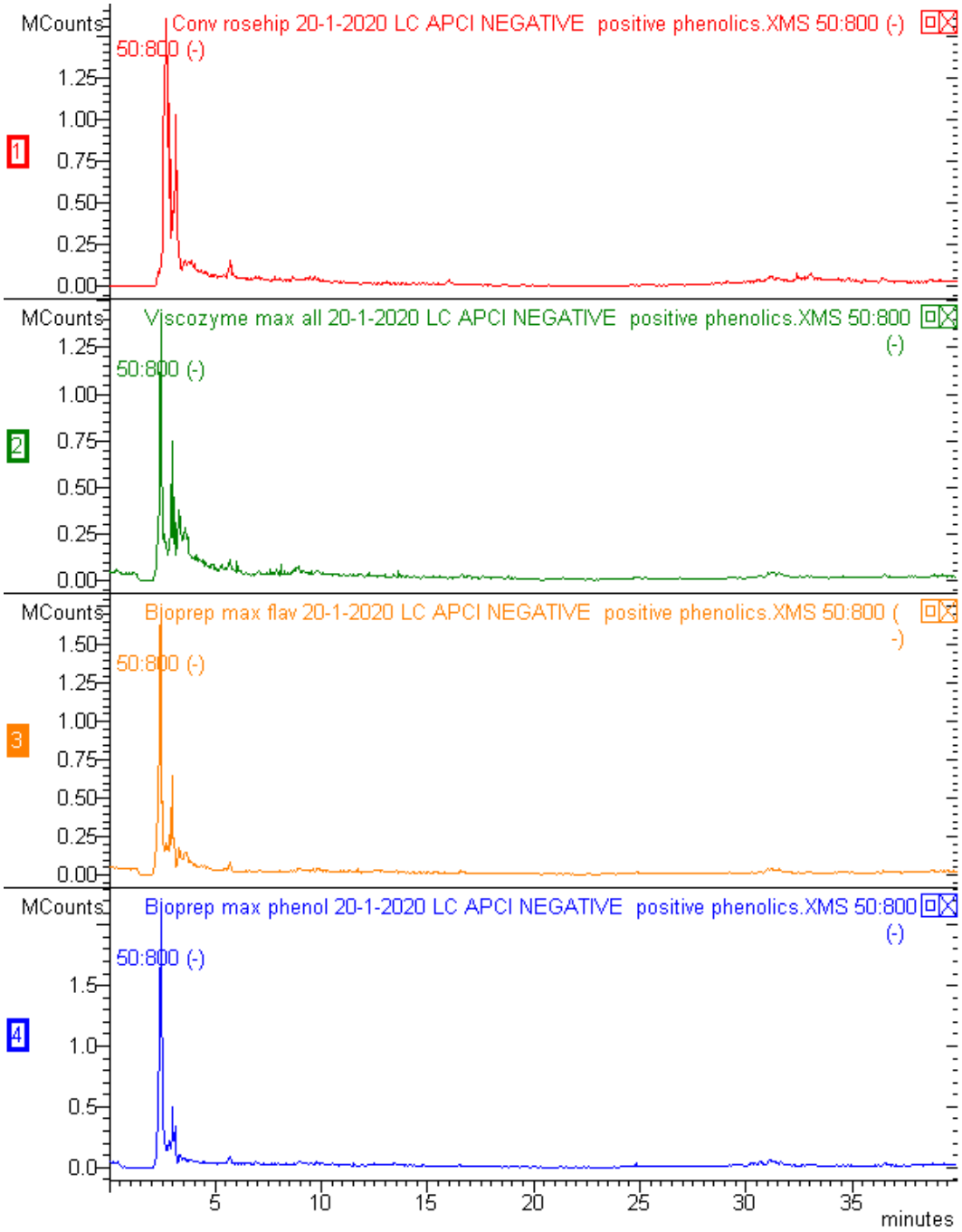
Σύμφωνα με τα δεδομένα του άνωθι πίνακα, παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα που προέκυψε από την προκατεργασία με το ενζυμικό σκεύασμα *BioPrep* οδήγησε στην παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών συγκριτικά με τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την προκατεργασία με τα ενζυμικά σκευάσματα *Cellic CTec2* και *Viscozyme L.* Ωστόσο, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει το εκχύλισμα που προήλθε από την προκατεργασία με το ενζυμικό σκεύασμα *Viscozyme L.*, η οποία όμως είναι πολύ κοντά με την μετρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος που προέκυψε από την προκατεργασία με το ενζυμικό παρασκεύασμα *BioPrep*. Ως εκ τούτου, ως καταλληλότερο ένζυμο για την παραλαβή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικών ενώσεων, επιλέγεται το ενζυμικό σκεύασμα *BioPrep*.

6.4 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (LC – MS)

Η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (*LC –MS*) έγινε στο δείγμα της συμβατικής εκχύλισης του φλοιού του *Rosa Canina L*. και στα εξής δείγματα της ΕΥΕ σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση:

- Στο δείγμα που προκατεργάστηκε με το ενζυμικό σκεύασμα *Viscozyme L.* ενζυμικού φορτίου 2,5 Units/g ξηρής πρώτης ύλης για 5h, το οποίο περιείχε τη μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών αλλά και φλαβονοειδών ενώσεων,
- Στο δείγμα που προκατεργάστηκε με το ενζυμικό σκεύασμα *BioPrep* ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/g ξηρής πρώτης ύλης για 5h, στο οποίο βρέθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων και
- Στο δείγμα που προκατεργάστηκε με το ενζυμικό σκεύασμα *BioPrep* ενζυμικού φορτίου 2,5 Units/g ξηρής πρώτης ύλης για 2h, στο οποίο βρέθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φλαβονοειδών.

Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων που προαναφέρθηκαν, η ανάλυση των οποίων έγινε σύμφωνα με την τεχνική του αρνητικού και θετικού χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (*APCI negative positive*) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Χρωματογραφήματα ολικών ιόντων αρνητικού ιονισμού των δειγμάτων της συμβατικής εκχύλισης και των δειγμάτων της ΕΥΕ σε συνδυασμό με συμβατική εκχύλιση

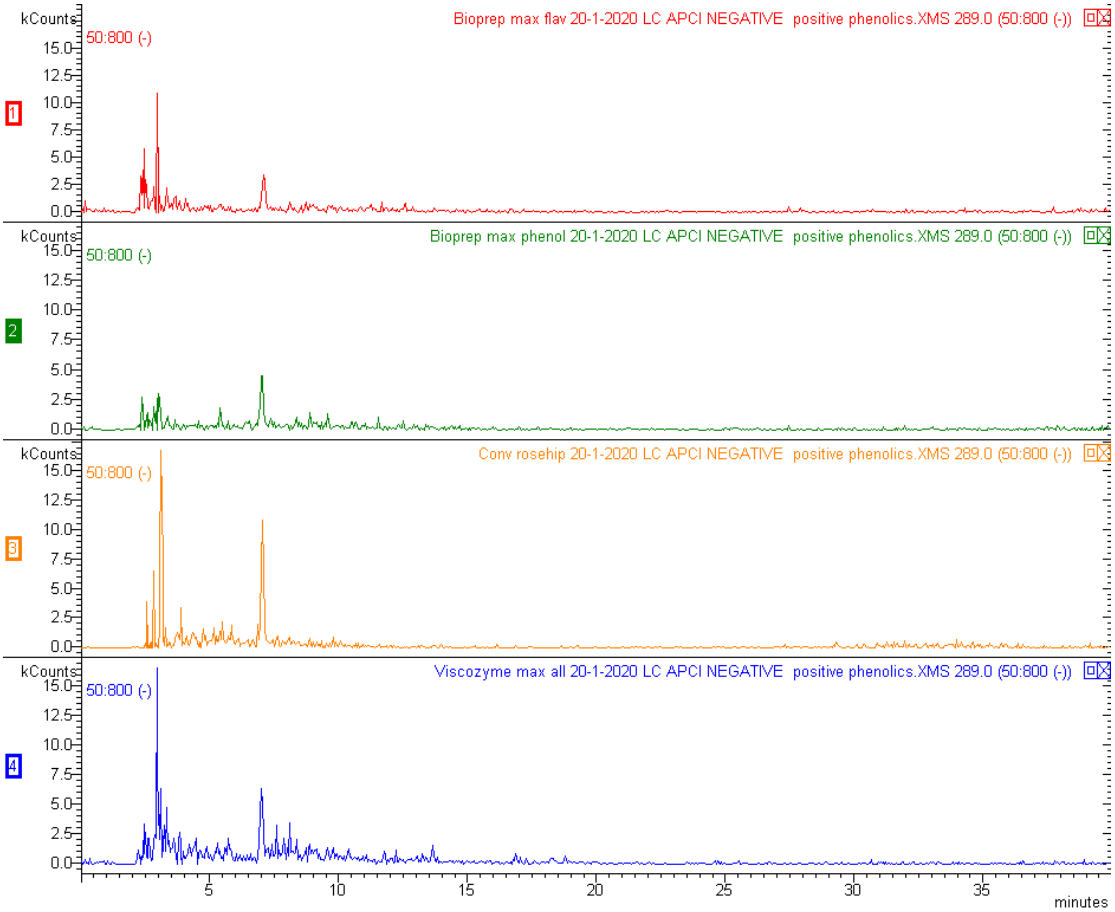
Τα χρωματογραφήματα αυτά δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές. Μεγαλύτερη ομοιότητα παρουσιάζουν τα δείγματα της ΕΥΕ με τη χρήση των ενζυμικών παρασκευασμάτων *Viscozyme L.* και *BioPrep*, ενώ μικρή διαφοροποίηση παρουσιάζει το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος της συμβατικής εκχύλισης. Αυτή η διαφοροποίηση προφανώς σχετίζεται με τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε στην εκάστοτε περίπτωση, καθώς με τη χρήση ενζύμων ευνοείται η εκχύλιση ορισμένων ουσιών που πιθανότατα να μην ευνοείται με την απλή συμβατική εκχύλιση.

Τα χρωματογραφήματα αυτά αναλύθηκαν με σκοπό την ταυτοποίηση ορισμένων κορυφών τους και την αναγνώριση ορισμένων συστατικών τους. Προκειμένου να καταστεί εφικτό αυτό, έγινε η μελέτη των φασμάτων ορισμένων πρότυπων ουσιών (βλ. κεφάλαιο 5.3.6). Μέσω των φασμάτων αυτών συλλέχθηκαν πληροφορίες για το χρόνο ανάσχεσης και τον λόγο m/z, οι οποίοι αποτελούν τα χαρακτηριστικά μεγέθη της εκάστοτε πρότυπης ένωσης. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα.

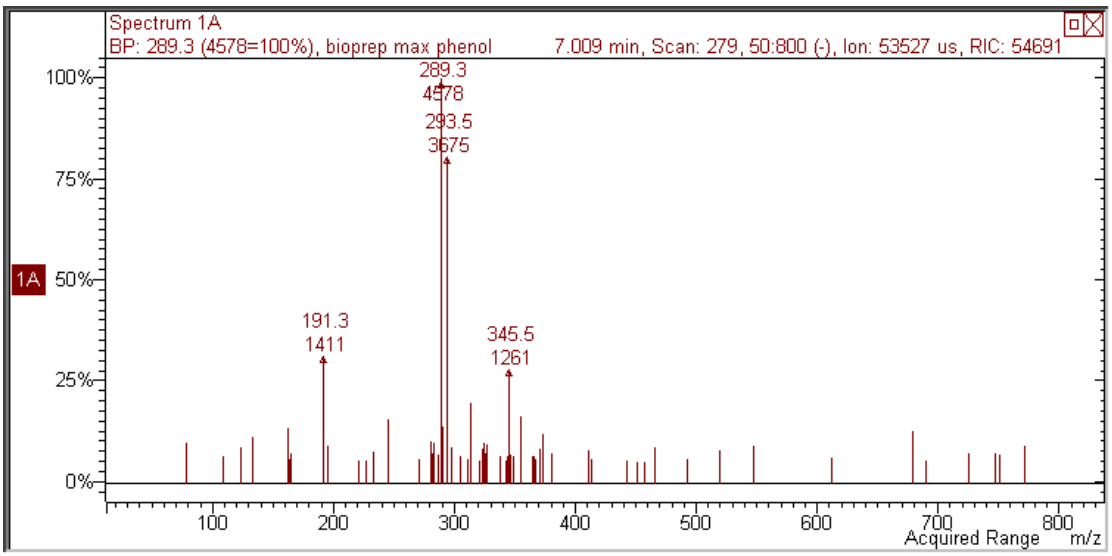
Το ιόν m/z: 289 αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ της κατεχίνης. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζεται το ιόν m/z: 289 (Εικόνα 18), παρατηρούμε ότι υπάρχει κορυφή του συγκεκριμένου ιόντος σε χρόνο (περίπου) 7,03 min σε όλα τα δείγματα.

Ο χρόνος αυτός συμπίπτει με το χρόνο ανάσχεσης της πρότυπης ουσίας (κατεχίνη), επομένως οι κορυφές αυτές αποδίδονται στην κατεχίνη. Στο φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο χρόνο, σε όλα τα δείγματα, το m/z: 289 αποτελεί το κύριο ιόν. Ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα μάζας του εκχυλίσματος της ΕΥΕ με *BioPrep* ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/g ξηρής πρώτης ύλης που προκατεργάστηκε για 5h, το οποίο παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων (Εικόνα 19).

Παρατηρούνται επίσης πολλαπλές κορυφές σε χρόνο 2 – 4 min με πλουσιότερα φάσματα μάζας οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε παράγωγα της κατεχίνης. Είναι φανερό ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποσοτήτων της συγκεκριμένης ένωσης που παρουσιάζεται στο κάθε χρωματογράφημα, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική μέθοδο εκχύλισης είτε στο ενζυμικό παρασκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην ΕΥΕ. Το ιόν m/z: 289 εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο χρωματογράφημα του δείγματος της συμβατικής εκχύλισης. Η χρήση του ενζυμικού παρασκευάσματος *Viscozyme L.* οδήγησε στην παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας του συγκεκριμένου ιόντος συγκριτικά με αυτή του *BioPrep*.



Εικόνα 18. Χρωματογραφήματα ιόντος m/z: 289 για τα αναλυθέντα εκχυλίσματα

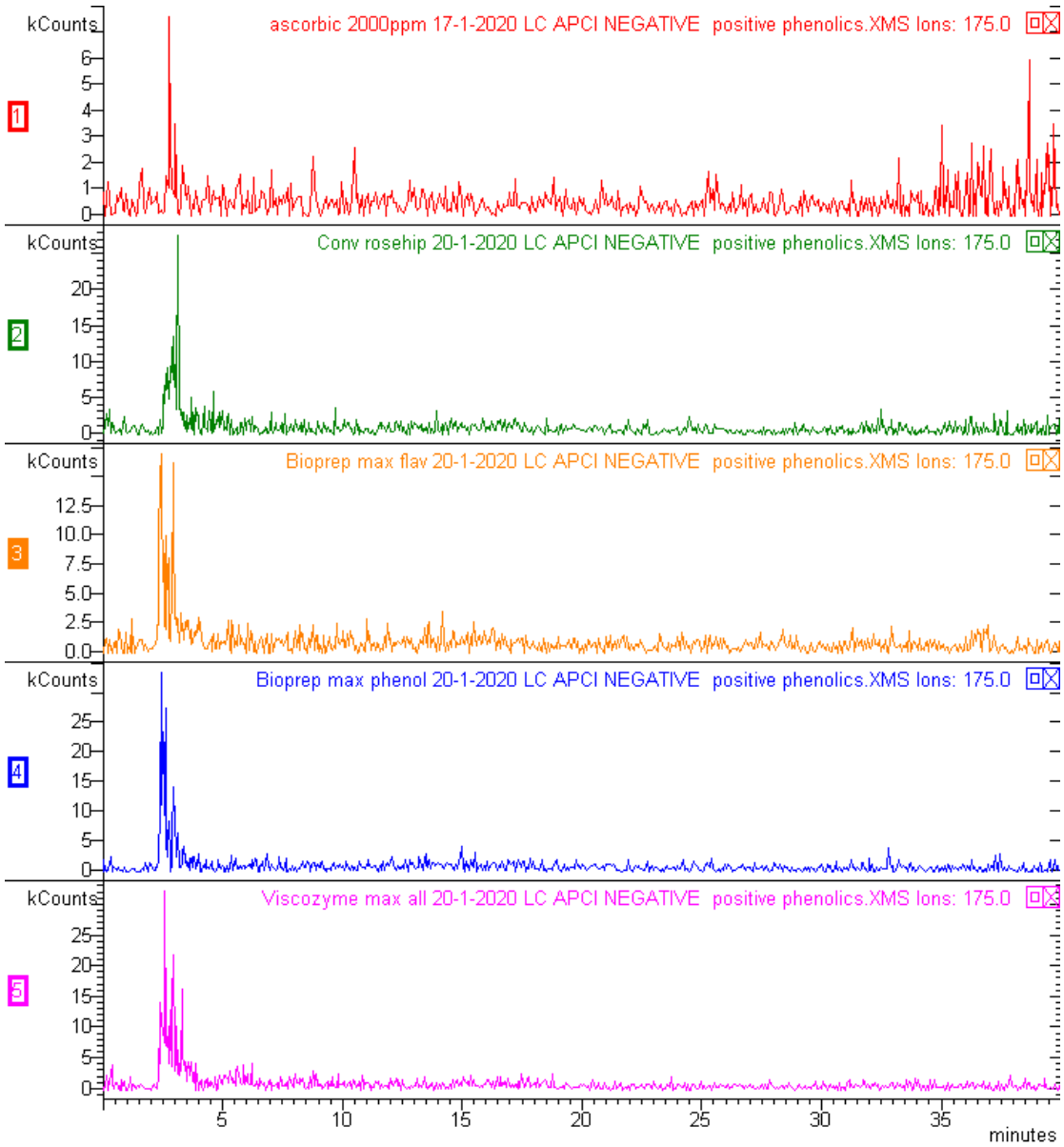


Εικόνα 19. Φάσμα μάζας του εκχυλίσματος της ΕΥΕ με BioPrep ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/g ξηρής πρώτης ύλης που προκατεργάστηκε για 5h, σε χρόνο 7,01 min

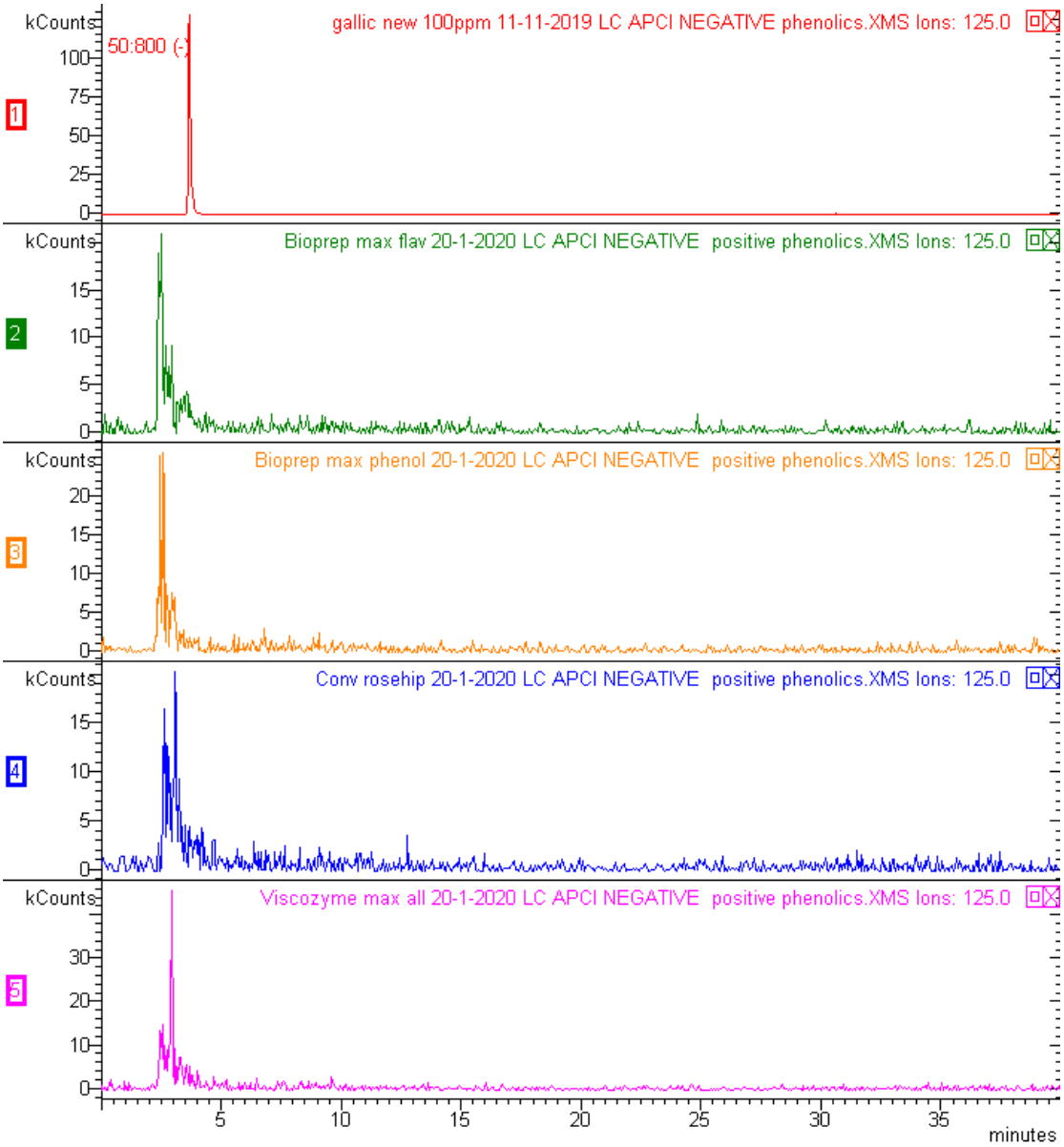
Το ιόν m/z: 175 αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ του ασκορβικού οξέος. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζεται μεμονωμένα το ιόν m/z: 175 (Εικόνα 20), παρατηρούμε ότι υπάρχει κορυφή του συγκεκριμένου ιόντος σε όλα τα εκχυλίσματα σε χρόνους περίπου 2,5 min, οι οποίοι πρακτικά συμπίπτουν με το χρόνο ανάσχεσης της πρότυπης ουσίας. Ως εκ τούτου οι κορυφές αυτές μπορούν να αποδοθούν στο ασκορβικό οξύ. Παρατηρούνται επίσης πολλαπλές κορυφές με πλουσιότερα φάσματα μάζας σε χρόνους λίγο πριν και λίγο μετά τα 2,5 λεπτά, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε παράγωγα του ασκορβικού οξέος.

Οι διαφορές στις ποσότητες της συγκεκριμένης ένωσης που παρουσιάζονται στο κάθε χρωματογράφημα, μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική μέθοδο εκχύλισης είτε στο ενζυμικό παρασκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην ΕΥΕ. Το εκχύλισμα συμβατικής εκχύλισης παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση του ιόντος, αντίστοιχη με τα εκχυλίσματα των ΕΥΕ με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων *BioPrep* (ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 5h προκατεργασίας) και *Viscozyme L.* (ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 5h προκατεργασίας). Σχετικά μικρότερη παρουσιάζεται η απόδοση στο εκχύλισμα της ΕΥΕ με *BioPrep* μικρότερου ενζυμικού φορτίου και χρόνου προκατεργασίας (bioprep max flavon).

Το ιόν m/z: 125 αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ του γαλλικού οξέος. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζεται το ιόν m/z: 125 (Εικόνα 21), παρατηρούμε ότι υπάρχει κορυφή του συγκεκριμένου ιόντος σε όλα τα δείγματα σε χρόνους περίπου 3 - 3,5 min, οι οποίοι όμως δεν αντιστοιχούν στο χρόνο ανάσχεσης της πρότυπης ουσίας. Ως εκ τούτου οι κορυφές αυτές μπορούν να αποδοθούν μόνον σε παράγωγα του γαλλικού οξέος. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, οι διαφοροποιήσεις που προκύπτουν στην ποσότητα του συγκεκριμένου ιόντος μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, στα διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν είτε σε ύπαρξη διαφορετικών παραγώγων του γαλλικού οξέος. Όπως προκύπτει, η χρήση του ενζυμικού σκευάσματος *Viscozyme L.* οδηγεί στην παραλαβή σχετικά υψηλότερης ποσότητας των παραγώγων του γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση των παραγώγων του γαλλικού οξέος στο εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης είναι συγκρίσιμη με αυτήν του εκχυλίσματος της προκατεργασίας με *Bioprep* με μικρό ενζυμικό φορτίο για μικρό χρόνο προκατεργασίας.



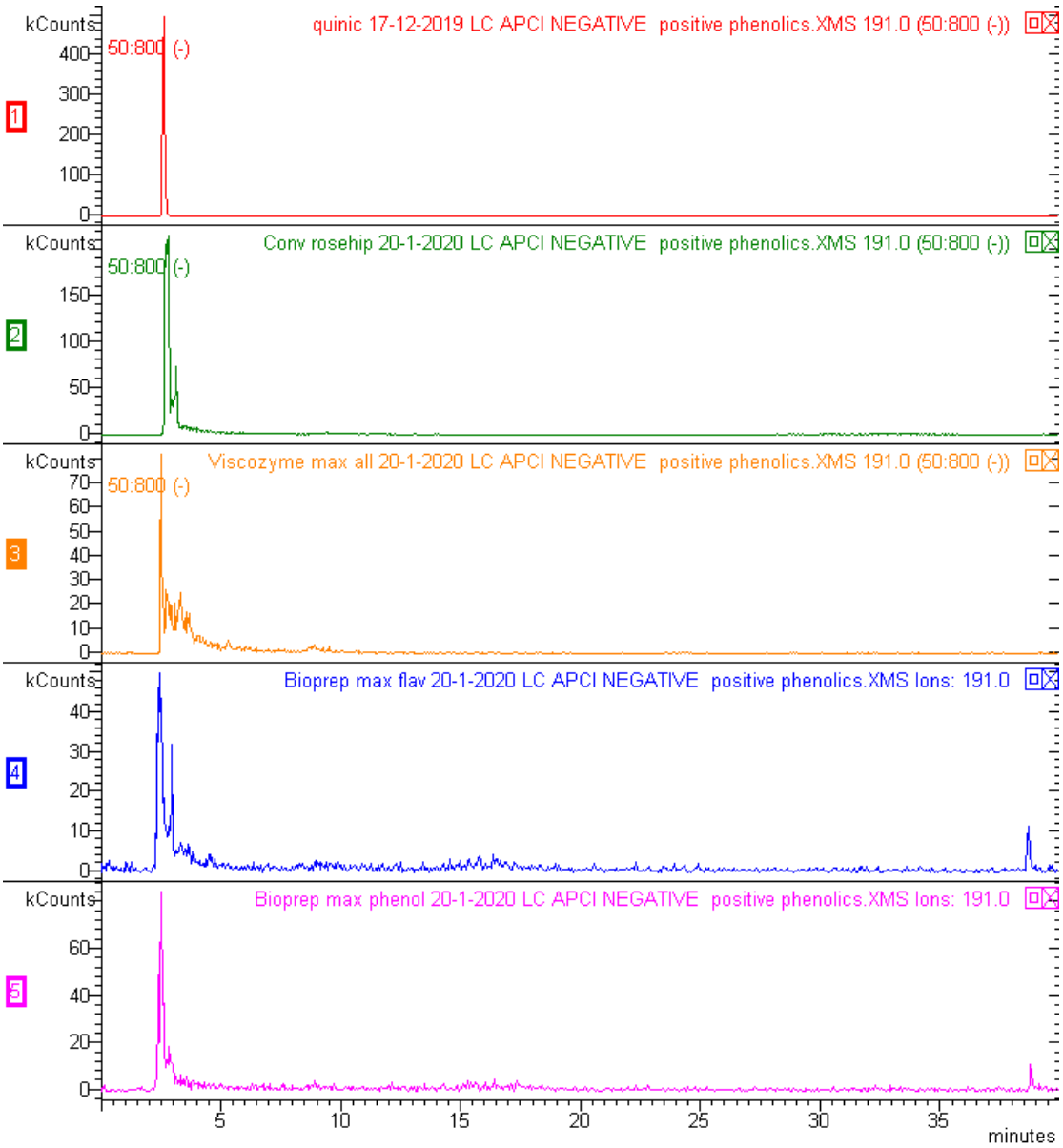
Εικόνα 20. Χρωματογράφημα ιόντος m/z: 175 για το ασκορβικό οξύ και τα αναλυθέντα εκχυλίσματα



Εικόνα 21. Χρωματογράφημα ιόντος m/z: 125 για το γαλλικό οξύ και τα αναλυθέντα εκχυλίσματα

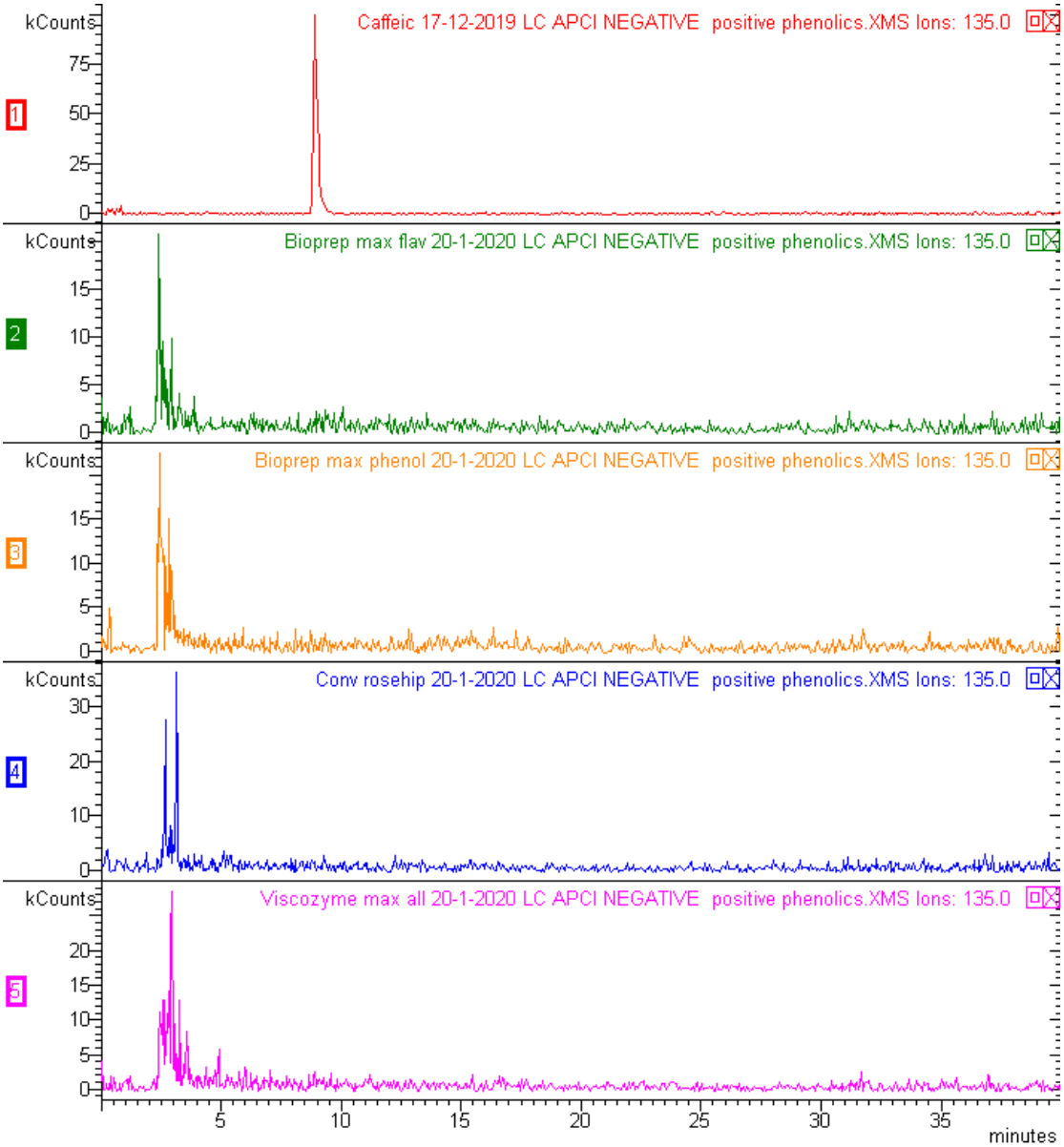
Το ιόν m/z: 191 αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ του κινικού οξέος. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζεται το ιόν m/z: 191 (Εικόνα 22), παρατηρούμε ότι υπάρχει κορυφή του συγκεκριμένου ιόντος σε όλα τα δείγματα σε χρόνους περίπου 2,5 min, οι οποίοι συμπίπτουν με το χρόνο ανάσχεσης της πρότυπης ουσίας. Ως εκ τούτου οι κορυφές αυτές μπορούν να αποδοθούν στο κινικό οξύ. Αντίστοιχα με τα ιόντα που προαναφέρθηκαν, είναι φανερή η ύπαρξη πολλαπλών κορυφών με πλουσιότερα φάσματα μάζας σε χρόνους λίγο πριν και λίγο μετά τα 2,5 λεπτά, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν σε παράγωγα του κινικού οξέος. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, οι διαφοροποιήσεις που προκύπτουν οφείλονται στους λόγους που προαναφέρθηκαν. Στην περίπτωση του κινικού οξέος, μεγαλύτερη ποσότητα του ιόντος παρουσιάζεται στο εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης, ενώ ακολουθούν τα εκχυλίσματα της ΕΥΕ με το ενζυμικό σκεύασμα *Viscozyme L.* και *Bioprep* ενζυμικού

φορτίου 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 5h προκατεργασίας αμφότερα. Μικρότερη ποσότητα του συγκεκριμένου ιόντος παρουσιάζεται στο εκχύλισμα της προκατεργασίας με *Bioprep* με μικρό ενζυμικό φορτίο για μικρό χρόνο προκατεργασίας.



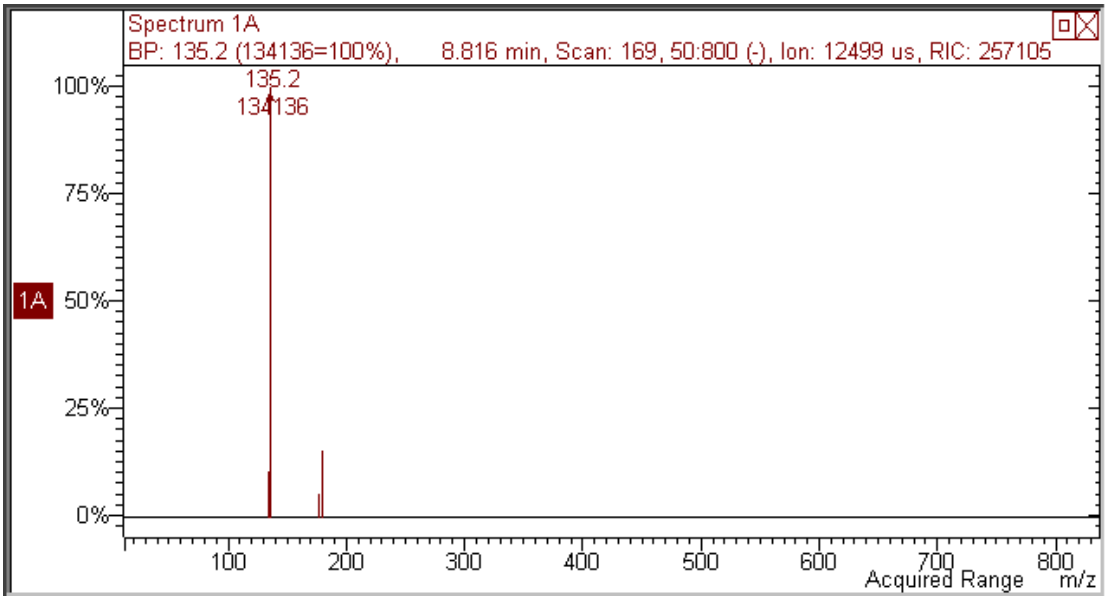
Εικόνα 22. Χρωματογράφημα του ιόντος m/z: 191 για το κινικό οξύ και τα αναλυθέντα εκχυλίσματα

Το ιόν m/z: 135 αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ του καφεϊκού οξέος. Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζεται το ιόν m/z: 135 (Εικόνα 23), παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν κορυφές που να αντιστοιχούν στο χρόνο έκλουσης του καφεϊκού οξέος, επομένως μπορούμε να πούμε ότι το καφεϊκό οξύ δεν ανιχνεύεται στα δείγματά μας. Παρόλα αυτά μπορούμε να αποδώσουμε την ύπαρξη ορισμένων πολλαπλών κορυφών με πολλαπλά φάσματα μάζας που παρατηρούνται σε χρόνο από 2 – 3,5 min, σε παράγωγα ή θραύσματα του καφεϊκού οξέος.



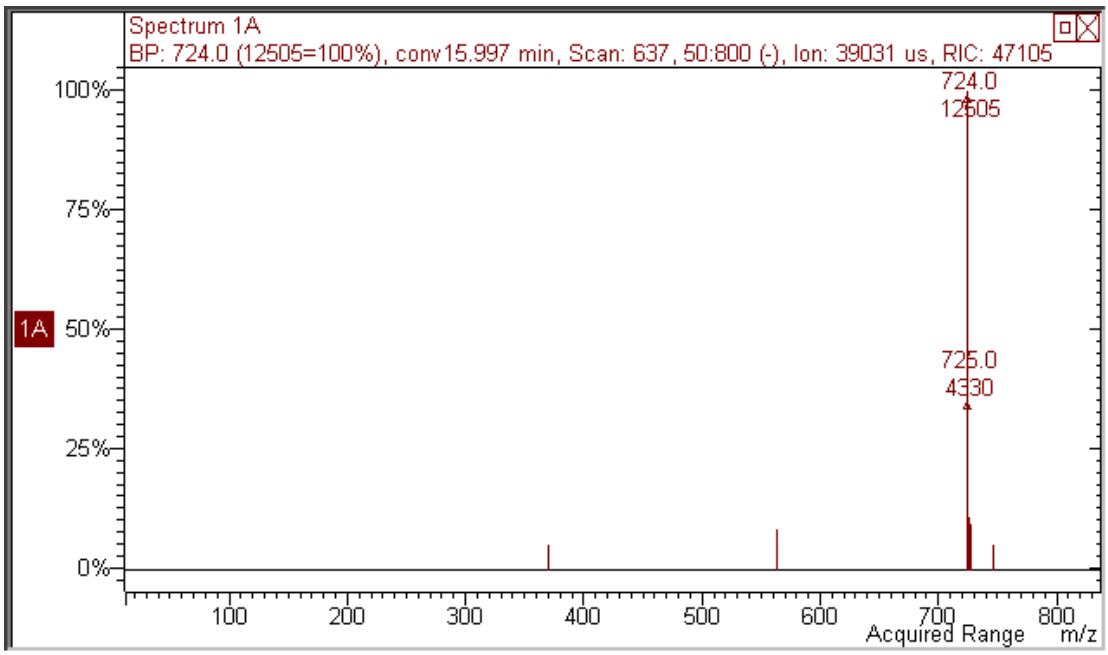
Εικόνα 23. Χρωματογραφήματα ιόντος m/z: 135 στο καφεϊκό οξύ και τα αναλυθέντα δείγματα

Το φάσμα μάζας του καφεϊκού οξέος σε χρόνο ανάσχεσης 8,816 min, και το κύριο ιόν αυτού παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.

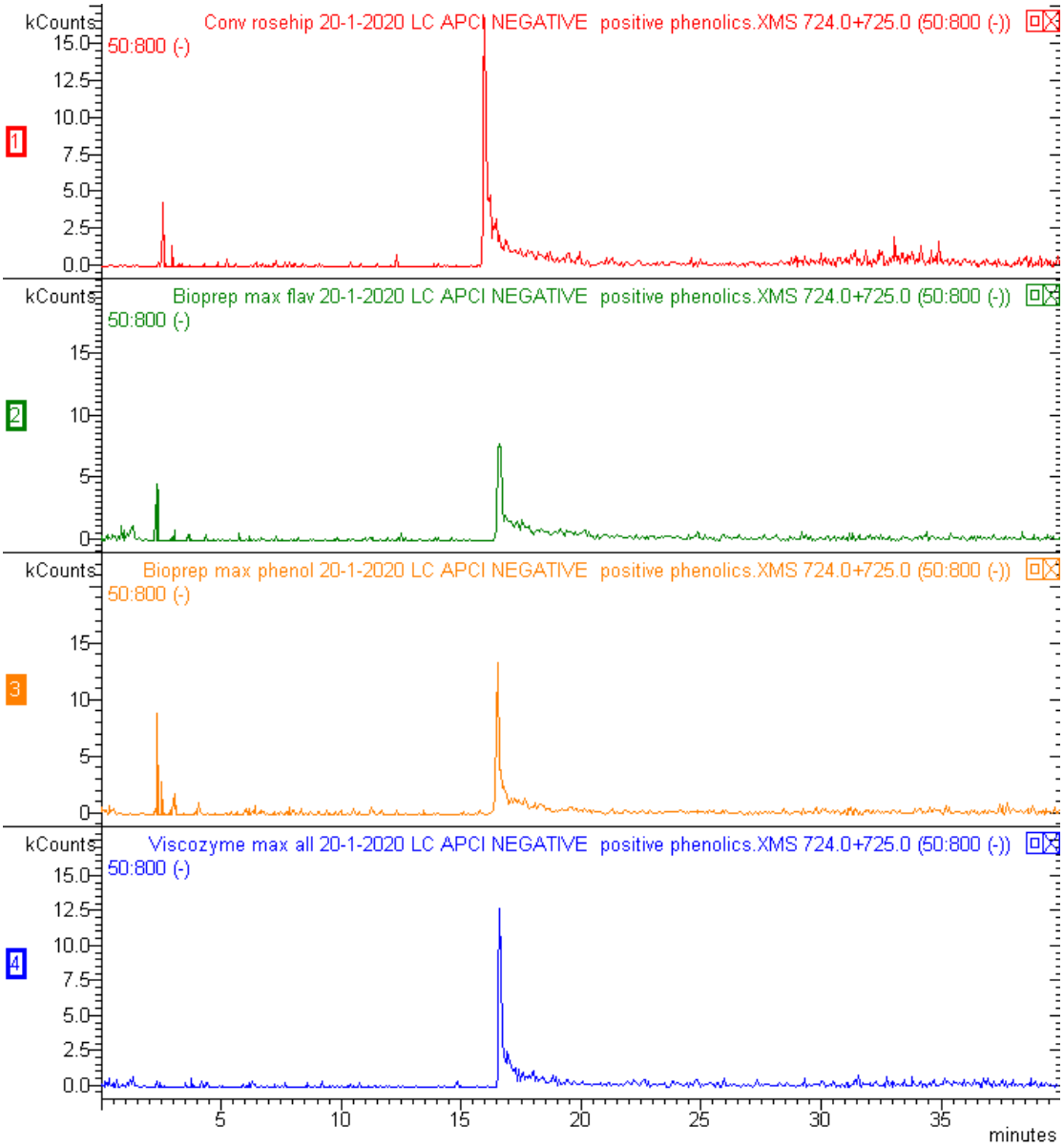


Εικόνα 24. Φάσμα μάζας καφεϊκού οξέος σε χρόνο 8,8 min

Στα χρωματογραφήματα των αναλυθέντων εκχυλισμάτων (Εικόνα 17) υπάρχουν διαφοροποιήσεις σε κορυφές που δεν έχουν ταυτοποιηθεί αλλά σύμφωνα με το φάσμα μάζας τους, φαίνεται να αντιστοιχούν σε καθαρές ενώσεις όπως για παράδειγμα η ένωση που εκλούεται σε χρόνο 15,997 min με ιόντα 724 και 725 στο εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης (Εικόνα 25), αλλά και στα υπόλοιπα αναλυθέντα εκχυλίσματα (Εικόνα 26).



Εικόνα 25. Φάσμα μάζας των ιόντων m/z: 724 + 725 στο εκχύλισμα της συμβατικής εκχύλισης



Εικόνα 26 Χρωματογράφημα ιόντων m/z: 724 + 725 στα αναλυθέντα δείγματα

Συμπερασματικά, μέσω της ανάλυσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, έγινε η ταυτοποίηση ορισμένων πρότυπων ενώσεων (κατεχίνης, ασκορβικού και κινικού οξέος) και παραγώγων αυτών. Παράλληλα αποδόθηκαν ορισμένες κορυφές σε παράγωγα ή θραύσματα του γαλλικού και του καφεϊκού οξέος, ενώ παρατηρήθηκαν και άλλες κορυφές οι οποίες δεν ταυτοποιήθηκαν αλλά μπορούν να αποδοθούν σε καθαρές ενώσεις. Όλα αυτά τα συμπεράσματα εξήχθησαν μέσω της σύγκρισης των φασμάτων των εκχυλισμάτων με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση των πρότυπων ουσιών. Πρέπει επίσης να αναφερθεί το γεγονός ότι αυτές οι ταυτοποιήσεις δεν μπορούν να θεωρηθούν απόλυτες, καθώς βασίζονται στο φάσμα μάζας των πρότυπων ουσιών χωρίς τον αντίστοιχο χρόνο ανάσχεσης αλλά και σε παρόμοιες έρευνες (Nadpal et al., 2016). Τέλος, ορισμένες διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν συγκριτικά με την ένταση των κορυφών και των χρόνο έκλουσης

ορισμένων ιόντων είναι αναμενόμενες και μπορούν να αποδοθούν στις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης αλλά και στα διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Συμπεράσματα

Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα και Προοπτικές

7.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης στις βιοδραστικές ενώσεις του καρπού του τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.* Ως εκ τούτου εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

Μέσω της σύγκρισης της MAE και της συμβατικής εκχύλισης σε δείγμα του καρπού του τριαντάφυλλου σε 40% αιθανολικό διάλυμα με συγκέντρωση στερεού 2% (w/v), προέκυψε ότι η συμβατική εκχύλιση έδωσε καλύτερη απόδοση σε βιοδραστικές ενώσεις, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με βιβλιογραφικές έρευνες (Azmir et al., 2013,Mariana Patrascu & Marilena Radoiu, 2016, Altemimi et al., 2017). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαφορές των συνθηκών της εκάστοτε εκχύλισης, καθώς η συμβατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες, ενώ η MAE σε 50 °C για 1 ώρα μόνο.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η παραλαβή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας βιοδραστικών ενώσεων. Συγκρίνοντας λοιπόν τα διάφορα μέρη του καρπού του τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.* (ολόκληρος καρπός, φλοιός και σπόρια ξεχωριστά), βρέθηκε ότι ο φλοιός είναι αυτός που περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών αλλά και αντιοξειδωτικής ικανότητας, ανεξαρτήτου της μεθόδου εκχύλισης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από αντίστοιχες έρευνες (Winther et al., 2016, Ilyasoğlu et al., 2014).

Εφαρμόστηκε EYE ως στάδιο προκατεργασίας της πρώτης ύλης, η οποία ακολουθήθηκε από συμβατική εκχύλιση, προκειμένου να γίνει διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος για να διευκολυνθεί η απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων που ήταν δεσμευμένες σε αυτό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρία ενζυμικά σκευάσματα· δύο κυτταρινολυτικά (*Cellic CTec2, Viscozyme L.*) και ένα πηκτινολυτικό (*BioPrep*). Για την διεξαγωγή των πειραμάτων εφαρμόστηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός τύπου Taguchi, στον οποίο οι παράγοντες ελέγχου ήταν ο χρόνος προκατεργασίας και το ενζυμικό φορτίο. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων εκχύλισης αποδεικνύεται ότι οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση στην παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων συγκριτικά με την απλή συμβατική εκχύλιση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά (Azmir et al., 2013, Nadar et al., 2018, Gligor et al., 2019).

Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα *Cellic CTec2,* οι μέγιστες τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών

φλαβονοειδών ήταν 6064,94 ± 118,44 mg/g ξηρής πρώτης ύλης και 304,53 ± 25,72 mg/g ξηρής πρώτης ύλης αντίστοιχα, οι οποίες επετεύχθησαν με τη χρήση ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 2h προκατεργασίας αμφότερες. Η τιμή του δείκτη IC_{50} κυμάνθηκε από 1,7 – 2,2 για τα διάφορα ενζυμικά φορτία και χρόνους προκατεργασίας, με τη μικρότερη να εμφανίζεται για ενζυμικό φορτίο 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 2h προκατεργασίας.

Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα *Viscozyme L.,* οι μέγιστες τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών ήταν 5853,85 ± 139,34 mg/g ξηρής πρώτης ύλης και 296,87 ± 1,35 mg/g ξηρής πρώτης ύλης αντίστοιχα, οι οποίες επετεύχθησαν με τη χρήση ενζυμικού φορτίου 2,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 8h προκατεργασίας αμφότερες. Η τιμή του δείκτη IC_{50} κυμάνθηκε από 1,0 – 1,3 για τα διάφορα ενζυμικά φορτία και χρόνους προκατεργασίας, με τη μικρότερη να εμφανίζεται για ενζυμικό φορτίο 5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης και 8h προκατεργασίας.

Τέλος, στην περίπτωση του ενζυμικού πηκτινολυτικού σκευάσματος *BioPrep,* οι μέγιστες τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών ήταν 6169,13 ± 83,60 mg/g ξηρής πρώτης ύλης και 561,99 ± 10,83 mg/g ξηρής πρώτης ύλης αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές επετεύχθησαν με τη χρήση ενζυμικού φορτίου 7,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης σε 5h προκατεργασίας και 2,5 Units/ g ξηρής πρώτης ύλης σε 8h προκατεργασίας αντίστοιχα. Η τιμή του δείκτη IC_{50} κυμάνθηκε από 1,1 – 1,5 για τα διάφορα ενζυμικά φορτία και χρόνους προκατεργασίας, με τη μικρότερη να εμφανίζεται σε αρκετές περιπτώσεις συνδυασμού ενζυμικού φορτίου και χρόνου προκατεργασίας (βλ. πίνακα 58).

Ένας δείκτης του κατά πόσο έχει αποδομηθεί το κυτταρικό τοίχωμα, είναι η απελευθέρωση της γλυκόζης και των ολικών αναγωγικών σακχάρων ανάλογα με το εκάστοτε χρησιμοποιούμενο ενζυμικό σκεύασμα. Οι ποσότητες των ολικών αναγωγικών σακχάρων και της γλυκόζης που απελευθερώθηκαν αναφορικά με το ενζυμικό σκεύασμα παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια 6.2.1.2, 6.2.2.2 και 6.2.3.2 μέσω των διαγραμμάτων 12, 15, 31, 34, 50 και 53.

Οι πειραματικές και οι προβλεπόμενες μέσω της μεθόδου Taguchi τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών, είναι αρκετά κοντά, με τις πειραματικές να αποδεικνύονται μεγαλύτερες στις περισσότερες περιπτώσεις (βλ. κεφάλαιο 6.3, πίνακα 59). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται το ποσοστό αύξησης των ολικών φαινολικών ενώσεων, ολικών φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής δράσης, της ΕΥΕ συγκριτικά με τη συμβατική εκχύλιση αλλά και συγκριτικά με τις προβλεπόμενες από το μοντέλο Taguchi τιμές.

Πίνακας 60. Ποσοστιαία αύξηση η μείωση των βιοδραστικών ενώσεων του συνδυασμού μεθόδων εκχύλισης συγκριτικά με τη συμβατική, και των πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών της μεθόδου Taguchi

		Ολικές φαινολικές ενώσεις	Ολικά φλαβονοειδή	Αντιοξειδωτική δράση
Συνδυασμός ΕΥΕ και συμβατικής συγκριτικά με συμβατική	Cellic CTec2	58 %	73 %	92 %
	Viscozyme L.	56 %	72 %	95 %
	BioPrep	59 %	85 %	95 %
Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών της μεθόδου Taguchi	Cellic CTec2	-0.38 %	2,41 %	-
	Viscozyme L.	2,47 %	0,79 %	-
	BioPrep	4,38 %	5,05 %	-

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι ο συνδυασμός της ΕΥΕ με συμβατική εκχύλιση βελτιώνει την απελευθέρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και ολικών φλαβονοειδών σε ποσοστά που ξεπερνούν το 56% και το 72% αντίστοιχα. Η μείωση της τιμής του δείκτη IC_{50} κατά την ΕΥΕ συγκριτικά με τη συμβατική, αποδεικνύει ότι με τη χρήση ενζύμων η αντιοξειδωτική ικανότητα του φλοιού βελτιώνεται κατά τα ποσοστά που παρουσιάζονται στον πίνακα 60.

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών της μεθόδου Taguchi για τις βιοδραστικές ενώσεις, παρατηρείται ότι βρίσκονται πολύ κοντά, με τις πειραματικές τιμές να βρίσκονται αυξημένες κατά τα ποσοστά που φαίνονται στον πίνακα. Η μόνη περίπτωση στην οποία η πειραματική τιμή είναι μικρότερη από την προβλεπόμενη είναι αυτή των ολικών φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα της ΕΥΕ με το ενζυμικό σκεύασμα *Cellic CTec2*. Ωστόσο το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από 0,5% και μπορεί να θεωρηθεί αμελητέο.

Εν κατακλείδι, και με βάση τα δεδομένα που φαίνονται στους πίνακες 59 και 60, συμπεραίνουμε ότι το ενζυμικό σκεύασμα που οδήγησε σε μεγαλύτερη παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων και αντιοξειδωτικής ικανότητας από τον φλοιό του καρπού του *Rosa Canina L.*, είναι το *BioPrep*.

Αναφορικά με την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας – φασματοσκοπίας μάζας (*LC – MS*), αρχικά επετεύχθη η λήψη φασμάτων πρότυπων ενώσεων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των εκχυλισμάτων που αναφέρονται στο κεφάλαιο 6.4. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα που αναλύθηκαν ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη ασκορβικού οξέος, κατεχίνης και κινικού οξέος ενώ ορισμένες κορυφές των χρωματογραφημάτων αποδόθηκαν σε παράγωγά τους. Πιθανολογείται η ύπαρξη παραγώγων του γαλλικού και καφεϊκού οξέος σε όλα τα δείγματα. Δεν ήταν δυνατόν

να ταυτοποιηθούν ορισμένες κύριες κορυφές των χρωματογραφημάτων παρόλο που φαίνεται να αντιστοιχούν σε καθαρές ενώσεις. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην ένταση των κορυφών είναι αναμενόμενες και αποδίδονται στην διαφορετική μέθοδο εκχύλισης (συμβατική και συνδυασμός μεθόδων), καθώς και στο εκάστοτε ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην ΕΥΕ.

7.2 Προοπτικές

Με βάση τα προαναφερθέντα, είναι φανερό ότι θα πρέπει να διεξαχθούν μελλοντικές έρευνες προκειμένου να ταυτοποιηθούν πρόσθετα συστατικά του καρπού του τριαντάφυλλου, τα οποία είναι πιθανό να είναι υπεύθυνα για ορισμένες βιοδραστικές ιδιότητες που έχει αποδειχθεί ότι κατέχει το φυτό. Παράλληλα, ενδείκνυται η εκτενέστερη μελέτη των συστατικών του καρπού όσον αφορά την ποσότητα αυτών, προκειμένου να βοηθήσουν στην ανάπτυξη ενός σωστού μοντέλου ελέγχου και τεχνικών που αφορούν την αναπαραγωγή του φυτού αλλά και την περίοδο μετά τη συγκομιδή αυτού (Winther et al., 2016). Ελκυστική επίσης φαίνεται και η ιδέα της χρήσης ενζύμων για την πλήρη παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων χωρίς τη χρήση διαλυτών. Η εφαρμογή ενζύμων με τη χρήση διαλυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω αύξηση της απόδοσης στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά (Industries, 2013).

Προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα του υψηλού κόστους των ενζύμων, μπορεί να γίνει η εκτενέστερη μελέτη των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτού προκειμένου να χρησιμοποιείται το εκάστοτε ένζυμο σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και όχι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απ’ ότι χρειάζεται. Η εκτενέστερη μελέτη των κυτταρικών τοιχωμάτων μπορεί παράλληλα να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων ενζύμων που θα δράσουν σε συνεργεία για την καλύτερη απόδοση στην παραλαβή των βιοδραστικών ενώσεων. Μέσω της γενετικής μηχανικής μπορούν να δημιουργηθούν ενζυμικά παρασκευάσματα τα οποία θα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά και θα απαιτούν χαμηλές συγκεντρώσεις για τα προσδοκώμενα αποτελέσματα, μειώνοντας έτσι το κόστος των ενζύμων που θα χρησιμοποιηθούν.

Βιβλιογραφία

A Agbor, G., Vinson, J. A., & Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, *August*, 147–156. https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028

Afanas'ev, I. B., Dcrozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, *38*(11), 1763–1769. https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3

Ahmad, N., Anwar, F., & Gilani, A. ul H. (2015). Rose Hip (Rosa canina L.) oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, *January 2018*, 667–675. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00076-6

Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, *31*(3), 227–249. https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677

Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, *6*(4). https://doi.org/10.3390/plants6040042

Anokwuru, C. P., Anyasor, G. N., O., A., O., F., & P., O. (2011). Effect of Extraction Solvents on Phenolic, Flavonoid and Antioxidant activities of Three Nigerian Medicinal Plants. *Nature and Science*, *9*(7), 53–61.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042

Bhave, A., Schulzova, V., Chmelarova, H., Mrnka, L., & Hajslova, J. (2017). Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(3), 681–690. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.019

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. https://doi.org/10.3906/sag-1411-35

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*(4), 859–871. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001

Choudhury, A. K. R. (n.d.). *Textile Preparation and Dyeing*. Retrieved January 28, 2020, from

https://books.google.gr/books?id=0TamObsaaPQC&pg=PA185&lpg=PA185&dq=bioprep+3000l&source=bl&ots=7F36ba9yeW&sig=ACfU3U3wJEbkWrKFkxPRTuVK9p-JCEJ5iw&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjM3Nep-qbnAhWkw6YKHbsSDjAQ6AEwA3oECAkQAQ#v=onepage&q&f=false

Davis, R., & John, P. (2018). Application of Taguchi-Based Design of Experiments for Industrial Chemical Processes. *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*. https://doi.org/10.5772/intechopen.69501

Demir, N., Yildiz, O., Alpaslan, M., & Hayaloglu, A. A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (Rosa L.) fruits in Turkey. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(1), 126–133. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038

Fascella, G., D'Angiolillo, F., Mammano, M. M., Amenta, M., Romeo, F. V., Rapisarda, P., & Ballistreri, G. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora. *Food Chemistry*, *289*(March), 56–64. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.127

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, *88*(September 2018), 302–315. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029

Hasçalik, A., & Çaydaş, U. (2008). Optimization of turning parameters for surface roughness and tool life based on the Taguchi method. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, *38*(9–10), 896–903. https://doi.org/10.1007/s00170-007-1147-0

Hosni, K., Chrif, R., Zahed, N., Abid, I., Medfei, W., Sebei, H., & Ben Brahim, N. (2010). Fatty acid and phenolic constituents of leaves, flowers and fruits of tunisian dog rose (Rosa canina L.). *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, *87*(2), 117–123.

Ilyasoğlu, H. (2014). Characterization of rosehip (Rosa canina L.) seed and seed oil. *International Journal of Food Properties*, *17*(7), 1591–1598. https://doi.org/10.1080/10942912.2013.777075

Industries, S. (2013). *Enzyme -Assisted extraction of Bioingredients (PDF Download Available).pdf*. *October*.

Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, J. M., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid-&bgr; aggregation by resveratrol oligomers from Vitis amurensis. *Phytotherapy Research*, *22*(4), 544–549. https://doi.org/10.1002/ptr

Jiménez, S., Jiménez-Moreno, N., Luquin, A., Laguna, M., Rodríguez-Yoldi, M. J., & Ancín-Azpilicueta, C. (2017). Chemical composition of rosehips from different Rosa species: an alternative source of antioxidants for the food industry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and*

Risk Assessment, *34*(7), 1121–1130. https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1319071

Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., & Ombódi, A. (2018). Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some Rosa Species. *Medicines*, *5*(3), 84. https://doi.org/10.3390/medicines5030084

Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*(1). https://doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, *21*(10). https://doi.org/10.3390/molecules21101374

Liu, H., Song, Y., & Zhang, X. (2017). Determination of total flavonoids in leek by AlCl3 colorimetric assay. *Chemical Engineering Transactions*, *59*, 775–780. https://doi.org/10.3303/CET1759130

Majors, R. E. (2011). Solid-Phase Extraction. In *Handbook of Sample Preparation*. https://doi.org/10.1002/9780813823621.ch4

Mariana Patrascu, & Marilena Radoiu. (2016). Rose Essential Oil Extraction from Fresh Petals Using Synergetic Microwave & Ultrasound Energy: Chemical Composition and Antioxidant Activity Assessment. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, *10*(3), 136–142. https://doi.org/10.17265/1934-7375/2016.03.004

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, *108*(2017), 309–330. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006

Nadpal, J. D., Lesjak, M. M., Šibul, F. S., Anačkov, G. T., Četojević-Simin, D. D., Mimica-Dukić, N. M., & Beara, I. N. (2016). Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: Rosa canina L. and Rosa arvensis Huds. *Food Chemistry*, *192*, 907–914. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.089

novozymes. (2010). *FUEL ETHANOL APPLICATION SHEET Cellic® CTec2 and HTec2-Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials*. 1–9. http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf

Novozymes. (2002). *Product sheet viscozyme L*. 1. http://www.ebiosis.co.kr/Novozymes Product Sheet/Viscozyme L.pdf

Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, Å., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24), 7264–7271. https://doi.org/10.1021/jf030479p

Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F., & Cristani, M. (2016). Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild Rosa species grown in different Tunisia regions: Rosa canina L., Rosa moschata Herrm. and Rosa sempervirens L. *Industrial Crops and Products*, *94*, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.019

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, *7*(9), 1776–1782. https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x

Pitt, J. J. (2009). *J.J.Pitt 2009 - Clin Biochem Rev. Feb; (30) Pages 19–34*. *30*(February), 19–34.

Prado, J. M., Vardanega, R., Debien, I. C. N., Meireles, M. A. de A., Gerschenson, L. N., Sowbhagya, H. B., & Chemat, S. (2015). Chapter 6 – Conventional extraction. In *Food Waste Recovery*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0.00006-7

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, *30*(1), 37–44. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014

Samanta, A., Das, G., & Das, S. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, *100*(January 2011), 6.

Schwager, J., Richard, N., Schoop, R., & Wolfram, S. (2014). A novel rose hip preparation with enhanced anti-inflammatory and chondroprotective effects. *Mediators of Inflammation*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/105710

Sciences, E., & Lumpur, K. (2017). *Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites*. https://doi.org/10.15242/iie.c0517024

Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*(SUPPL. 2), 310–329. https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039

Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*(1), 67–103. https://doi.org/10.1080/10408399209527581

Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-

802104-0.00010-X

Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1740*(2), 101–107. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.006

Tradit, A. J., Altern, C., Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Latha, L. Y., Bedong-semeling, J., & Nasi, B. A. (2007). Proper Actions. *Lecture Notes in Mathematics*, *1902*, 121–130. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69153-2_6

Tumbas, V. T., Čanadanović-Brunet, J. M., Četojević-Simin, D. D., Ćetković, G. S., Dilas, S. M., & Gille, L. (2012). Effect of rosehip (Rosa canina L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(6), 1273–1281. https://doi.org/10.1002/jsfa.4695

Winther, K., Campbell-Tofte, J., & Vinther Hansen, A. S. (2016). Bioactive ingredients of rose hips (Rosa canina L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, 11. https://doi.org/10.2147/btat.s91385

Yahya, N. A., Attan, N., & Wahab, R. A. (2018). An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, *112*, 69–85. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.002

Κυριακοπούλου, Κ. (2016). *Πράσινες διεργασίες εκχύλισης: σχεδιασμός λειτουργικών εκχυλισμάτων φυτών και παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων: ανάλυση κύκλου ζωής τους*. http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/39034#page/59/mode/1up

Μητρόπουλος, Θ. (2017). *Βελτιστοποίηση στίλβωσης επίπεδων μεταλλικών επιφανειών σε κέντρα κατεργασιών CNC*.

Παπαδάκης, Ι., Κανελάκης, Δ., Λιονάκης, Σ., Σωτηρόπουλος, Θ., Θεριός, Ι., & Στυλιανίδης, Δ. (2008). *Οι ανάγκες σε επικονίαση των πυρηνοκάρπων δένδρων*.

Τσιμογιάννης, Δ. Ι. (2008). *Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων*. http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/17345?id=17345&lang=en&p=1#page/55/mode/1up