

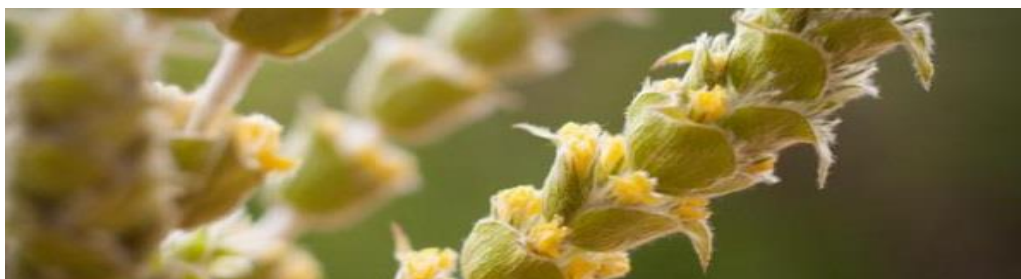


ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ
ΕΝΔΗΜΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΣΑΓΙΟΥ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΕΡΤΙΛΗ ΕΛΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2020

Στη Μνήμη της Γιαγιάς μου

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία, διεξήχθη βάση του προγράμματος σπουδών της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκου. Η πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και στο Οριζόντιο Εργαστήριο αναλύσεων της σχολής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως, για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση τους, όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην περάτωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Τον καθηγητή ΕΜΠ κ. Δημήτρη Κέκο, για την εμπιστοσύνη του και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, τις πολύτιμες γνώσεις του και τη βοήθεια του καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης.

Την επίκουρο καθηγήτρια Διομή Μαμμά για τη συνεχή καθοδήγηση και τη στήριξή της σε όλους τους τομείς, επιστημονικούς και μη. Την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Θεόπιστη Λυμπεροπούλου, υπεύθυνη του οριζόντιου εργαστηρίου, για την επιστημονική υποστήριξή της και την άψογη συνεργασία μας. Η βοήθεια τους σε οποιαδήποτε απορία προέκυψε ήταν καθοριστική.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας καθώς και την υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο οργανικής χημείας, Νεφέλη Ποντίλλο, για τη δημιουργία φιλικού περιβάλλοντος και τη βοήθεια τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την κατανόηση τους, όχι μόνο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά καθόλη τη διάρκεια της φοίτησης μου στη σχολή.

Περίληψη

Το Ελληνικό τσάι του βουνού, γένος *Sideritis*, είναι ευρέως διαδεδομένο λόγω της ιατροφαρμακευτικής δράσης του και εκχυλίσματα αυτού καταναλώνονται ως αφέψημα από την αρχαιότητα. Στη σύγχρονη εποχή πραγματοποιούνται πολλές έρευνες με σκοπό τη μελέτη των βιοδραστικών ενώσεων, που περιέχονται στο γένος *Sideritis*.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με συμβατική εκχύλιση καθώς και με συνδυασμό ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης με συμβατική. Η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε μεθόδου εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών (μέθοδος Folin-Ciocalteu), των ολικών φλαβονοειδών (μέθοδος χλωριούχου αργιλίου), όπως επίσης και με την ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος του αντιδραστηρίου DPPH) των εκχυλισμάτων. Από τη συμβατική εκχύλιση στα πέντε διαφορετικά είδη τσαγιού προκύπτει ότι το είδος *Sideritis syriaca* εμφανίζει το υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά ακολουθούμενο, κατά σειρά, από τα *S. clandestina*, *S. scardica*, *S. euboica* και *S. raeseri*. Τα ολικά φλαβονοειδή δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές.

Αναφορικά, στην περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης, διερευνήθηκε η επίδραση της σύστασης του διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης και της συγκέντρωσης του στερεού στο εκχυλιζόμενο δείγμα. Από τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψε ότι το βέλτιστο μίγμα αιθανόλης/νερού ήταν 60/40 (o/o). Η αύξηση του χρόνου συμβατικής εκχύλισης αυξάνει την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τέλος η αύξηση της συγκέντρωσης του στερεού κατά την εκχύλιση, οδήγησε σε μικρή αύξηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή καθώς και στην αντιοξειδωτική του ικανότητα.

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε ως «προκατεργασία» της πρώτης ύλης και ακολουθήθηκε από συμβατική εκχύλιση. Στόχος ήταν η μερική αποδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος με χρήση των κατάλληλων ενζυμικών συστημάτων και η βελτίωση της απελευθέρωσης των βιοδραστικών συστατικών. Μελετήθηκε η επίδραση δύο διαφορετικών κυτταρινολυτικών σκευασμάτων (*Cellic CTec2* και *Viscozyme L.*) και η συνεργιστική δράση του *Cellic CTec2* με το ημικυτταρινολυτικό σκεύασμα *Cellic HTec2*. Εφαρμόστηκε πειραματικός σχεδιασμός Taguchi με παράγοντες ελέγχου το χρόνο ενζυμικής κατεργασίας και το ενζυμικό φορτίο. Στην περίπτωση της συνεργιστικής δράσης οι παράγοντες ελέγχου ήταν η αναλογία των δύο ενζυμικών σκευασμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης του σχεδιασμού Taguchi, η μέγιστη περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βιοδραστικές ενώσεις επιτυγχάνεται με εφαρμογή 2.5 Units/g DM *Cellic CTec2* και 2 ωρών προκατεργασίας. Στην περίπτωση του σκευάσματος *Viscozyme L.* με εφαρμογή 7.5 Units/g DM του σκευάσματος, για 2 ώρες ενζυμικής προκατεργασίας εντοπίζεται το υψηλότερο περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών, ενώ για 8 ώρες προκατεργασίας μεγιστοποιείται το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή. Η

αντιοξειδωτική ικανότητα βελτιστοποιείται για 5 Units/g DM μετά από 8 ώρες προκατεργασίας. Η συνεργιστική δράση των σκευασμάτων Cellic CTec2 και Cellic HTec2 παρουσιάζει βέλτιστα αποτελέσματα ολικών φαινολικών συστατικών για ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 4.5 Units/g DM και 0.25 Units/g DM Cellic HTec2 και μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα για το ίδιο ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και 0.75 Units/g DM Cellic HTec2. Επιπρόσθετα υψηλότερο περιεχόμενο φλαβονοειδών εντοπίζεται μετά από κατεργασία με 2.25 Units/g DM Cellic CTec2 και 0.75 Units/g DM Cellic HTec2. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του σχεδιασμού Taguchi, για τις τρεις περιπτώσεις ενζυμικής προκατεργασίας παρατηρείται ότι από το ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 σε ποσότητα 2.5 Units/g DM και 2 ώρες προκατεργασίας προκύπτουν τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 στο βέλτιστο ζεύγος συνθηκών που προέκυψε από το σχεδιασμό στην προκατεργασία των πέντε διαφορετικών ειδών τσαγιού. Το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά διαφοροποιείται μεταξύ των ειδών όμοια με την περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης. Μέγιστα αποτελέσματα, ως προς το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική ικανότητα, εντοπίζονται στο είδος *Sideritis clandestina* και ακολουθούν τα υπόλοιπα με την εξής σειρά: *S. syriaca*, *S. scardica*, *S. euboica* και *S. raeseri*. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τα πέντε είδη τσαγιού από τις δύο μεθόδους εκχύλισης παρατηρείται ότι το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε βιοδραστικές ενώσεις εμφανίζει αύξηση στην περίπτωση της προκατεργασίας με ένζυμο.

Η διπλωματική εργασία περιλάμβανε, επίσης, την ταυτοποίηση συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα των πέντε διαφορετικών ειδών τσαγιού, μετά από συμβατική εκχύλιση και μετά από το συνδυασμό της με EYE, με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Τα προφίλ όλων των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν μελετήθηκαν συγκριτικά ενώ επιπλέον ταυτοποιήθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε κινικό και φερουλικό οξύ, ή παράγωγα τους.

Τέλος με χρήση της μεθόδου επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (ICP-MS), καθώς και με φασματομετρία οπτικής εκπομπής (ICP-OES) προσδιορίζεται το περιεχόμενο όλων των ειδών *Sideritis* σε μέταλλα και σπάνιες γαίες. Από την ανάλυση προέκυψε ότι το είδος *Sideritis syriaca* περιέχει τις υψηλότερες ποσότητες των μετρούμενων στοιχείων συγκριτικά με τα υπόλοιπα, ενώ το *Sideritis euboica* παρουσιάζει χαμηλό περιεχόμενο σε σπάνιες γαίες.

Λέξεις-κλειδιά: Τσάι του βουνού, εκχύλιση, ένζυμο, σχεδιασμός Taguchi, φαινολικά, αντιοξειδωτικά, υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

Abstract

The Greek mountain tea, genus *Sideritis*, is widespread because of its medical activity and its extracts have been used as decoction since ancient times. Several researches are currently being carried out to analyze bioactive compounds found in genus *Sideritis*.

In the present thesis, the extraction of bioactive compounds was carried out by conventional extraction as well as combining enzyme assisted extraction with conventional. The effectiveness of each method was evaluated by determining total phenolic components (Folin-Ciocalteu method), total flavonoids (aluminum chloride method), as well as antioxidant activity (DPPH reagent method) of the extracts. Conventional extraction of five different tea species indicates that *Sideritis syriaca* exhibits the highest content in total phenolics followed, by *S. clandestina*, *S. scardica*, *S. euboea* and *S. raeseri*. Total flavonoid content does not differ significantly.

In the case of conventional extraction, the effect of solvent composition, extraction time and concentration of solid in the extracted sample were examined. Experimental results showed that the optimum ethanol / water mixture was 60/40 (v/v). Increasing the duration of conventional extraction increases the content of the extract in phenolic compounds and flavonoids while at the same time reduces the antioxidant activity of the extract. At last, the increase in solid concentration during extraction resulted in a slight increase in the content of the extract in bioactive compounds.

Enzyme assisted extraction was used as a pretreatment of raw material followed by conventional extraction. The aim was to partially degrade the plant cell wall using the appropriate enzyme systems and enhance bioactive component release. The effect of two different cellulolytic enzymes (Cellic CTec2 and Viscozyme L.) as well as the Cellic CTec2 synergy with Cellic HTec2 hemicellulolytic enzyme were examined. Taguchi design was applied with control factors the time and enzyme load. Synergy experiment's control factors were the ratio of the two enzyme preparations. Based on the results of the Taguchi design analysis, maximum content of the extract in bioactive compounds is achieved applying 2.5 Units / g DM Cellic CTec2 and 2 hours of pretreatment.

Finally, Cellic CTec2 enzyme preparation was used in the optimal pair of conditions resulting from Taguchi design in the pretreatment of the five different tea species. The content of the extracts in total phenolic compounds varies from one species to another similar to that of conventional extraction. *Sideritis clandestine* extract had the highest content in flavonoid and the highest antioxidant activity followed by *S. syriaca*, *S. scardica*, *S. euboea* and *S. raeseri*. Comparing the results from both extraction methods of the five tea species, there is a significant increase in the content of the extracts in bioactive compounds in case of enzyme pretreatment.

This thesis also included the identification of components in the extracts of five different tea species, after conventional extraction and when combined with enzyme assisted extraction, using liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS) technique. The profiles of all the analyzed extracts were studied comparatively, with peaks corresponding to quinic acid and ferulic acid, or their derivatives.

At last, using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) methods, a study is performed to determine the content of all *Sideritis* species in metals and rare earth elements. The analysis showed that *Sideritis syriaca* contains the highest amounts of measured data compared to the others, while *Sideritis euboica* has a low rare earth content.

Keywords: *Sideritis* mountain tea, extraction, enzymes, Taguchi design, phenols, antioxidants, LC-MS, ICP-MS/ ICP-OES

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract	6
Θεωρητικό Μέρος	11
1 Sideritis spp.	12
1.1 Χαρακτηριστικά.....	12
1.2 Μορφολογία (botanical aspects)	13
1.3 Παραδοσιακές χρήσεις.....	14
1.4 Χημική Σύσταση	15
1.4.1 Τερπένια	15
1.4.2 Φλαβονοειδή.....	16
1.4.3 Αιθέρια έλαια	16
1.4.4 Άλλα Συστατικά	17
1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	18
1.5.1 Αντιφλεγμονώδη δράση.....	18
1.5.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	18
1.5.3 Αντιμικροβιακή δράση	19
1.5.4 Αντιελκώδης δράση.....	19
1.5.5 Αναλγητική δράση.....	19
1.5.6 Άλλες δράσεις.....	20
2 Εκχύλιση δραστικών συστατικών.....	20
2.1 Τεχνικές εκχύλισης	20
2.2 Παράμετροι Εκχύλισης.....	21
2.3 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	22
2.4 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	22
2.4.1 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση	23
3 Φαινολικές ενώσεις.....	30
3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	30
3.2 Φαινολικά Οξέα.....	32
3.3 Φλαβονοειδή.....	33
3.4 Τανίνες.....	35
4 Αντιοξειδωτικά	35
4.1 Ελεύθερες ρίζες.....	35

4.2	Αντιοξειδωτικά	36
4.2.1	Φυσικά και Συνθετικά αντιοξειδωτικά	37
4.2.2	Πρωτοταγή και Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά	38
	Μέθοδοι και Υλικά	39
5	Υλικά.....	40
5.1	Πρώτες ύλες	40
5.2	Όργανα και Συσκευές.....	40
5.3	Αντιδραστήρια και Ένζυμα	41
5.3.1	Αντιδραστήρια και τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits).....	41
5.3.2	Ενζυμα	41
6	Μέθοδοι.....	41
6.1	Μέθοδος σχεδιασμού Taguchi.....	41
6.2	Μέθοδοι Εκχύλισης.....	44
6.2.1	Συμβατική εκχύλιση	44
6.2.2	Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης.....	46
6.3	Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	49
6.3.1	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών, μέθοδος Folin-Ciocalteu ..	49
6.3.2	Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών, μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου	52
6.3.3	Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέθοδος DPPH.....	55
6.3.4	Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης	57
6.3.5	Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων	58
6.4	Προσδιορισμός βασικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα	58
6.5	Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (LC-MS)	59
6.6	Φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) & (ICP-OES).....	60
	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	62
7	Προσδιορισμός βασικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα.....	63
8	Μελέτη βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων	63
8.1	Συμβατική εκχύλιση	63
8.1.1	Επίδραση σύστασης διαλύτη	63
8.1.2	Επίδραση συγκέντρωσης τσαγιού.....	67
8.1.3	Επίδραση χρόνου εκχύλισης	70
8.1.4	Είδος τσαγιού	73
8.2	Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης (Συμβατική και EYE)	77
8.2.1	Επίδραση ενζυμικού φορτίου Cellic CTec2	77
8.2.2	EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2	80

8.2.3	EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Viscozyme	98
8.2.4	EYE με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων Cellic CTec2 και Cellic HTec2 ..	115
8.2.5	EYE όλων των ειδών τσαγιού	134
9	Υγρή χρωματογραφία- Φασματομετρία μάζας (LC-MS).....	139
10	Φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) & (ICP-OES).....	144
	Συμπεράσματα	149
	Βιβλιογραφία	151



Θεωρητικό Μέρος

1 *Sideritis* spp.

1.1 Χαρακτηριστικά

Το γένος *Sideritis* ανήκει στην οικογένεια Labiateae, η οποία αποτελείται από πάνω από 150 είδη τσαγιού. Τα είδη αυτά εντοπίζονται σε διάφορες τροπικές ζώνες, από τις Μπαχάμες έως τη δυτική Κίνα και από την Γερμανία έως το Μαρόκο. Βέβαια τα περισσότερα είδη ευδοκιμούν σε μεσογειακές περιοχές, ιδίως στην Ισπανία και την Τουρκία όπου εμφανίζεται ο μεγαλύτερος αριθμός διαφορετικών ειδών *Sideritis* (Guvenc et al., 2005)

Ετυμολογικά το όνομα του γένους *Sideritis* L. προέρχεται από την ελληνική λέξη «σίδηρο», καθώς τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα στην επούλωση πληγών που είχαν προκληθεί από σιδερένια όπλα. Επιπλέον η ευρεία χρήση τους από την αρχαιότητα οφειλόταν στις αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους.



Εικόνα 1-1. *Sideritis clandestina* & *raeseri* (από αριστερά)

Το τσάι του *Sideritis* έχει διάφορα ονόματα, με επικρατέστερη ονομασία του «τσάι του βουνού», λόγω της ιδιότητας πολλών ειδών του *Sideritis* να ευδοκιμούν σε μεγάλο υψόμετρο.

Τα κυριότερα είδη στην Ελλάδα είναι :

1. ***Sideritis athena***. Γνωστό με τα ονόματα τσάι Βλάχικο και στο Άγιο Όρος Μπεττόνικα. Αυτοφύεται στον Άθω, στην Πίνδο και στα ορεινά του νησιού Σαμοθράκη.
2. ***Sideritis sipylea***. Είναι είδος της Δυτικής και Κεντρικής Μικράς Ασίας, που εξαπλώνεται στα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου (Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ικαρία) και φύεται σε ανοικτά, βραχώδη μέρη πάνω από 1.400 μ.
3. ***Sideritis clandestina***. Γνωστό ως τσάι του Μαλεβού ή τσάι του Ταΰγετου. Αυτοφύεται πάνω στους βράχους στις υποαλπικές και αλπικές περιοχές του Μαλεβού, του Ταΰγετου και της Κυλήνης.

4. ***Sideritis scardica***. Είναι γνωστό ως τσάι του Ολύμπου. Αυτοφύεται σε βραχώδη εδάφη της υποαλπικής ζώνης του Ολύμπου, Κισσάβου, Πηλίου και Σκάρδου.
5. ***Sideritis raeseri***. Τσάι του Παρνασσού ή τσάι του Βελουχιού. Αυτοφύεται στον Παρνασσό, Τυμφρηστό (Βελούχι) και σε άλλα βουνά της Αιτωλίας, Δωρίδας και Φθιώτιδας. Στο είδος αυτό υπάγονται τα υποείδη:
 - i. *S. raeseri ssp. raeseri*
 - ii. *S. raeseri ssp. attica*, που αυτοφύεται στην Πάρνηθα και στο όρος Πατέρα της Αττικής.
 - iii. *S. raeseri ssp. florida*
6. ***Sideritis syriaca* L.** Είναι γνωστό ως τσάι της Κρήτης, ως Μαλοτήρας και ως Καλοκοιμηθιά. Αυτοφύεται στα ψηλά βουνά της Κρήτης και κυρίως στα Λευκά όρη και στον Ψηλορείτη, σε υψόμετρο από 1.300 έως 2.000 μέτρα. Το όνομα Μαλοτήρα προέρχεται από τις Ιταλικές λέξεις male (αρρώστια) και tirare (σύρω), επειδή στην ενετοκρατούμενη Κρήτη το θεωρούσαν πανάκεια για τα κρυολογήματα και τις παθήσεις του αναπνευστικού. Συνώνυμο με αυτό είναι το *S. cretica*
7. ***Sideritis euboica***. Τσάι της Εύβοιας ή τσάι απ' το Δέλφι. Αυτοφύεται άφθονο στο βουνό Δίρφυ σε ύψος 1000-1500μ. Επίσης υπάρχει στο Ξεροβούνι Εύβοιας, σε υψόμετρο 1400μ.

Τη σύγχρονη εποχή πολλές έρευνες πραγματοποιούνται με σκοπό τη μελέτη των βοτανικών, φυσικοχημικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων του γένους *Sideritis* (Baden et al., 1991).

1.2 Μορφολογία (botanical aspects)

Τα είδη του *Sideriti* φύονται είτε ως βότανα είτε ως μικροί θάμνοι, ετήσια ή για περισσότερα χρόνια και είναι αρωματικά, λόγω της περιεκτικότητας τους σε αιθέρια έλαια. Τα φύλλα του είναι συνήθως στενά, ολόκληρα ή οδοντωτά. Τα μπουμπούκια του φυτού έχουν σχήμα καμπάνας ενώ τα άνθη του είναι κυρίως κίτρινα, και πιο σπάνια λευκά ή κόκκινα. Έχει τέσσερις στήμονες και οι μπροστινοί δύο είναι επιμηκέστεροι από τους άλλους δύο. Ο στύλος καταλήγει σε δύο άνισα στίγματα και ωοθήκη είναι δίχωρη, ενώ με ψευδή διαφράγματα γίνεται τετράχωρη (Θανασούλια Β., 2008).

Ο *Sideritis* αναπτύσσεται καλύτερα σε μεγάλη ηλιοφάνεια και ξηρές συνθήκες. Φύεται σε βραχώδεις πλαγίες και βοσκοτόπους, σε υψόμετρο από 0 έως και πάνω από 3000 m, σε ελαφρώς αλκαλικό έδαφος ενώ δεν έχει μεγάλες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (Davis, 1982).

Το γένος χαρακτηρίζεται από την έντονη ικανότητα του να υβριδοποιείται μεταξύ των ειδών του. Ως αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού υβριδοποιήσεων, η ταξινόμηση του είδους είναι αρκετά δύσκολη. Η μελέτη συγκεκριμένων

μορφολογικών χαρακτηριστικών αλλά και η ανάλυση κάποιων δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα διτερπένια και τα флаβονοειδή βοηθούν στην επίλυση προβλημάτων κατά την ταξινόμηση των ειδών του *Sideritis* (Barber et al., 2002).



Εικόνα 1-2. *Sideritis scardica*: φύλλα και άνθη

1.3 Παραδοσιακές χρήσεις

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του *Sideritis* αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον Διοσκουρίδη κατά τον 1^ο αιώνα στο βιβλίο του «Περί Ύλης Ιατρικής» (*De Materia Medica*), όπου το γένος *Sideritis* ταξινομείται σε τρία είδη, «Περί Σιδηρίτιδος, Περί ετέρας Σιδηρίτιδος (*Andere Sideritis*) και Περί απόμακρης Σιδηρίτιδος (*Weitere Sideritis*)».

Από την αρχαιότητα τα είδη του *Sideritis* χρησιμοποιούνται ως τσάι, ως αρωματικές ουσίες, για θεραπευτική χρήση ακόμα ως καλλωπιστικό φυτό κήπου. Στην Ισπανία τα υπέργεια τμήματα του φυτού καταναλώνονται για τις γαστροπροστατευτικές ιδιότητες τους, ενώ το αφέψημα από τα φύλλα για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καθώς και κατά των ρευματισμών. Τα υδατικά εκχυλίσματα του *Sideritis* έχουν εξωτερική χρήση για απολύμανση καθώς και για την επούλωση πληγών και εγκαυμάτων. Στην Ελλάδα και την Τουρκία το υπέργειο τμήμα των φυτών αυτών χρησιμοποιείται ευρέως στην προετοιμασία βοτανικών θεραπειών και ως παραδοσιακό τσάι. Το αφέψημα αυτό, το οποίο συχνά σερβίρεται με μέλι ή λεμόνι, είναι διαδεδομένο λόγω του ευχάριστου αρώματος του, της ιδιαίτερης γεύσης του και του κιτρινωπού χρώματός του. Το τσάι του γένους *Sideritis* είναι ευρέως διαδεδομένο λόγω της χρήσης του κατά των γαστρεντερικών διαταραχών, όπως ο στομαχόπονος, η δυσπεψία, το φούσκωμα, την ανακούφιση από τα συμπτώματα

του κοινού κρυολογήματος συμπεριλαμβανομένου του πυρετού, της γρίπης, του πονόλαιμου, της βρογχίτιδας καθώς και ως τονωτική και διουρητική θεραπεία.

Διαφορετικές χρήσεις των ειδών του *Sideritis* εντοπίζονται λόγω της διαφορετικής γεωγραφικής τους προέλευσης, ωστόσο όλες οι χρήσεις του βασίζονται στις ιδιότητες του ως φυτό (González-Burgos et al., 2011; Nunez et al., 1990).

1.4 Χημική Σύσταση

Διάφορα χημικά συστατικά έχουν ταυτοποιηθεί στο γένος *Sideritis* όπως τερπένια, φλαβονοειδή, αιθέρια έλαια, ιριδοειδή, κουμαρίνες, λιγνάνες και στερόλες. Τα διτερπένια, τα φλαβονοειδή και τα αιθέρια έλαια απαντώνται σχεδόν σε όλα τα είδη του *Sideritis* και είναι υπεύθυνα για τις φαρμακολογικές ιδιότητες του.

1.4.1 Τερπένια

Τα τερπένια είναι η μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, με πάνω από 20.000 μέλη. Αποτελούν πολυμερή του ισοπρενίου (C₅) και ανάλογα με τις μονάδες ισοπρενίου της κύριας αλυσίδας τους κατατάσσονται σε μονοτερπένια (έχουν 10 άτομα άνθρακα), σεσκιτερπένια (15 άτομα άνθρακα), διτερπένια (20 άτομα άνθρακα) και τριτερπένια (30 άτομα άνθρακα). Αντιπρόσωποι των δύο πρώτων κατηγοριών, όπως το λιμονένιο έχουν ανιχνευθεί ως πτητικά αέρια που εκλύουν τα φυτά μπροστά στο κίνδυνο βοράς από φυτοφάγα ζώα. Γνωστά τριτερπενοειδή αποτελούν η αμυρίνη (α, b-amyrin) και η λουπεόλη (lupeol) (D'Auria et al., 2005; González-Burgos et al., 2011).

Τα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και τριτερπένια δεν απαντώνται συχνά στο γένος *Sideritis*, αντίθετα με τα διτερπένια. Τουλάχιστον 160 διαφορετικά διτερπένια έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί από τα επίγεια μέρη του φυτού. Για πρώτη φορά διτερπένια εντοπίστηκαν στο είδος *Sideritis italica*, ενώ μέχρι και σήμερα πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία διτερπενοειδών, ειδικά στα είδη του σιδερίτη που ευδοκίμουν στην Ιβηρική χερσόνησο και τις Κανάριες νήσους.

Τα είδη του γένους *Sideritis* που συναντώνται στην ανατολική και κεντρική Μεσογειακή περιοχή (Ελλάδα, Τουρκία, Ιταλία) περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά καουρένια, δηλαδή τετράκυκλα διτερπένια. Αντιθέτως τα είδη της δυτικής Μεσογειακής περιοχής παρουσιάζουν διτερπένια διαφορετικής μορφολογίας όπως labdane (δίκυκλα διτερπένια), pimarane και rosane (τρίκυκλα διτερπένια), beyerane (τετράκυκλα διτερπένια) (Piozzi et al., 2006).

1.4.2 Φλαβονοειδή

Πρόκειται για φαινολικά παράγωγα όπου περιέχουν 15 άτομα άνθρακα σε διάταξη με δυο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Οφείλουν το όνομα τους στο κίτρινο χρώμα (flavus = κίτρινος) μερικών ενώσεων της ομάδας και πολλά απ' αυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα των καρπών και των ανθέων των φυτών. Ταξινομούνται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης των ατόμων του άνθρακα της γέφυρας, ενώ ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Τα περισσότερα φλαβονοειδή που βρίσκονται στη φύση συναντώνται κυρίως με τη μορφή των γλυκοζιτών (Γαλάτης και συνεργάτες, 2003; Erdman et al., 2007).

Το γένος *Sideritis* είναι πλούσια πηγή φλαβονοειδών. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί η σύνδεση που έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στο είδος φλαβονοειδών και τη γεωγραφική προέλευση του *Sideritis*. Για παράδειγμα οι 5,6,7-τρι οξυγονωμένες φλαβόνες είναι επικρατέστερες στα είδη που ευδοκούν στη Μακαρονησία ενώ η παρουσία 5,6,7,8-τετρα οξυγονωμένων φλαβονών σε υψηλότερα επίπεδα αντιστοιχεί σε είδη της Μεσογείου (Balasundram et al., 2006).

1.4.3 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι βιολογικώς δραστικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, μίγματα πτητικών ουσιών, με ελαιώδη σύσταση και χαρακτηριστική οσμή. Δεν πρέπει να συγχέονται με τα «λίπη και έλαια». Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εξαερώνονται και προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή. Τα συστατικά τους διακρίνονται σε τερπενικούς και μη τερπενικούς υδρογονάνθρακες. Έχουν πληθώρα βιολογικών δράσεων, όπως αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιϊική – αντιερπητική και αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων. Η παραλαβή τους από τα φυτά γίνεται συνήθως με απόσταξη, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι όπως εκχύλιση (με διαλύτες, με μικροκύματα (MAE) ή υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE)), παραλαβή με έκθλιψη, μηχανική παραλαβή κλπ. Η επιλογή της τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος του φυτού, την επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος και τον διαθέσιμο προϋπολογισμό (Μαλούπα Ε. και συνεργάτες, 2013).

Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου διαφόρων ειδών του γένους *Sideritis*, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζουν κάποιες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των ειδών. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται σε κλιματικούς και γενετικούς παράγοντες, στο χημειότυπο του φυτού ή ακόμα και στα θρεπτικά συστατικά του χώματος που ευδοκίμησε το φυτό.

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων πολλών ειδών *Sideritis* έχει αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία (GC) και αέρια χρωματογραφία μάζας (GC-MS). Από τα

αποτελέσματα των τεχνικών αυτών είναι φανερό ότι το είδος *Sideritis Lamiaceae* έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη που είναι φτωχά σε αιθέρια έλαια. Τα διάφορα είδη του *Sideritis* έχουν ταξινομηθεί σε έξι ομάδες, βάση των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων που περιέχουν. Οι ομάδες αυτές είναι οι εξής: «μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες», «οξυγονωμένα μονοτερπένια», «σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες», «οξυγονωμένα σεσκιτερπένια», «διτερπένια» και «υπόλοιπα».

Επιπλέον έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της απόδοσης λαδιού και των βασικών περιεχομένων του αιθέριου ελαίου. Δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η απόδοση τόσο υψηλότερο το περιεχόμενο σε μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, ενώ χαμηλότερη απόδοση υποδεικνύει υψηλότερη περιεκτικότητα σε σεσκιτερπενικά συστατικά. Διτερπένια απαντώνται σε αιθέρια έλαια οποιασδήποτε απόδοσης (Kirimer et al., 2004).

Τα αιθέρια έλαια ειδών του γένους *Sideritis* που ευδοκιμούν στην Ελλάδα έχουν ως βασικό συστατικό μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες. Οι αποδόσεις ελαίου του είδους *S. clandestina ssp.* ανέρχονται σε 0,09% και για το *S. raeseri ssp.* σε 0,12%, επί ξηρής μάζας, ενώ το χρώμα του ελαίου είναι ανοιχτό κίτρινο. Στα αιθέρια έλαια των ειδών *S. clandestina ssp.* (συλλογή στο όρος Ταΰγετος) και *S. raeseri spp.* (συλλογή στο όρος Οίτη) εντοπίστηκαν β-copaene, α-pinene, β-pinene, δ-cadinene, limonene και β-caryophyllene σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Koedam, 1986).

1.4.4 Αλλά Συστατικά

Κάποια ακόμα συστατικά, η παρουσία των οποίων έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα είδη του *Sideritis*, είναι τα λιπαρά οξέα και οι γλυκοζίτες.

Λιπαρά οξέα βρέθηκαν σε τουλάχιστον δεκαπέντε είδη Σιδερίτη από την Τουρκία, με κύριο οξύ το λινολεϊκό ακολουθούμενο από το ολεϊκό οξύ. Φαινυλοπροπανοειδείς γλυκοζίτες έχουν απομονωθεί από τα εναέρια μέρη διαφόρων ειδών σιδερίτη. Επιπλέον έχει βρεθεί και απομονωθεί ένας ιριδοειδής γλυκοζίτης από τα εναέρια μέρη του *Sideritis lanata*.

Άλλα συστατικά, η παρουσία των οποίων έχει επιβεβαιωθεί σε είδη που ευδοκιμούν στη Μακαρονησία είναι μια κουμαρίνη που ονομάζεται σιδερίνη και μια λιγνάνη, η σεσαμίνη (González-Burgos et al., 2011).

1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες

1.5.1 Αντιφλεγμονώδη δράση

Τα είδη του γένους *Sideritis* είναι πηγή πλούσια σε αντιφλεγμονώδη συστατικά. Πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν τη χρήση του ως γιατροσόφι λόγω των θεραπευτικών του ενδείξεων.

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες με σκοπό να εξεταστούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του *Sideritis*. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με έρευνα διαφόρων εκχυλισμάτων των ειδών *Sideritis canariensis* και *Sideritis candicans*, επιβεβαιώθηκε αξιοσημείωτη αντιφλεγμονώδης δράση ενάντια της καρραγενάνης, που επάγεται σε οίδημα ποδιού ποντικίου, και της TPA (12-O-tetradecanoylphorbol acetate) που επάγεται σε οίδημα στο αυτί του ποντικίου έπειτα από τοπική αλλά και από στόματος χρήση των εκχυλισμάτων.

Σύμφωνα με άλλη μελέτη διαφορετικών εκχυλισμάτων του *Sideritis javalambrensis* παρατηρήθηκε ότι τα μεθανολικά και τα εκχυλίσματα εξανίου εμφανίζουν την υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση ενάντια της ανοσοενισχυτικής παραγωγής καρραγενάνης σε χρόνιο στάδιο της φλεγμονής. Καμία δράση δεν παρατηρήθηκε στο οξύ στάδιο της φλεγμονής (González-Burgos et al., 2011).

1.5.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των διάφορων ειδών του γένους *Sideritis* έχουν χρησιμοποιηθεί οι μέθοδοι DPPH, Co(II) EDTA, FRAP, κ.α..

Έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα μεθανολικών εκχυλισμάτων 27 διαφορετικών ειδών *Sideritis* μετρώντας το δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) που επάγεται από την υπεροξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα βελτιώνεται με αύξηση του ποσοστού μεθανόλης στο διάλυμα σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) έδειξε ότι όσο υψηλότερο είναι το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά τόσο μεγαλύτερη και η αντιοξειδωτική ικανότητα.

Συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του φαινολικού περιεχομένου έχει βρεθεί και για τα μεθανολικά εκχυλίσματα του *Sideritis ozturkii* και *Sideritis caesarea*. Τα αποτελέσματα με τη μέθοδο DPPH έδειξαν αντιοξειδωτική ικανότητα $41,68 \pm 1,96\%$ και $72,47 \pm 0,73\%$ στα 100 ppm αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο του *S. caesarea* σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή είναι υψηλότερο από αυτό του *S. ozturkii* (Sagdic et al., 2008).

Μια *in vivo* ανάλυση στο τσάι του *Sideritis clandestina*, όπου εγχύσεις του εκχυλίσματος του τσαγιού αυτού δόθηκαν σε άρρωστα ενήλικα ποντίκια για 6 εβδομάδες, έδειξε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα στον μεσεγκέφαλο, ειδική περιοχή του εγκεφάλου. Η μέτρηση έγινε με εφαρμογή της τεχνικής Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (Linardaki et al., 2008).

1.5.3 Αντιμικροβιακή δράση

Αρκετά είδη *Sideritis* έχουν ερευνηθεί για την αντιμικροβιακή και μυκητοκτόνο δράση των αιθέριων ελαίων τους.

Αιθανολικά εκχυλίσματα του *Sideritis leptoclada* και του *Sideritis albiflora* εξετάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους ικανότητα και εμφάνισαν ενεργότητα κατά των Gram-θετικών βακτηρίων. Τα εκχυλίσματα αυτά δεν εμφάνισαν καμία δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων και του μύκητα *Candida albicans* (Sarac and Ugur et al., 2007).

Αντιθέτως τα μεθανολικά εκχυλίσματα και κλάσματα βουτανόλης και χλωροφορμίου του *Sideritis albiflora* και του *Sideritis brevibracteata* εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*).

Σε μια άλλη έρευνα μεθανολικά εκχυλίσματα εναέριων τμημάτων επτά διαφορετικών τουρκικών ενδημικών ειδών, εμφάνισαν μυκητοκτόνο δράση έναντι στελέχους *Candida albicans* ανθεκτικού στην κλοτριμαζόλη (clotrimazole) (González-Burgos et al., 2011).

1.5.4 Αντιελκώδης δράση

Η αντιελκώδης δράση του γένους *Sideritis* είναι γνωστή από παλιά, καθώς αφεψημάτα καταναλώνονταν λόγω των γαστροπροστατευτικών ιδιοτήτων του. Μελέτες έχουν δείξει πως η κατανάλωση αφεψημάτων, από τα εναέρια μέρη του *Sideritis caesareae*, έχει ισχυρή βιολογική δράση ενάντια στο έλκος στομάχου ποντικού (González-Burgos et al., 2011).

1.5.5 Αναλγητική δράση

Σύμφωνα με έρευνες εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα 400 mg/kg, από εναέρια μέρη του φυτού *Sideritis taurica*, παρουσίασε αναλγητική δράση παρόμοια με εκείνη που

παράγεται από επίπεδο δόσης 400 mg/kg ακετυλοσαλικυλικού οξέος (acetylsalicylic acid, ASA) σε 45 και 60 λεπτά (González-Burgos et al., 2011).

1.5.6 Άλλες δράσεις

Μεθανολικό εκχύλισμα από τα εναέρια μέρη του *S. libanotica ssp. linearis* παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι τριών κυτταρικών σειρών, κύτταρα Vero (νεφρού Αφρικανικού πράσινου πιθήκου), C6 κύτταρα (όγκου στον εγκέφαλο αρουραίου) και κύτταρα HeLa (καρκίνωμα μήτρας ανθρώπου) Παρατηρήθηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυτταρικών σειρών σε ποσοστό ανάλογο της δόση που δόθηκε (Bruno et al., 2002).

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η κυτταροτοξική δράση του αιθέριου ελαίου του είδους *Sideritis perfoliata* έναντι καρκινικών σειρών κυττάρων ACHN (αδενοκαρκίνωμα νεφρικών κυττάρων) και C32 (αμελανωτικό μελάνωμα) (Loizzo et al., 2007).

Επιπλέον διάφορα είδη του γένους *Sideritis* βρέθηκε ότι εμφανίζουν δράση έναντι του ιού HIV, η οποία οφείλεται σε διτερπένια τύπου λινεαρόλης.

Αποτελέσματα άλλης έρευνας έδειξαν ότι υδατικά εκχυλίσματα των ειδών *Sideritis euboica* και *Sideritis clandestina* καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων στο στήθος. Αυτό συμβαίνει καθώς τα υδατικά εκχυλίσματα του *Sideritis* λειτουργούν ως εκλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (SERM) (Aslan et al. 2006).

2 Εκχύλιση δραστικών συστατικών

2.1 Τεχνικές εκχύλισης

Εκχύλιση ονομάζεται η διεργασία διαχωρισμού ενός ή περισσότερων συστατικών ενός μίγματος με κατεργασία του με κατάλληλο διαλύτη. Κατά την εκχύλιση στερεών ένα διαλυτό συστατικό απομακρύνεται από κάποιο αδρανές στερεό με την επίδραση κατάλληλου διαλύτη.

Ο φυτικός ιστός αποτελείται από κύτταρα που περιβάλλονται από κυτταρικά τοιχώματα. Ο μηχανισμός της εκχύλισης περιλαμβάνει δύο τύπους φυσικών φαινομένων: τη διάχυση μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων και την έκλυση των περιεχομένων των κυττάρων μόλις σπάσουν τα τοιχώματά τους.

Τα δείγματα, πριν από την εκχύλιση συνήθως περνούν κάποια στάδια προκατεργασίας. Κάποια από αυτά τα στάδια είναι η άλεση, η λείανση, η διαβροχή η ομογενοποίηση ή η ξήρανση. Η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους είτε υπό κατάψυξη είτε παρουσία αέρα, και αυξάνει την απόδοση ανά μονάδα ξηρού βάρους της πρώτης ύλης και συνήθως διευκολύνει την επακόλουθη επεξεργασία (Routray et al., 2012).

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση φυτικών συστατικών διακρίνονται σε συμβατικές και μη συμβατικές. Αρκετές φορές συνίσταται ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων, με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης και της ποιότητας τους εκχυλίσματος.

2.2 Παράμετροι Εκχύλισης

Είναι ευρέως γνωστό πως η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους, όπως ο τύπος του διαλύτη και η πολικότητα του, ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης, η αναλογία του δείγματος προς το διαλύτη, καθώς και η χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

Ο κυριότερος παράγοντας είναι ο διαλύτης. Για την σωστή επιλογή του εξετάζονται διάφοροι παράγοντες όπως η πολικότητα, η δραστηριότητα, αφού ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με το εκχύλισμα αλλά ούτε και να διασπάται εύκολα, το ιξώδες, το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό καθώς και το κόστος του. Γενικά, επιλέγονται διαλύτες με υψηλή πολικότητα, καθώς είναι πιο αποτελεσματικοί σε σχέση με τους μη πολικούς.

Όσον αφορά τον χρόνο και τη θερμοκρασία εκχύλισης η αύξηση των παραμέτρων αυτών συνήθως επιδρά θετικά στην απόδοση της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας συνδέεται με αύξηση στη διαλυτότητα και στην ταχύτητα μεταφοράς μάζας αλλά και σε μείωση του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης. Η αύξηση του λόγου διαλύτη προς στερεό και η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την απόδοση της εκχύλισης.

Η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τη χημική σύσταση του φυτικού δείγματος, την πολικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος. Καθώς τα φυτά περιέχουν από απλά φαινολικά (π.χ. φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες) έως φαινολικά υψηλού βαθμού πολυμερισμού (π.χ. τανίνες) σε διάφορες ποσότητες, δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης που να χρησιμοποιείται ευρέως σε όλα τα φυτά. (Dai et al., 2010).

2.3 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Στις συμβατικές διεργασίες συμπεριλαμβάνονται η έγχυση, η διαβροχή, η έκπλυση, και η μέθοδος Soxhlet. Οι περισσότερες συμβατικές τεχνικές στηρίζονται στην εκχύλιση με χρήση διαλύτη και στην εφαρμογή θέρμανσης ή και ανάδευσης. Η απόδοση τους στηρίζεται κυρίως στην επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, βάση της πολικότητας των επιθυμητών συστατικών (Devgun et al., 2012).

Η συμβατική εκχύλιση είναι ίσως η ευκολότερη και απλούστερη χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης. Είναι μία διεργασία σχεδιασμένη να διαχωρίζει διαλυτές ενώσεις από ένα στερεό δείγμα. Βασίζεται στη χαλάρωση και το σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος του φυτού ώστε να απελευθερωθούν τα διαλυτά φυτοχημικά συστατικά του και λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη διόγκωση των στερεών σωματιδίων του φυτού, λόγω της ρόφησης του διαλύτη από τη στερεή φάση. Η ρόφηση οφείλεται σε ωσμωτικές δυνάμεις, τριχοειδή φαινόμενα και στη διάλυση των ιόντων στα κύτταρα. Κατά το δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται διάχυση τόσο στο εσωτερικό της στερεής φάσης, όσο και στα εξωτερικά στρώματα των στερεών σωματιδίων. Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, το μείγμα συμπιέζεται ή διηθείται.

Οι συνθήκες όπως ο χρόνος της εκχύλισης και ο λόγος υγρού προς στερεό παίζουν σημαντικό ρόλο στη μέθοδο αυτή. Επιπλέον η μεταβολή της θερμοκρασίας, η ανάδευση και η κατάλληλη επιλογή των διαλυτών μπορούν να ενισχύσουν τη διαδικασία εκχύλισης και να μειώσουν τον απαιτούμενο όγκο διαλύτη (Azwanida, 2015; Handa et al., 2008).

Παρόλα αυτά, οι κλασσικές μέθοδοι ανάλυσης παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως η μεγάλη διάρκεια, η μικρή εκλεκτικότητα της εκχύλισης, η αποσύνθεση των θερμοευαίσθητων συστατικών ενώ παράλληλα απαιτούν τη χρήση διαλυτών υψηλής καθαρότητας. Για τον λόγο αυτό νέες μέθοδοι εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί, ώστε να ξεπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί, και έχουν καθιερωθεί ως πρωτοπόρες ή μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης (Gligor et al., 2019).

2.4 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Οι μη συμβατικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται λόγω της μειωμένης χρήσης οργανικών χημικών ουσιών, του μειωμένου χρόνου εκχύλισης, της υψηλότερης εκλεκτικότητας σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους και της καλύτερης απόδοσης. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι υπέρηχοι, τα μικροκύματα, το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (EYE), η ωμική θέρμανση και η χρήση υπερκρίσιμων διαλυμάτων. Πολλές από τις τεχνικές αυτές χαρακτηρίζονται ως «πράσινες τεχνικές» καθώς πληρούν τις προδιαγραφές του U.S. Environmental Protection Agency (Azmir et al., 2013; Gligor et al., 2019).

2.4.1 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

Βασισμένη σε ακόμα αυστηρότερους νόμους και περιορισμούς, όπως ο Ευρωπαϊκός κανονισμός για την ασφάλεια των τροφίμων (άρθρα 5 και 10), όσον αφορά την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών των φυτών σε βιομηχανικό επίπεδο, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση γίνεται όλο και πιο δημοφιλής σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.

2.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών αποτελούνται από μια μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών περίπλοκης δομής όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η πηκτίνη, η λιγνίνη ακόμα και πρωτεΐνες. Η δομή τους αυτή εξασφαλίζει στο κύτταρο σταθερότητα καθώς και αντίσταση στην εκχύλιση των ενδοκυτταρικών συστατικών. Συνεπώς, ένζυμα με εξειδικευμένες υδρολυτικές ικανότητες χρησιμοποιούνται κατά το σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος, με στόχο την απόκτηση πρόσβασης στα βιοδραστικά συστατικά που βρίσκονται εντός του κυττάρου ή ακόμα και σε αυτά που είναι δεσμευμένα στο κυτταρικό τοίχωμα (Gligor et al., 2019).

Ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί στην προκατεργασία του δείγματος τους φυτού προτού αυτό εκχυλιστεί συμβατικά. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα βασίζεται στην εγγενή ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν αντιδράσεις με εξαιρετική εξειδίκευση και εκλεκτικότητα και να λειτουργούν υπό ήπιες συνθήκες σε υδατικά διαλύματα. Κάτι τέτοιο συμβαίνει καθώς τα ένζυμα υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα, αυξάνοντας την διαπερατότητα του και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης (Puri et al., 2012).

Τα ένζυμα επιταχύνουν τη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν χωρίς να καταναλώνονται τα ίδια. Διαθέτουν μια περιοχή σαν «τσέπη» στο μόριο τους, η οποία καλείται ενεργό κέντρο και είναι υπεύθυνη για την καταλυτική τους δράση. Το υπόστρωμα πρέπει να συνδεθεί απευθείας στο ενεργό κέντρο. Εάν εμποδιστεί η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, η ενεργότητα του ενζύμου μπορεί να επηρεαστεί. Επομένως η δομή του ενζύμου είναι αυτή που επιτρέπει την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Η δομή και η ενεργότητα του ενζύμου επηρεάζονται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και η ιοντική ισχύς. Τα ένζυμα καταλύουν συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ενώ πολύ μικρές ποσότητες του ενζύμου καταλύουν μεγάλες ποσότητες του υποστρώματος στο τελικό προϊόν.

Όταν το ένζυμο προσδένεται στο υπόστρωμα, το σχήμα του μορίου του ενζύμου αλλάζει με στόχο να λάβει το βέλτιστο σχήμα για την συγκεκριμένη αντίδραση. Αυτή η αλλαγή στη μορφή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα να ασκείται πίεση στο υπόστρωμα, καταπονώντας και παραμορφώνοντας το, προκαλώντας θραύση των δεσμών του υποστρώματος και προωθώντας με αυτό τον τρόπο την αντίδραση.

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι υψηλή η προσθήκη ενζύμου μπορεί να αυξήσει την απόδοση της αντίδρασης, μέχρι μια οριακή τιμή συγκέντρωσης υποστρώματος. Η ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίζεται σε όρους moles αντιδρώντος υποστρώματος ή moles παραγόμενου προϊόντος στη μονάδα του χρόνου προς το βάρος της πρωτεΐνης. Η δυνητική χρήση ενζύμων βασίζεται κυρίως στην υδρολυτική τους δράση, π.χ. η υδρόλυση συστατικών υψηλού μοριακού βάρους όπως το άμυλο πηκτίνης, οι πρωτεΐνες και η κυτταρίνη. Σχεδόν το 60% των πρωτεασών βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία υγιεινών τροφίμων, γαλακτοκομικών, φαρμακευτικών προϊόντων κ.α. (Sowbhagya et al., 2010).

Ένζυμα μπορούν να απομονωθούν από βακτήρια, μύκητες, όργανα ζώων ή εκχυλίσματα φρούτων/ λαχανικών. Για πιο αποτελεσματική χρήση των ενζύμων κατά τη διεργασία της εκχύλισης πρέπει να γίνει αντιληπτός ο καταλυτικός τρόπος δράσης τους, οι βέλτιστες συνθήκες αλλά και η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου για κάθε φυτό. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο. Η αρχή της συγκεκριμένης διεργασίας βασίζεται τόσο στη δράση των ενζύμων, όσο και στον τρόπο με τον οποίο οι βιοδραστικές ουσίες βρίσκονται συνδεδεμένες στα φυτά. Ένζυμα χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση συστατικών από φυτά καθώς αυξάνουν την συγκέντρωση των φλαβονοειδών στο εκχύλισμα, μειώνοντας ταυτόχρονα τη χρήση διαλυτών και θερμότητας (Baby et al., 2013).

2.4.1.2 Παράμετροι εκχύλισης

Σε κάθε περίπτωση ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης πρέπει να επιλέγονται κατάλληλα και να σταθεροποιούνται οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα, με στόχο τη βελτιστοποίηση της απόδοσής της. Οι παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν είναι οι εξής:

- είδος ενζύμου
- συγκέντρωση ενζύμου
- χρόνος επώασης
- θερμοκρασία επώασης
- pH συστήματος
- αναλογία ενζύμου - υποστρώματος

Βάση της ιδιότητας των ενζύμων να καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις, κάθε ένζυμο δρα σε συγκεκριμένο υπόστρωμα. Επομένως, ανάλογα με τη δράση τους, κατατάσσονται στους ακόλουθους τύπους (Cheng et al., 2015).

2.4.1.2.1 Πηκτίνη και πηκτινάσες

Η πηκτίνη είναι ένα πολυμερές μονάδων α-D-γαλακτουρονικού οξέος και L-ραμνόζης συνδεδεμένων μεταξύ τους με α-1,4 ή 1,2 πεπτιδικούς δεσμούς. Όταν συνδεθεί με την κυτταρίνη, η πηκτίνη προκαλεί ακαμψία στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα ή πηκτινάσες ήταν τα πρώτα διαθέσιμα εμπορικά ένζυμα για την παραγωγή κρασιού και χυμού φρούτων, παρότι η δομή του κυτταρικού τοιχώματος έγινε γνωστή αργότερα. Διαχωρίζονται σε διάφορες ομάδες όπως τις πρωτοπηκτινάσες, οι οποίες είναι φυσικά απαντώμενες και υπεύθυνες για την διαλυτοποίηση των κατά τα άλλα αδιάλυτων πρωτοπηκτινών από τα άγουρα φρούτα, τις εστεράσες που υποβιβάζουν ενώσεις απομακρύνοντας μέθοξυ-εστέρες και τις υδρολάσες οι οποίες καταλύουν το σπάσιμο των γλυκοζιτικών δεσμών. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποδοτικά κατά την εκχύλιση πολυφαινολών λόγω της απελευθέρωσης ανθοκυανιδίων από τους γλυκοζίτες τους. Τα περισσότερα πηκτινολυτικά μίγματα περιέχουν όλες τις ομάδες που αναφέρθηκαν νωρίτερα καθώς και κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες, έτσι ώστε να αποκτήσουν μια ολοκληρωμένη συνεργιστική συμπεριφορά (Gligor et al., 2019).

Οι Fernández et al. (2015) παρατήρησαν ότι η χρήση πηκτινάσης έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη χρήση ενζυμικού μίγματος κυτταρινάσης, ταννάσης και πηκτινάσης κατά την εκχύλιση πρωτοανθοκυανιδίων από σπόρους σταφυλιού. Το ίδιο αποτέλεσμα συνεπάγεται κατά την μελέτη του εκχυλιζόμενου φαινολικού περιεχομένου από φλούδα μήλου (Pinelo et al., 2008). Σύμφωνα με τους Benucci et al. (2017) μια πηκτίνη, η πολυγαλακτουρονάση, αποπολυμερίζει υψηλά ποσοστά ανθοκυανίνων, ολιγομερών και πολυμερών φλαβονολών από αποξηραμένα δείγματα φλούδας σταφυλιού, υδρολύοντας τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ του γαλακτουρονικού οξέος το οποίο περιέχεται στην πηκτίνη.

2.4.1.2.2 Κυτταρίνη και κυτταρινάσες

Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές μονάδων γλυκόζης που ενώνονται με β-1,4 δεσμούς, με δύο κρυσταλλικές μορφές: τύπος I και τύπος II, με τον πρώτο να βρίσκεται μόνο στα φρούτα και τα λαχανικά, ως μικροϊνίδια. Ενισχύει τη δομή και την προστασία του κυττάρου, καθώς συνδέεται με άλλα βιοπολυμερή όπως η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη. Οι κυτταρινάσες καταλύουν το σπάσιμο της κυτταρίνης, ενώ χαρακτηρίζονται από την εξειδικευμένη δράση και δομή τους. Λόγω των μεγάλων διαφορών μεταξύ τους, ταξινομούνται με βάση τη κρυσταλλική δομή τους, τη δράση τους ή απλώς βάση της ικανότητας τους να σπούν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς εσωτερικά ή εξωτερικά. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει γίνει πλήρως γνωστός, μια κοινά αποδεκτή θεωρία αποδίδει τη δράση τους στη συνεργιστική δράση τριών διαφορετικών ενζύμων: τις ενδογλουκανάσες, οι οποίες υδρολύουν τους ενδοκυτταρικούς β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, αφήνοντας νέα άκρα διαθέσιμα προς υδρόλυση, τις εξωγλουκανάσες οι οποίες απελευθερώνουν

κελοβιόζη ή γλυκόζη και τις β-γλυκοζυδάσες που διασπούν την κελοβιόζη σε γλυκόζη (Gligor et al., 2019).

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Renouard et al. (2010), έδειξε ότι η κυτταρινάση είναι πιο αποδοτική κατά την εκχύλιση secoisolariciresinol από κέλυφος λιναριού, σε σχέση με τη β-γλυκοζιδάση. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην υψηλότερη υδρολυτική ικανότητα της κυτταρίνης καθώς και στην εξειδίκευση του υποστρώματος για τα κολλώδη συστατικά του λιναριού. Οι Nagendra et al. (2013) παρατήρησαν ότι η κυτταρίνη αποδομεί καλύτερα το κυτταρικό τοίχωμα του ginger κατά την εκχύλιση ολεοσίνης και 6-τζιντζερολης σε σχέση με την χρήση κάποιας α-αμυλάσης, πηκτινάσης ή πρωτεάσης. Επιπλέον αύξηση παρατηρήθηκε στην απόδοση των ανθοκυανίνων κατά την υποβοηθούμενη εκχύλιση με κυτταρινάση σε δείγματα βατόμουρων από τους Swer et al. (2016).

2.4.1.2.3 Ημικυτταρίνη και ημικυτταρινάσες

Αποτελούνται από ποικιλία γραμμικών ετερογενών πολυμερών υδατανθράκων, ομόλογων της κυτταρίνης όπως οι ξυλογλουκάνες και οι μανάνες. Η ημικυτταρίνη είναι στενά συνδεδεμένη με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης και τη λιγνίνη, σχηματίζοντας περίπλοκες δομικές μονάδες. Μεγάλη ποικιλία ενζυμικής δράσης απαιτείται για τη διάλυση όλων των ειδών ημικυτταρίνης. Οι ημικυτταρινάσες παράγονται ευρέως στη φύση, από είδη μυκήτων όπως ο *Trichoderma* ή ο *Aspergillus*, όπως επίσης και από το πεπτικό σύστημα των ζώων. Οι ημικυτταρινάσες περιέχουν υδρολάσες, εστεράσες, ξυλανάσες κ.α.. Συνήθως οι ημικυτταρινάσες προτιμώνται ως μέρος ενζυμικών μιγμάτων, μαζί με τις κυτταρινάσες, καθώς ενεργοποιούν την ολοκληρωμένη λύση του κυτταρικού τοιχώματος ενώ παράλληλα συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κόστους (Gligor et al., 2019).

2.4.1.2.4 Ταννάσες

Οι ταννάσες καταλύουν τον μετασχηματισμό των ταννινών και των εστέρων του γαλλικού οξέος σε γαλλικό οξύ και γλυκόζη. Σύμφωνα με τους Chamorro et al. (2012) και Teixeira et al. (2013) οι ταννάσες σε συνδιασμό με πηκτινολυτικά και κυτταρολυτικά ένζυμα αυξάνουν το επίπεδο των ολικών φαινολικών συστατικών που απομονώνονται από σπόρους σταφυλιού, από μήλα και από φοινικέλαιο, λόγω της συνεργιστικής τους δράσης.

2.4.1.2.5 Λιγνίνη και λιγνινάσες

Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από απλές φαινολικές αλκοόλες όπως η μονολιγνόλη, η σιναπλική αλκοόλη και p-κουμαρλική αλκοόλη. Προσδίδει ακαμψία και σταθερότητα στα κυτταρικά τοιχώματα, ενώ αυξάνει τη σταθερότητα των φυτών και των φρούτων. Οι λιγνινάσες διαφέρουν από τα υπόλοιπα ένζυμα που αναφέρθηκαν καθώς ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην διαδικασία της οξειδωσης και όχι στην υδρόλυση. Παράδειγμα τέτοιων ενζύμων είναι οι φαινολικές οξειδάσες, οι λακκάσες και οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης. Παρότι η διαδικασία υποβάθμισης που καταλύεται από αυτή την ενζυμική κλάση, μελετήθηκε πρόσφατα, απαιτούνται συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους τα οποία μεταβάλλουν τη δομή της λιγνίνης. Αυτός είναι και ο λόγος που οι λιγνινάσες χρησιμοποιούνται σπάνια στη βιομηχανία τροφίμων σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα (Gligor et al., 2019).

2.4.1.2.6 Μίγμα ενζύμων

Τα ενζυμικά μίγματα επηρεάζουν σημαντικά τις υδρολυτικές ικανότητες λόγω της σύνθεσης τους. Για να εξασφαλιστεί το καθολικό σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων απαιτούνται ένζυμα με συμπληρωματικές ιδιότητες. Για παράδειγμα ερευνήθηκε από τους Honsi et al. (2013), η χρήση ημικυτταρινασών και κυτταρινασών, η οποία προσφέρει καλύτερη πρόσβαση στην κυτταρίνη καταστρέφοντας το φυσικό εμπόδιο της ημικυτταρίνης και αυξάνοντας το εκχυλιζόμενο έλαιο από φύλλα θυμαριού. Από την άλλη η χρήση του ίδιου συνδυασμού ενζύμων δεν έδειξε βελτίωση στην εκχύλιση ελαίου από δείγματα δενδρολίβανου, κάτι που οφείλεται πιθανώς στη διαφορά της δομής των φυτών. Για δείγματα μαύρου τσαγιού, οι Chandini et al. παρατήρησαν ότι η πηκτινάση ενεργοποιεί πλήρως την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος ενώ η τανάση εξασφαλίζει αύξηση στα εκχυλιζόμενα απλά πολυφαινολικά συστατικά (Gligor et al., 2019).

Ο χρόνος εκχύλισης συνδέεται άμεσα με την συγκέντρωση του ενζύμου καθώς ο πρώτος μπορεί να μειωθεί σχεδόν στο μισό όταν η συγκέντρωση διπλασιαστεί. Όμως ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να αποτελέσει έναν παρεμποδιστικό παράγοντα καθώς η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης συχνά προκαλεί αποσύνθεση των βιοδραστικών συστατικών λόγω της παρατεταμένης έκθεσης σε υψηλές πιέσεις ή θερμοκρασίες. Η έκθεση των ενζύμων για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 3 ωρών και σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του 5% σε υδατικά διαλύματα έχουν αρνητικό αποτέλεσμα στο εκχυλιζόμενο προϊόν. (Gligor et al., 2019).

Η συγκέντρωση του ενζύμου παίζει καθοριστικό ρόλο στην απόδοση της εκχύλισης, καθώς η υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου συνήθως δεν είναι επιθυμητή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μη αποδοτική, ανταγωνιστική προσρόφηση των συστατικών του ενζύμου από το υπόστρωμα πολυσακχαρίτη.

Όταν χρησιμοποιείται υψηλότερη συγκέντρωση του ενζύμου από την επιθυμητή παρεμποδίζεται η πρόσβαση του ενζύμου σε θέσεις που καταλύουν την υδρόλυση, λόγω της μη αποδοτικής προσρόφησης. Το γεγονός αυτό επηρεάζει αρνητικά τη διάσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. (Karasakalidis et al., 2009).

Η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος οδηγεί συνήθως σε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης. Από ένα σημείο και πέρα όμως, περισσότερα μόρια υποστρώματος δεν οδηγούν σε μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης. Αυτό οφείλεται στην πλήρη κάλυψη, από το υπόστρωμα, του ενεργού κέντρου των διαθέσιμων μορίων του ενζύμου. Επομένως περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, δεν έχει κάποια θετική επίδραση στην αντίδραση, αντ' αυτού μπορεί να λειτουργήσει παρεμποδιστικά. Είναι αναγκαίο επομένως να χρησιμοποιηθεί μια βέλτιστη αναλογία συγκεντρώσεων ενζύμου και υποστρώματος έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση της εκχύλισης.

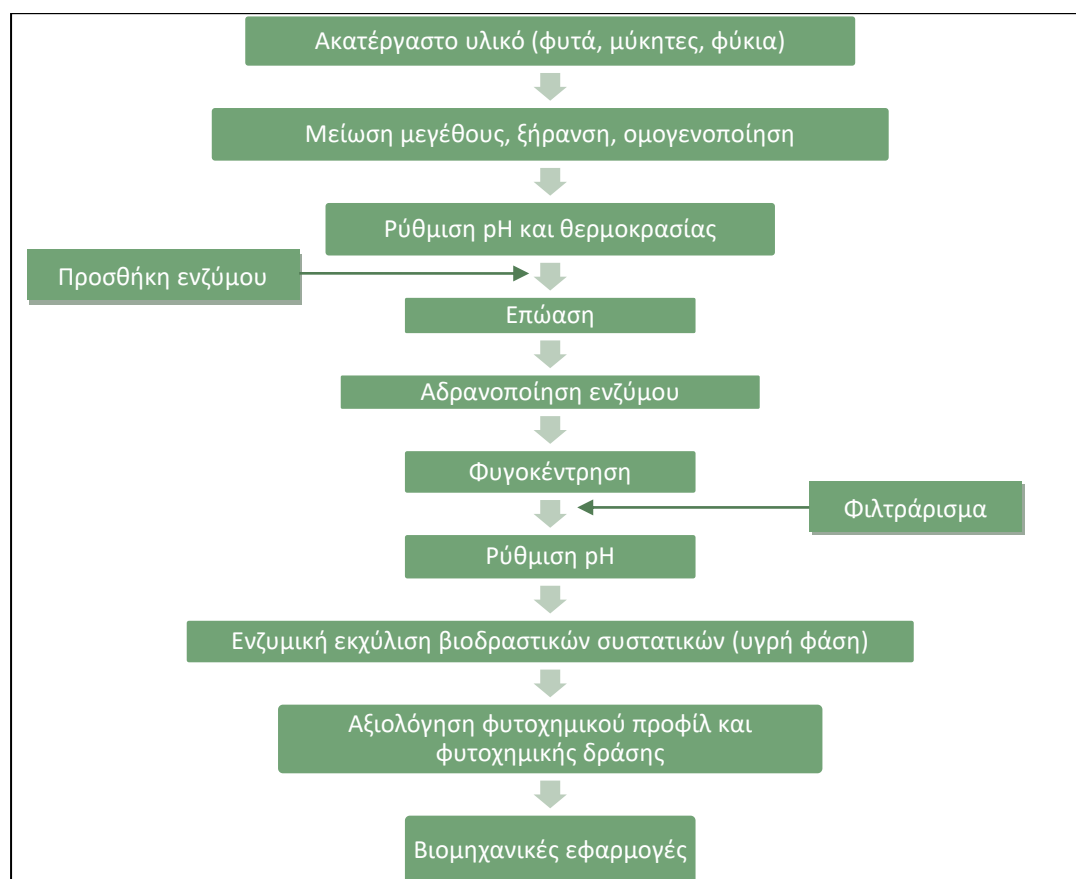
Η θερμοκρασία της εκχύλισης είναι μια ακόμα παράμετρος που επηρεάζει την ΕΥΕ, λόγω της επίδρασης της στην ενεργότητα του ενζύμου και στη ρεολογική συμπεριφορά των διαλυτοποιημένων βιοδραστικών συστατικών. Η ενζυμική ενεργότητα αυξάνεται αναλογικά ενώ το ιξώδες μειώνεται, με άνοδο της θερμοκρασίας και τα βιοδραστικά συστατικά διαλυτοποιούνται πιο εύκολα. Παρόλα αυτά η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να σταματήσει την υδρόλυση και να διασπάσει τα βιοδραστικά συστατικά. Κάθε ενζυμική εκχύλιση έχει μια βέλτιστη θερμοκρασία, ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιείται, στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης γίνεται μέγιστη. Οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις συνήθως λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές θερμοκρασίες (15-50 °C), γεγονός σημαντικό κατά την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών (Gligor et al., 2019; Sowbhagya et al., 2010).

Τέλος το pH είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ΕΑΕ λόγω της επίδρασης του στα κυτταρικά τοιχώματα και στην ενεργότητα του ενζύμου. Συνήθως ισχυρά όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει τη μερική ή την ολική καταστροφή τους. Το όξινο pH επηρεάζει την καταλυτική δράση μετασχηματίζοντας τις πρωτεΐνες και κατά συνέπεια δεσμεύοντας το υπόστρωμα, καθώς τα ένζυμα συνήθως απαιτούν όξινες τιμές pH. Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια ορισμένη τιμή pH, στην οποία λειτουργεί βέλτιστα και καταλύει την αντίδραση στη μέγιστη ταχύτητα. Η συνεργιστική δράση πηκτινάσης και κυτταρινάσης επιδεικνύει βέλτιστη δραστηριότητα σε τιμές pH 5.0-6.5. Περαιτέρω αύξηση αποδείχθηκε μη αποτελεσματική ως προς την ενεργότητα του ενζύμου. (Gligor et al., 2019; Γεράσιμος Λυμπεράτος, 2011).

2.4.1.3 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές. Αυτά περιλαμβάνουν ήπιες συνθήκες αντίδρασης λόγω

της χαμηλής θερμοκρασίας και της μικρότερης διάρκειας της, τη δυνατότητα χρήσης ολόκληρου του φυτού και τον μικρότερο αριθμό βημάτων της διεργασίας. Επιπλέον η χρήση εξειδικευμένου υποστρώματος οδηγεί στην εκχύλιση μεγάλου αριθμού βιοδραστικών συστατικών λόγω της πρόσβασης εντός του κυτταρικού τοιχώματος και των κενотоπίων, τα οποία δεν είναι προσβάσιμα με άλλο τρόπο. Παράλληλα μειώνει το κόστος λόγω της αντικατάστασης πολλών εγκαταστάσεων που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές μεθόδους. Το ακόλουθο διάγραμμα ροής (Διάγραμμα 2-1) ενδείκνυται για ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών (Gligor et al., 2019).



Διάγραμμα 2-1. Διάγραμμα ροής, γενικής μορφής ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. (Gligor et al., 2019).

Η χρήση ενζύμων για την πλήρη εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών χωρίς χρήση διαλυτών είναι μια ελκυστική πρόταση. Η μειωμένη χρήση διαλυτών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης είναι αρκετά σημαντική για περιβαλλοντικούς λόγους, δίνοντας έτσι μια διεργασία εκχύλισης φιλικότερη προς το περιβάλλον από τις συμβατικές τεχνικές. Απομακρύνονται επίσης τα ανεπιθύμητα συστατικά από τα κυτταρικά τοιχώματα και τα εμπόδια που προκύπτουν από τη διαλυτότητα του νερού ή την αδιαλυτότητα του δείγματος, με σκοπό τη βελτίωση της διεργασίας (Chenget al., 2015).

Παρόλο που η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βρίσκει όλο ένα και περισσότερες εφαρμογές, θα πρέπει να αυξηθεί και η χρήση της σε βιομηχανική κλίμακα. Κάτι τέτοιο είναι επιθυμητό λόγω του αυξημένου περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε βιοδραστικά συστατικά και της αποτελεσματικότερης διεργασίας εκχύλισης με λιγότερα παραπροϊόντα (Gligor et al., 2019).

Όμως η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση έχει πιθανούς περιορισμούς. Το υψηλό κόστος των ενζύμων για την επεξεργασία μεγάλου όγκου πρώτης ύλης είναι ένα βασικό εμπόδιο στην ευρεία χρήση της τεχνικής αυτής. Επιπρόσθετα η προκατεργασία με χρήση ενζύμων, που είναι γνωστή μέχρι στιγμής, δεν υδρολύει εξ' ολοκλήρου τα κυτταρικά τοιχώματα φυτών, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την απόδοση της εκχύλισης. Αρκετά δύσκολη είναι επίσης η μεταφορά της διεργασίας της ενζυμικής εκχύλισης σε βιομηχανική κλίμακα λόγω του υψηλού κόστους των απαιτούμενων υλικών, δηλαδή των μεγάλων ποσοτήτων ενζύμου και διαλυτών.

Ωστόσο, εάν οι περιορισμοί αυτοί ξεπεραστούν, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση είναι μια τεχνική αρκετά υποσχόμενη όχι μόνο για την αύξηση της απόδοσης της αλλά και για την βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος. Ταυτόχρονα μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο ήπιες συνθήκες, όπως χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης (Puri et al., 2012).

3 Φαινολικές ενώσεις

Αποτέλεσμα της φυτοχημικής σύνθεσης των φυτών είναι ένα πλήθος οργανικών μορίων, γνωστό και ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα προϊόντα αυτά λαμβάνουν μέρος σε ποικίλες λειτουργίες που αφορούν τη δομή και την προστασία των φυτών. Πιο συγκεκριμένα οι πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης συντίθενται κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και τον προστατεύουν από κινδύνους όπως μολύνσεις, τραυματισμούς αλλά και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανίες, ως αντιοξειδωτικά τροφίμων, αντιμικροβιακά συστατικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Stalikas, 2007; Robbins, 2003).

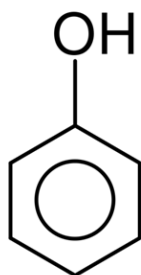
3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως καταναμημένες ομάδες ουσιών, στο φυτικό βασίλειο. Μέχρι σήμερα, αναγνωρίζονται περισσότερες από 8000 φυτικές ενώσεις με φαινολική δομή. Βιογενετικά, προκύπτουν από δύο πιθανές συνθετικές οδούς: την οδό του σικιμικού οξέος (the shikimate pathway) και την οδό του οξικού οξέος (the acetate pathway). Ταξινομούνται κυρίως σε πέντε ομάδες: τα φαινολικά οξέα, τις λιγνάνες, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τις

τανίνες. Μεταξύ όλων των δευτερογενών μεταβολιτών, τα φαινολικά είναι αυτά που παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ποσότητα των φαινολών στους φυτικούς ιστούς ποικίλλει ανάλογα με το είδος, την ηλικία και το βαθμό αποσύνθεσης του φυτού (Ainsworth et al., 2007).

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις εμφανίζονται στη φύση, κυρίως σε συζευγμένη μορφή, με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα σακχάρου που συνδέονται με ομάδες υδροξυλίου. Τα σάκχαρα αυτά, μπορούν να υπάρχουν ως μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ή ακόμη και ως ολιγοσακχαρίτες. Επίσης οι πολυφαινόλες μπορούν να εντοπισθούν ως λειτουργικά παράγωγα όπως εστέρες ή μεθυλεστέρες (Balasundram et al., 2006).

Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις των φυτών χαρακτηρίζονται ως αρωματικοί μεταβολίτες που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο άμεσα με έναν τουλάχιστον υποκαταστάτη υδροξυλίου. Ανάλογα με τον αριθμό των υποκαταστατών υδροξυλίου που περιέχουν κυμαίνονται από απλά μόρια, όπως φαινολικά οξέα, μέχρι εξαιρετικά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως είναι οι τανίνες (Stalikas, 2007; Bravo, 1998; Harborne, 1984).



Εικόνα 3-1. Βασική δομή φαινόλης (Elliot et al., 1997)

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι φαινολικές ενώσεις ταξινομούνται σε ομάδες. Η ταξινόμηση αυτή γίνεται με βάση τη διαφορά τους ως προς το μέγεθος και την πολυπλοκότητα. Πιο αναλυτικά οι κατηγορίες αυτές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3-1. Κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Balasundram et al., 2006)

Κατηγορία	Δομή
Απλές φαινόλες, βενζοκινόνες	C ₆
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	C ₆ – C ₁
Ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα	C ₆ – C ₂

Υδροξυκιναμωμικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή (κουμαρίνες, ισοκουμαρίνες, χρωμόνες)	$C_6 - C_3$
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 (προανθοκυανίνες ή φλαβολάνες)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Οι διαφορές στη χημική δομή και τη δραστικότητα των ενώσεων αυτών, οδηγεί σε διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως στη διαλυτότητα τη θερμική σταθερότητα και την ικανότητα τους να συνδέονται με άλλες ενώσεις (Pinelo et al., 2008; Balasundram et al., 2006).

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης των πολυφαινολών στηρίζεται στη θέση τους στο κύτταρο. Επομένως διαχωρίζονται σε:

- i. φαινόλες του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες συνδέονται με πολυσακχαρίτες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου.
- ii. φαινόλες που δεν ανήκουν στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες είτε βρίσκονται στα κενοτόπια του φυτού είτε σχετίζονται με τον πυρήνα των κυττάρων (Pinelo et al., 2006).

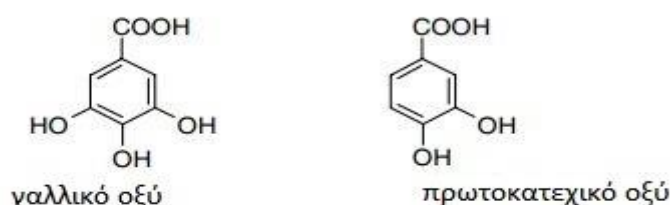
3.2 Φαινολικά Οξέα

Ο όρος «φαινολικά οξέα» αναφέρεται στις φαινόλες που διαθέτουν μία χαρακτηριστική ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Περιέχουν δύο διακριτές δομές άνθρακα: την υδροξυκιναμωμική και την υδροβενζοϊκή δομή. Η μεγάλη ποικιλία αυτών των ενώσεων οφείλεται στη διαφοροποίηση του αριθμού και της θέσης των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο, καθώς ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος (Robbins, 2003). Πολλές φορές οι καρβοξυλομάδες τους μετασχηματίζονται σε εστέρες και αμίδες ενώ οι υδροξυλομάδες τους είναι πολύ δραστικές.

Τα φαινολικά οξέα συνήθως χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες:

i. Τα βενζοϊκά οξέα

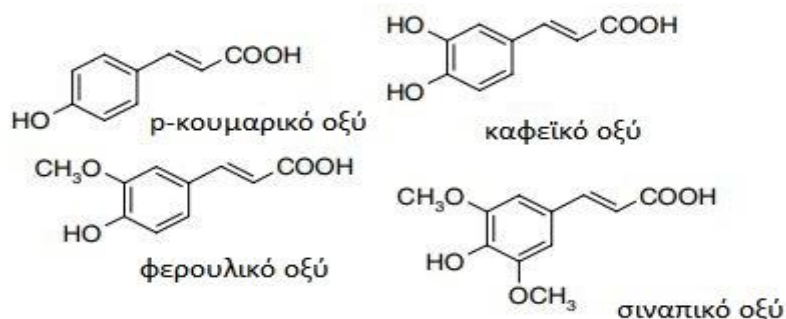
Περιέχουν 7 άτομα άνθρακα (C6-C1) και συμμετέχουν στη δομή ταννινών, αποτελώντας ένα από τα κύρια συστατικά τους. Τα κύρια βενζοϊκά οξέα είναι : το βανιλικό, το γαλλικό, το p-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό και το συριγγικό οξύ.



Εικόνα 3-2. Η χημική δομή του γαλλικού και του πρωτοκατεχικού οξέος (Balasundram et al., 2006).

ii. Τα κινναμωνικά οξέα

Περιλαμβάνουν 9 άτομα άνθρακα (C6-C3) και βρίσκονται είτε σε ελεύθερη είτε σε δεσμευμένη μορφή, κυρίως με τρυγικό οξύ. Σχηματίζονται από την φαιnyλαλανίνη και την τυροσίνη. Τα πιο γνωστά είναι : το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ.



Εικόνα 3-3. Η χημική δομή του p-κουμαρικού, του φερουλικού, του καφεϊκού και του σιναπικού οξέος. (Balasundram et al., 2006).

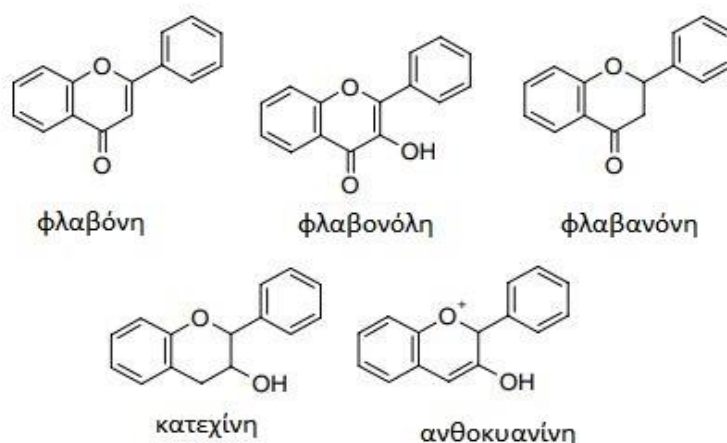
Τα φαινολικά οξέα, απασχολούν τους ερευνητές εξαιτίας των αντιβιοτικών και αντισηπτικών ιδιοτήτων τους (Stalikas, 2007; Bravo, 1998; Ζερβόπουλος, 2010).

3.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, που υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα αναπτυσσόμενα μέρη τους, ενώ παράλληλα είναι από τις πιο περίπλοκες και σύνθετες κατηγορίες χημικών στη φύση. Περισσότερα από 5000

διακριτά φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά (Robbins, 2003). Έχει αναφερθεί ότι είναι η πλέον άφθονη φυτική χρωστική ουσία μαζί με τη χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή, καθώς σε αυτά οφείλονται οι κόκκινες, μπλε και μωβ χρωστικές ουσίες των φυτών (Maimoona, 2011; Nijveldt et al., 2001).

Πρόκειται για ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Η βασική δομή των φλαβονοειδών, δηλαδή ο φλαβονοειδής πυρήνας, αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε τρεις δακτυλίους (C6-C3-C6). Ουσιαστικά, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους Α και Β (C6), ενωμένους με μία γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα, συνήθως σε μορφή οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου, με εξαίρεση τις περιπτώσεις των χαλκονών και των διϋδροχαλκονών. Οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών διαφέρουν στο βαθμό οξείδωσης και στο μοτίβο υποκατάστασης των δακτυλίων του άνθρακα (Routray et al., 2012; Pietta et al., 2000) Οι βασικότερες κατηγορίες φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι κατεχίνες (ή φλαβανόλες), οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες. Από τις παραπάνω, οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες αποτελούν τις πιο συχνά απαντώμενες κατηγορίες φλαβονοειδών, ενώ έχουν την μεγαλύτερη διαφορά στη δομή (Balasundram et al., 2006).



Εικόνα 3-4. Γενική δομή των βασικότερων κατηγοριών φλαβονοειδών. (Balasundram et al., 2006)

Τα φλαβονοειδή δρουν ως καταλύτες στη φωτοσύνθεση και/ή ως ρυθμιστές των διαύλων σιδήρου που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση. Ενισχύουν, επίσης, την αντοχή των κυττάρων κατά του οξειδωτικού στρες με σάρωση των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το φωτοσυνθετικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Λόγω των ευνοϊκών τους ιδιοτήτων απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας, τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά από την ακτινοβολία του ήλιου και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούνται από αυτή. Επιπλέον εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και κυτταροπροστατευτική δράση. Τέλος, παρουσιάζουν, αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς μειώνουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών χάρη στην αφθονία των φαινολικών υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο. Τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή είναι οι φλαβόνες και οι κατεχίνες (Pietta et al., 2000).

3.4 Τανίνες

Οι τανίνες είναι σχετικά υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις που αποτελούν την τρίτη σημαντική ομάδα φαινολών. Χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες. Οι πρώτες είναι εστέρες του γαλλικού οξέος (γαλοτανίνες και ελλαγιτανίνες). Οι συμπυκνωμένες τανίνες (ή προανθοκυανιδίνες) είναι πολυμερή φλαβαν-3-όλης συνδεδεμένες με δεσμούς άνθρακα και έχουν την ιδιότητα να απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες σε υψηλές θερμοκρασίες σε διαλύματα αλκοόλης ή σε ισχυρό ανόργανο οξύ (Porter, 1989). Η μεγάλη ποικιλία στη δομή αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές πιθανότητες σχηματισμού οξειδωτικής σύνδεσης. Πέραν αυτών, υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία, οι φλοροτανίνες, οι οποίες αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από φλορογλυκινόλη. Έχουν απομονωθεί, σε διάφορες περιπτώσεις, από θαλάσσια καφέ άλγη και δεν έχουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή (Bravo, 1998).

Εκτός από τη συμμετοχή τους στις συνήθεις φαινολικές αντιδράσεις, διαθέτουν ιδιότητες όπως η ικανότητα να καθιζάνουν αλκαλοειδή, ζελατίνη και άλλες πρωτεΐνες. Δε λειτουργούν αποκλειστικά ως πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (δηλ. ως δότες ατόμων υδρογόνου ή ηλεκτρονίων), αλλά και ως δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά. Συγκεκριμένα, μεταξύ άλλων, ασκούν τις ακόλουθες δράσεις: αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, δεσμεύουν και αδρανοποιούν προ-οξειδωτικά μεταλλικά στοιχεία όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, και δεσμεύουν πρωτεΐνες με καταστολή της ενζυμικής τους δράσης (αναστολή πρωτεάσης). Με αυτές τις αναγωγικές δραστηριότητες, οι ίδιες οι τανίνες οξειδώνονται (Amagowicz, 2007).

4 Αντιοξειδωτικά

4.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες (EP) είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που προέρχονται από ατελώς οξειδωμένες ενώσεις που έχουν υποστεί μερική καύση και έχουν στη δομή τους ομάδες οξυγόνου ικανές να εκκινούν, στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών ή ακόμα και εντός των κυττάρων, επιθετικές αντιδράσεις οξείδωσης. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι μέρη ομάδων μορίων που ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και δραστικές μορφές θείου (RSS). Παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού, ως παραπροϊόντα, και η ανεξέλεγκτη παραγωγή τους επηρεάζεται και από ενδογενείς διαδικασίες που εμφανίζονται στο σώμα (ελλιπής καταβολισμός, παραγωγή ενέργειας, ηπατική αποτοξίνωση κ.λπ.), αλλά και εξωγενείς από το περιβάλλον (καπνός τσιγάρων, μολυσμένος αέρας, ακτινοβολία, τρόφιμα, φάρμακα, νερό κ.λπ.). Δημιουργούνται στο στάδιο της έναρξης, συμμετέχουν σε μια

ακολουθία αντιδράσεων διάδοσης στην οποία ο αριθμός των ριζών είναι σταθερός και αργότερα καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της φάσης τερματισμού.

Εμφανίζουν πολλούς μηχανισμούς αντίδρασης με τα περιβάλλοντα μόρια, όπως, αναγωγή των ριζών με αποβολή ηλεκτρονίου και αποδοχή ηλεκτρονίων, οξειδωτικές ρίζες, απόσπαση υδρογόνου, αντιδράσεις προσθήκης, αντιδράσεις «αυτοκαταστροφής» και αυτοοξειδοαναγωγής. Οι αντιδράσεις αυτές, σε ένα βιολογικό σύστημα, οδηγούν σε οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη και των αμινοξέων στις πρωτεΐνες, σε αποπολυμερισμό του υαλουρικού οξέος, σε οξειδωτική οξείδωση του DNA και άλλα (Butnariu et al., 2012; Lü et al., 2010).

Ως αποτέλεσμα όλων αυτών των δράσεων, οι ελεύθερες ρίζες, συνδέονται με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι αυτοάνοσες διαταραχές, οι καρδιοαγγειακές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης της αρτηριοσκλήρυνσης και του εγκεφαλικού επεισοδίου, οι νευρολογικές και ηπατικές διαταραχές, η υπέρταση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι ασθένειες ανοσοανεπάρκειας, οι εκφυλιστικές διαταραχές που σχετίζονται με τη γήρανση, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και οι νόσοι όπως το Alzheimer, το Parkinson κλπ (Carocho et al., 2013).

Φυσικό επακόλουθο είναι η δημιουργία ενός αμυντικού συστήματος, από τον οργανισμό, για την εξουδετέρωση των ριζών αυτών. Συγκεκριμένα, αντιδρούν με μία ειδική κατηγορία ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά, τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

4.2 Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται μία οποιαδήποτε ένωση, η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Young, 2006) Ουσιαστικά είναι μόρια που μπορούν να δώσουν ή να πάρουν ηλεκτρόνια, με σκοπό να περιορίσουν την ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων στις ρίζες και επομένως να τις εξαλείψουν. Μπορούν, δηλαδή, να αντιδράσουν άμεσα με τις δραστικές ρίζες και είτε να τις καταστρέψουν είτε να τις μετατρέψουν σε λιγότερο επικίνδυνες και δραστικές είτε να διακόψουν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης. (Lü et al., 2010).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με ποικίλους τρόπους. Διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες, τα φυσικά και τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Η διάκριση αυτή ωστόσο, δεν συνεπάγεται ότι όλα τα φυσικά ή όλα τα συνθετικά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Ανάλογα με τις χημικές τους ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται και η δράση τους, διακρίνονται σε πρωτοταγή και δευτεροταγή (Aruoma et al., 1997). Μια άλλη κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση τη δραστηριότητά τους, σε ενζυμικά και μη ενζυμικά

αντιοξειδωτικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν διασπώντας και αφαιρώντας τις ελεύθερες ρίζες, μετατρέποντας με αυτό τον τρόπο επικίνδυνα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και έπειτα σε νερό, σε μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων παρουσία συμπαραγόντων όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο σίδηρος. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν με διακοπή αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η φυτική πολυφαινόλη, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη (Satish Balasaheb Nimse et al., 2015)

4.2.1 Φυσικά και Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυτικής προέλευσης και αποτελούν το βασικό μέρος του αμυντικού μηχανισμού των κυττάρων. Περιέχονται ως περίπλοκα μίγματα πολλών ενώσεων με διαφορετική δραστηριότητα. Παραλαμβάνονται από τις φυσικές πρώτες ύλες και παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τα επιμέρους συστατικά αυτών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες, η βιταμίνη D, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι μεταβολίτες υψηλού μοριακού βάρους όπως οι τανίνες (Pisoschi et al., 2016). Η αποτελεσματικότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών, εξαρτάται κυρίως από τα φυτά, από τα οποία προέρχονται και από τον τρόπο παραλαβής τους, ο οποίος είναι είτε σε μορφή εκχυλίσματος είτε σε μορφή αιθέριου ελαίου. Στην περίπτωση εκχυλίσματος, η αντιοξειδωτική ικανότητα επηρεάζεται επίσης από:

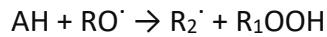
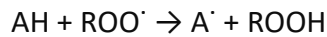
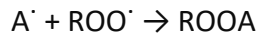
- Τις συνθήκες εκχύλισης
- Την πολικότητα του διαλύτη

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα αρωματικά φυτά, αποτελούν τις κυριότερες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών (Bozin et al., 2006).

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δημιουργήθηκαν προκειμένου να υπάρχει ένα τυπικό σύστημα μέτρησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας με σκοπό τη σύγκριση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αυτές οι ενώσεις προστίθενται στα τρόφιμα έτσι ώστε να μπορούν να αντέξουν σε διάφορες συνθήκες και επεξεργασίες, καθώς και για να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής τους. Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και ΒΗΑ βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (ΒΗΑ) είναι τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Όμως τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δεν προτιμώνται λόγω των δυσμενών παρενεργειών που προκαλούν. Συνεπώς υπάρχει μια γενική τάση για την εύρεση φυσικών απαντώμενων αντιοξειδωτικών, ασφαλών και αποτελεσματικών, που να συμπληρώνουν τα επεξεργασμένα τρόφιμα ή τα φαρμακευτικά προϊόντα και να αντικαθιστούν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά (Lallianrawna et al., 2013; Carochi et al., 2013)

4.2.2 Πρωτοταγή και Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των τελευταίων σε πιο σταθερά προϊόντα. Παράγονται από δευτεροταγή αντιοξειδωτικά, μέσω της παροχής ηλεκτρονίων υδρογόνου στις πρωτοταγείς αντιοξειδωτικές ρίζες. Είναι αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα μπορούν να μετατραπούν σε προ-οξειδωτικά. Οι γενικές αντιδράσεις, με τις υπεροξειδικές και τις αλκοξυ-ρίζες, στις οποίες συμμετέχουν τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά είναι οι εξής:



(Khan et al., 2017; Τσιμογιάννης, 2008).

Τα δευτεροταγή ή προληπτικά αντιοξειδωτικά καθυστερούν το ρυθμό έναρξης της αλυσιδωτής αντίδρασης με διάφορους μηχανισμούς και έχουν προληπτικό ρόλο. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τη δέσμευση οξυγόνου και ελάττωση της συγκέντρωσης του, σε ένα κλειστό σύστημα. Ένας άλλος τρόπος δράσης τους είναι η δέσμευση μετάλλων τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Επίσης, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων, να μετατρέπουν τα υδροπεροξειδία σε μη ριζικά είδη ή να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία. Στην κατηγορία αυτή, εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του, το θειώδες οξύ και τα άλατά του, επίσης οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χημικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό και φυτικό οξύ (Belitz, 2015; Hudson, 2012; Pisoschi et al., 2016).



Μέθοδοι και Υλικά

5 Υλικά

5.1 Πρώτες ύλες

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν πέντε αποξηραμένα είδη φυτού *Sideritis*. Πιο συγκεκριμένα τα είδη αυτά είναι τα εξής:

- *Sideritis scardica*
- *Sideritis raeseri*
- *Sideritis clandestina*
- *Sideritis euboica*
- *Sideritis syriaca*



Εικόνα 5-1. Δείγμα φυτού *Sideritis Euboica* πριν τον τεμαχισμό

5.2 Όργανα και Συσκευές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- ✓ Φωτόμετρο Hitachi UV 2000
- ✓ Φωτόμετρο SPECTRAMax 250 (Molecular Devices, USA)
- ✓ Ζυγός ακριβείας Adventurer OHAUS ($\pm 0,0001g$)
- ✓ pH-μετρο 537 της εταιρείας WTW (Γερμανία).
- ✓ Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- ✓ Για την αποστείρωση αντιδραστηρίων και διαφόρων γυαλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε αυτόκαυστο Labo Autoclave του οίκου SANYO.
- ✓ Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
- ✓ Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα).
- ✓ Φυγόκεντρος TJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- ✓ Ξηραντήρας της BINDER (Γερμανία)
- ✓ Συσκευή Κενού Heto MASTER JET (Δανία)
- ✓ VARIAN 212-LC & Φασματόμετρο Μάζας VARIAN 500-MS
- ✓ 7700 Series ICP-MS της AGLIENT TECHNOLOGIES
- ✓ Microwave Digestion System της MILESTONE

5.3 Αντιδραστήρια και Ένζυμα

5.3.1 Αντιδραστήρια και τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits)

Έγινε χρήση χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, των εταιριών Sigma (Η.Π.Α), Merck (Γερμανία), CIBA (Ελβετία), Δελής (Αθήνα). Πιο αναλυτικά τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- ✓ Αιθανόλη (EtOH)
- ✓ Μεθανόλη (MeOH)
- ✓ DPPH
- ✓ Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- ✓ Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3)
- ✓ Γαλλικό οξύ
- ✓ Νιτρώδες νάτριο (NaNO_2)
- ✓ Χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3)
- ✓ Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
- ✓ Κατεχίνη

5.3.2 Ενζυμα

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προσφορά της εταιρία Novozymes (Δανία) και είναι τα εξής:

- ✓ Ένζυμο Cellic CTec2
- ✓ Ένζυμο Viscozyme L
- ✓ Ένζυμο Cellic HTec2

6 Μέθοδοι

6.1 Μέθοδος σχεδιασμού Taguchi

Σύμφωνα με τη φιλοσοφία του Taguchi η προσπάθεια για βελτίωση της ποιότητας ενός προϊόντος θα πρέπει να μεταφερθεί από το στάδιο των ελέγχων κατά τη διαδικασία, στο στάδιο σχεδιασμού. Η μέθοδος Taguchi βασίζεται σε τρεις απλές αρχές:

1. Η ποιότητα του προϊόντος πρέπει να καθορίζεται κατά το σχεδιασμό του και όχι να ελέγχεται με την κατασκευή του.

2. Η ποιότητα συσχετίζεται με την απόκλιση μιας σχεδιαστικής παραμέτρου από την τιμή στόχο και το προϊόν πρέπει να σχεδιαστεί έτσι ώστε να μην επηρεάζεται από μη ελεγχόμενους εξωτερικούς παράγοντες.

3. Το κόστος της ποιότητας πρέπει να μετράται σαν συνάρτηση της απόκλισης από το στόχο και οι ζημίες πρέπει να υπολογίζονται σε όλο το σύστημα.

Κάτι τέτοιο απαιτεί την κατασκευή δυο ξεχωριστών πλάνων του πειράματος για τους παράγοντες ελέγχου και θορύβου. Ως παράγοντες ελέγχου ορίζονται οι παράγοντες οι οποίοι είναι εύκολο και συμφέρον να ελεγχθούν κατά τη διάρκεια μιας διεργασίας. Αυτοί με τη σειρά τους κατηγοριοποιούνται σε παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη διασπορά μιας απόκρισης (παράγοντες σχεδιασμού - design factors) και παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη μέση τιμή της (παράγοντες απόκρισης – response factors). Ως παράγοντες θορύβου θεωρούνται οι παράγοντες οι οποίοι είναι δύσκολο και οικονομικά ασύμφορο να ελεγχθούν. Αυτοί μπορούν να επιδρούν στο προϊόν ενώ πολύ συχνά δεν μπορεί να προβλεφθούν. Χωρίζονται σε περεταίρω κατηγορίες όπως παράγοντες εξωτερικού θορύβου, παράγοντες εσωτερικού θορύβου και παράγοντες θορύβου προϊόντος. Γενικά ο σχεδιασμός ενός προϊόντος, βάση της μεθόδου αυτής, αποτελείται από δυο πλάνα πειράματος, ένα για τους παράγοντες ελέγχου και ένα για τους παράγοντες θορύβου. Θεωρείται ότι δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων ελέγχου. Λόγω αυτής της υπόθεσης ο ερευνητής μπορεί να μελετήσει έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων σε ένα μικρό πείραμα και με αυτό τον τρόπο να μειώσει το κόστος του πειράματος. Για τους παράγοντες θορύβου ο Taguchi προτείνει ο ερευνητής να εξετάσει την επίδραση του θορύβου μελετώντας κάθε παράγοντα θορύβου για δυο ή τρεις ρυθμίσεις.

Για τον σχεδιασμό του πειράματος προτείνει την χρήση ορθογώνιων πινάκων. Ένας τυπικός ορθογώνιος πίνακας για πείραμα με επτά παράγοντες δύο επιπέδων παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 6-1. Ορθογώνιος πίνακας L_8 (Kim et al., 2004)

	Factors						
Trial	A	B	C	D	E	F	G
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2

8	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

Κάθε γραμμή του πίνακα αντιστοιχεί σε μια πειραματική δοκιμή, ενώ τα νούμερα στο εσωτερικό του αντιστοιχούν στα επίπεδα του εκάστοτε παράγοντα. Οι διαφορετικοί παράγοντες σημειώνονται με γράμματα (A-G) στο πάνω μέρος του πίνακα. Η εκτέλεση του αντίστοιχου πλήρους παραγοντικού πειράματος θα απαιτούσε 2^7 δοκιμές χωρίς απαραίτητα να δώσει σημαντικά μεγαλύτερο όγκο πληροφοριών.

Σύμφωνα με τον Taguchi η μέθοδος η οποία ακολουθείται για τον σχεδιασμό ενός πειράματος και την εύρεση των τιμών που μεγιστοποιούν την απόδοση δίνεται περιληπτικά:

1. Αναγνώριση των παραγόντων και των αρχικών τιμών τους καθώς και διαχωρισμός τους σε παράγοντες ελέγχου και παράγοντες θορύβου.
2. Σχεδιασμός του γραμμικού σχεδίου του προβλήματος όπου φαίνονται οι παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις τους και επιλογή του κατάλληλου ορθογώνιου πίνακα
3. Διεξαγωγή του πειράματος και αξιολόγηση της στατιστικής απόδοσης του σχεδίου. Πρέπει τα πειράματα να διεξαχθούν με τις σωστές συνθήκες ούτως ώστε να μην γίνουν λάθη, γιατί θα χαθεί η ορθογωνιότητα του πειραματικού σχεδιασμού.
4. Βάση της απόδοσης, γίνεται πρόβλεψη των νέων ρυθμίσεων για τις παραμέτρους σχεδιασμού
5. Έλεγχος ότι οι νέες ρυθμίσεις αυτές βελτιώνουν την απόδοση (Kim et al., 2004; Tsui, 1992; Kacker, 1989).

Βάση του Taguchi η μεταβλητότητα ενός παράγοντα δεν έχει κανένα νόημα αν δεν είναι γνωστή η μέση τιμή του και γι αυτό εισάγεται η έννοια του λόγου σήματος προς θόρυβο (signal to noise factor – S/N). Ο λόγος S/N είναι μια απλή αριθμητική ένδειξη του μεγέθους της μεταβλητότητας σε μια συγκεκριμένη συνθήκη που πραγματοποιείται το πείραμα (Kim et al., 2004). Αναλόγως της φύσης της απόκρισης, ο λόγος S/N μπορεί να πάρει τρεις μορφές:

1. Λιγότερο είναι καλύτερο (Lower is better) $S/N = -10 * \log \left(\frac{1}{r} \sum_1^r y_i^2 \right)$
 2. Βέλτιστο είναι καλύτερο (Nominal is best) $S/N = -10 * \log V_e$
 3. Μέγιστο είναι καλύτερο (Higher is better) $S/N = -10 * \log \left(\frac{1}{r} \sum_1^r \frac{1}{y_i^2} \right)$
- Όπου r: ο αριθμός δοκιμών και y_i : το αποτέλεσμα της δοκιμής

Για να προκύψει αυτός ο λόγος είναι απαραίτητες οι επαναλήψεις των πειραμάτων και στη συνέχεια η λήψη της μέσης τιμής και της διακύμανσης των αποκρίσεων. Σε κάθε περίπτωση είναι επιθυμητή η μέγιστη δυνατή τιμή του S/N ratio, καθώς η τιμή αυτή δείχνει ότι η απόκριση πλησιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο το «ιδανικό» ενώ ο θόρυβος είναι όσο το δυνατόν μειωμένος. Άρα η παραγωγική διεργασία είναι λιγότερο ευαίσθητη στη μεταβλητότητα (Wang et al., 2002).

Η μέθοδος Taguchi είναι μια απλή μέθοδος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ευκολία και είναι εξαιρετικά οικονομική. Καθότι ανήκει στους κλασματικούς παραγοντικούς σχεδιασμούς, έχει την ικανότητα να δώσει συμπεράσματα με μικρό αριθμό πειραμάτων, πολύ μικρότερο από τον αριθμό των πειραμάτων αν γίνονταν πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός. Το βασικό της μειονέκτημα είναι ότι δεν λαμβάνονται υπ'όψιν οι αλληλεπιδράσεις. Βέβαια αυτό μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να χρησιμοποιηθεί προς όφελος του ερευνητή. Σε πολύ πολύπλοκα συστήματα όπου υφίστανται πολλές αλληλεπιδράσεις και όπου μπορεί να αναμένεται να έχουν μικρή αλληλεπίδραση η καθεμία ξεχωριστά. Η ανάλυση Taguchi μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη συνέχεια να μελετηθούν κάποιες αλληλεπιδράσεις αν τα αποτελέσματα δεν ικανοποιούν (Kim et al., 2004; Tsui, 1992; Kacker, 1989).

6.2 Μέθοδοι Εκχύλισης

6.2.1 Συμβατική εκχύλιση

Όσον αφορά τη συμβατική εκχύλιση υγρού-στερεού, αρχικά, για κάθε δείγμα, ζυγίστηκαν 5g φυτικού υλικού *Sideritis scardica* με αναλυτικό ζυγό. Σε αυτό προστέθηκαν 100mL του επιλεγόμενου διαλύτη και επιτεύχθηκε μία αρχική συγκέντρωση 50 g/L. Ακόμη, ως διαλύτης επιλέχθηκε νερό και η αιθανόλη σε διάφορες αναλογίες και πιο συγκεκριμένα σε ποσοστό αιθανόλης (EtOH) 100%, 80%, 60%, 40%, 20% και 0%, με σκοπό να ελεγχθεί πως επηρεάζει η πολικότητα του διαλύτη την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών.



Εικόνα 6-1. . Τα δείγματα μετά από συμβατική εκχύλιση. Από αριστερά προς τα δεξιά περιεκτικότητα διαλύτη: 100% H₂O, 20% EtOH, 40% EtOH.

Η συμβατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, χωρίς τη χρήση θέρμανσης, ώστε να μην επηρεαστεί η δομική ακεραιότητα των φυτικών δειγμάτων. Ο χρόνος εκχύλισης που επιλέχθηκε αρχικά για όλα τα δείγματα ήταν 72h.

Μετά το πέρας του επιλεγμένου χρόνου, τα δείγματα διηθήθηκαν υπό κενό σε προζυγισμένα χαρτιά διηθήσεως, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε περιέκτες δειγμάτων, φυγοκεντρήθηκαν για $t=10$ min και φυλάχθηκαν σε κατάψυξη. Τα στερεά υπολείμματα του φυτού οδηγήθηκαν προς ξήρανση, σε φούρνο στους 60°C μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό.



Εικόνα 6-2. Τα δείγματα μετά τη διήθηση. Από αριστερά προς τα δεξιά περιεκτικότητα διαλύτη: 100% H_2O , 20% EtOH, 40% EtOH, 60% EtOH, 80% EtOH, 100% EtOH

Στη συνέχεια, αφού επιλέχθηκε ο κατάλληλος διαλύτης, ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του τσαγιού του εκχυλιζόμενου δείγματος. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν δείγματα του φυτού *Sideritis scardica* συγκεντρώσεων 1%, 2%, 4% και 7% για 24 ώρες εκχύλισης.

Ένας ακόμα παράγοντας που μελετήθηκε είναι ο χρόνος εκχύλισης. Δείγματα του φυτού *Sideritis scardica*, συγκέντρωσης 5%, εκχυλίστηκαν για 24, 48 και 72 ώρες.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έγινε επιλογή συνθηκών (σύσταση διαλύτη, συγκέντρωση τσαγιού και χρόνος εκχύλισης) και ακολούθησε συμβατική εκχύλιση και των πέντε ειδών τσαγιού. Όλα τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($\approx 30^{\circ}\text{C}$) υπό ανάδευση (180 rpm).

Τέλος τα δείγματα συλλέχθηκαν και διηθήθηκαν υπό κενό σε προζυγισμένα χαρτιά διηθήσεως. Το στερεό υπόλειμμα, οδηγήθηκε προς ξήρανση στους 60°C μέχρι σταθερού βάρους και έπειτα ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό. Τα διηθήματα τοποθετήθηκαν σε περιέκτες δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονται στο υπερκείμενο.

6.2.2 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης

Μετά το πέρας των αρχικών συμβατικών εκχυλίσεων, ακολούθησε συνδυασμός της συμβατικής εκχύλισης με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου του σκευάσματος Cellic CTec2, με σκοπό να επιλεγθούν οι τιμές του παράγοντα αυτού που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, κατά τον σχεδιασμό Taguchi. Οι τιμές του ενζυμικού φορτίου που επιλέχθηκαν σε αυτό το στάδιο είναι 5, 10 και 12.5 Units/g DM. Δείγματα του είδους *Sideritis scardica* 2% , εκχυλίζονται υποβοηθούμενα από ένζυμο για 5h στους 50°C και ακολουθεί συμβατική εκχύλιση στους 30°C για 24 ώρες. Ο ρυθμός ανάδευσης των δειγμάτων ήταν 180 rpm.

Στη συνέχεια βάση του σχεδιασμού Taguchi, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθούν οι ακόλουθες δοκιμές:

Πίνακας 6-2. Παράγοντες και τα επίπεδά του που μελετήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο Taguchi.

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A: χρόνος (h)	2	5	8
B: ενζυμικό φορτίο (Units/g D.M)	2.5	5	7.5

Πίνακας 6-3. Πειράματα βάσει του σχεδιασμού 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

Κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση έγινε χρήση των ακόλουθων ενζύμων:

Πίνακας 6-4 Στοιχεία των χρησιμοποιούμενων ενζύμων

Όνομα	Είδος ενζύμου	Περιεχόμενο	Βέλτιστες συνθήκες
Cellic CTec2	Κυτταρινολυτικό	Κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάσες	T=50-55 °C, pH=5.0-5.5
Cellic HTec2	Ημικυτταρινολυτικό	Ημικυτταρινάσες	T=45-50 °C, pH=5.0
Viscozyme L	Κυτταρινολυτικό	Μίγμα καρβοϋδρασών (αραβινάση, κυτταρινάση, β-γλυκανάση, ημικυτταρινάση και ξυλανάση)	-

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των Cellic CTec2 και Viscozyme L ξεχωριστά και στη συνέχεια η συνεργιστική δράση των Cellic CTec2 και Cellic HTec2. Βάση των βέλτιστων συνθηκών για κάθε ένζυμο, επιλέχθηκε θερμοκρασία 50°C και δημιουργήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου και κιτρικού οξέος με pH 5.0 για την ενζυμική εκχύλιση.

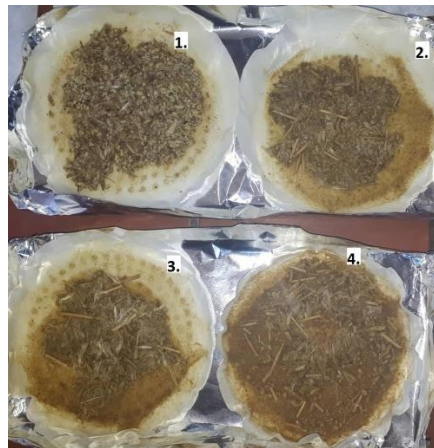
Σε αυτήν την περίπτωση, αρχικά αναμίχθηκε ποσότητα φυτικού υλικού του φυτού *Sideritis scardica* με αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος έτσι ώστε το διάλυμα που προκύπτει να είναι συγκέντρωσης 125 g/L. Υπολογίστηκε και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε ενζύμου (μL) έτσι ώστε να επιτυγχάνεται το απαιτούμενο ενζυμικό φορτίο Units/ g DM σε κάθε περίπτωση. Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε και «τυφλό» δείγμα (απουσία ενζύμου). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (shaker), όπου ρυθμίστηκε η κατάλληλη θερμοκρασία και οι στροφές (N=180 rpm) και παρέμειναν για 2, 5 και 8 ώρες αντίστοιχα.



Εικόνα 6-3. Τα δείγματα στον αναδευτήρα (shaker) κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.

Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου, προστέθηκε σε κάθε δείγμα κατάλληλη ποσότητα αιθανόλης (EtOH) τέτοια ώστε η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος να είναι $50 \text{ g στερεού} / \text{L}$ και η περιεκτικότητα του σε αιθανόλη να είναι 60%. Έπειτα τα δείγματα επανατοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (shaker) σε θερμοκρασία 30°C και στροφές $N= 180 \text{ rpm}$ για 24 ώρες.

Τέλος τα δείγματα συλλέχθηκαν και διηθήθηκαν υπό κενό σε προζυγισμένους ηθμούς. Το στερεό υπόλειμμα, όπως και στη συμβατική εκχύλιση, οδηγήθηκε προς ξήρανση στους 60°C μέχρι σταθερού βάρους και έπειτα ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό. Τα διηθήματα τοποθετήθηκαν σε περιέκτες δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονται στο υπερκείμενο.



Εικόνα 6-4. Το στερεό υπόλειμμα μετά τον συνδυασμό ενζυμική εκχύλισης με ένζυμο Viscozyme L. για 8h και συμβατικής εκχύλισης για 24h. Τα δείγματα περιέχουν τις ακόλουθες ποσότητες ενζύμου: 1. Τυφλό (0 Units/gDM), 2. 2,5 Units/g DM, 3. 5 Units/ gDM, 4. 7,5 Units/ gDM.

Για να πραγματοποιηθεί μελέτη της επίδρασης της συνεργιστικής των ενζύμων Cellic CTec2 και Cellic HTec2 στα εκχυλίσματα τσαγιού, έγινε αντικατάσταση του Cellic CTec2 κατά 10% των τιμών του ενζυμικού φορτίου που επιλέχθηκαν να μελετηθούν κατά τον σχεδιασμό Taguchi που παρουσιάστηκε νωρίτερα, ενώ η ενζυμική εκχύλιση διήρκησε 2 ώρες. Ακολούθησε συμβατική εκχύλιση σύμφωνα με

τη διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε και στα υπόλοιπα πειράματα συνδυασμού μεθόδων εκχύλισης.

Πίνακας 6-5. Παράγοντες και επίπεδα που μελετήθηκαν κατά την συνεργιστική δράση των δυο ενζύμων σύμφωνα με το σχεδιασμό Taguchi.

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A: ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (Units/g D.M)	2.25	4.5	6.75
B: ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (Units/g D.M)	0.25	0.5	0.75

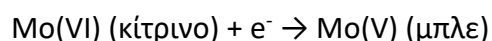
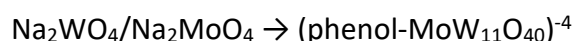
Τέλος επιλέχθηκαν οι συνθήκες: ένζυμο, ενζυμικό φορτίο και χρόνος ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης, και πραγματοποιήθηκε συνδυασμός συμβατικής εκχύλισης και EYE σε όλα τα είδη τσαγιού, με τη μέθοδο που περιγράφηκε νωρίτερα.

6.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

Όλα τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών τους. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αναλύσεις.

6.3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών, μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για την ανάλυση πρωτεϊνών και συγκεκριμένα τη χρωματομετρική μέτρηση της τυροσίνης, από τους O. Folin και V. Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αποτελείται από ένα μίγμα μολυβδαινικού νατρίου, βολφραμικού νατρίου και άλλων αντιδραστηρίων. Κατά την αντίδραση του με φαινόλες, τις οξειδώνει και ως αποτέλεσμα παράγει έγχρωμο, συγκεκριμένα μπλε, προϊόν στα 745-750 nm. Το χρώμα του οφείλεται σε ένα σύμπλοκο είδους Mo (V), το οποίο προκύπτει σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, σε αλκαλικό μέσο, από τα φαινολικά συστατικά σε σύμπλοκα φωσφορομολυβδενικού/φωσφοροβολφραμικού οξέος, προς το σχηματισμό μπλε συμπλόκων. Είναι απλή, ευαίσθητη και ακριβής, ωστόσο, η αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH και στερείται εξειδίκευσης. Επομένως, για τη βελτίωση της μεθόδου, η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na₂CO₃. Επίσης ρυθμίζεται η κατάλληλη αναλογία όγκου αλκαλίων και αντιδραστηρίων F-C, βέλτιστος χρόνος αντίδρασης και θερμοκρασία για την ανάπτυξη χρώματος και χρήση του γαλλικού οξέος ως στάνταρ φαινόλη αναφοράς. Η βελτιωμένη αυτή μέθοδος που περιγράφεται καθόρισε τις συνθήκες ελαχιστοποίησης της μεταβλητότητας και της εξάλειψης των ασταθών αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών (Ainsworth et al., 2007; Folin, 1927; Prior et al., 2005).

6.3.1.1 Διαδικασία

Χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες, με την αναγραφόμενη σειρά:

- 50μL δείγματος
- 3mL H₂O
- 0.25mL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (επώαση για t=1-8min)
- 0.75 mL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃ (ρυθμιστής pH)
- 0.95 mL H₂O

Μετά την παρασκευή τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για t=1h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι καθώς το αντιδραστήριο F-C θεωρείται φωτοευαίσθητο. Η απορρόφηση προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε λ_{max}=755nm. Τονίζεται ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, για μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Το σύνολο των υπολογισμών βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου F-C, η οποία παρασκευάστηκε με χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο διάλυμα. Στη συνέχεια, από τα δεδομένα της συγκεκριμένης καμπύλης, μέσω της απορρόφησης που καταγράφονταν για κάθε δείγμα, υπολογίστηκαν τα ολικά φαινολικά, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC)} = \frac{C_{ga} * V_{ext}}{10 * m_{ext}} \quad (\text{mg}/100\text{g tea}) \quad (1)$$

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.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η περιεκτικότητα φαινολικών στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

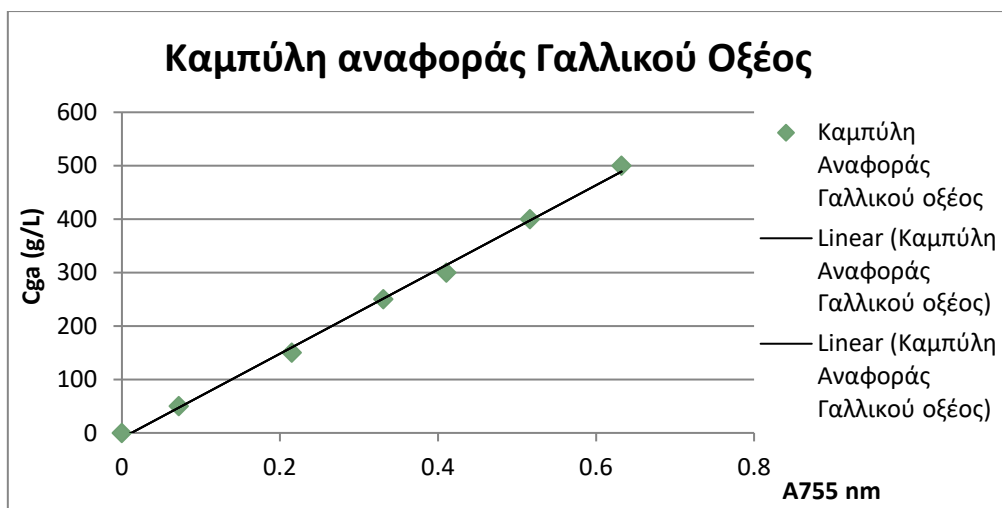
6.3.1.2 Καμπύλη αναφοράς ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC)

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος καθώς και ένα τυφλό δείγμα (απουσία γαλλικού οξέος) προκειμένου η τιμή της απορρόφησης του να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος γαλλικού οξέος που παρασκευάστηκε είναι $C_0=0.5 \text{ g/L}$. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης που προέκυψαν σε $\lambda_{\max}=755\text{nm}$ είναι:

Πίνακας 6-6. Δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς τους γαλλικού οξέος

Δείγμα	C_{ga} (mg/L)	A_S (M.O.) nm	A nm (=A _S -A _{Blank})
Blank	-	0,015	-
0.1C ₀	50	0,087	0,072
0.3C ₀	150	0,230	0,215
0.5C ₀	250	0,346	0,331
0.6C ₀	300	0,426	0,411
0.8C ₀	400	0,531	0,516
C ₀	500	0,647	0,632

Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει η εξίσωση $C_{ga} = 788.2 * A_{755} - 9.4 \mu\text{ε}$ με $R^2 = 0.9973$.



Διάγραμμα 6-1. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

6.3.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών, μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών πραγματοποιείται με τη χρωματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου, η οποία προτάθηκε αρχικά το 1960 για την ανάλυση φυτικών δειγμάτων. Βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκων των φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) και στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό τους (Panche et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα το αντιδραστήριο AlCl_3 σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με τις κετονομάδες C-4 και είτε με την υδροξυλομάδα C-3 είτε την υδροξυλομάδα C-5 των φλαβονοειδών. Επιπλέον, σχηματίζει ασταθή σύμπλοκα με τις ορθο-διϋδροξυλομάδες του δακτυλίου A ή B των φλαβονοειδών.

Ένδειξη της ύπαρξης φλαβονοειδών στο διάλυμα αποτελεί ο ροζ χρωματισμός του εκάστοτε δείγματος. Τέλος, ως πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές ενώσεις, όπως η κατεχίνη, η ρουτίνη ή η κερσετίνη, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση των φλαβονοειδών να εκφράζεται σε ισοδύναμα της επιλεγόμενης ένωσης. (Dantas, 2012; Pekal et al., 2014).

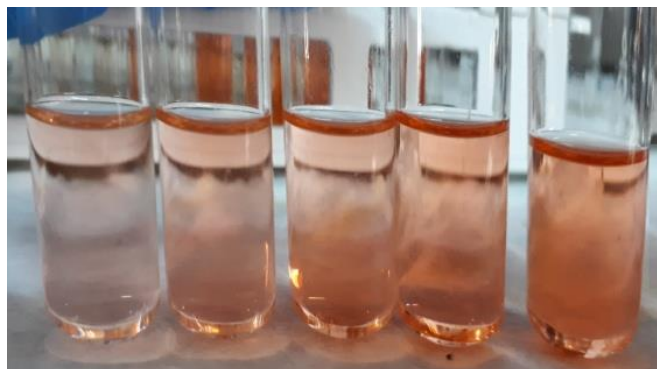
6.3.2.1 Διαδικασία

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια κατά σειρά:

- 125μL του εκάστοτε εκχυλίσματος
- 75μL NaNO_2 (5%) – επώαση για $t=6\text{min}$

- 150μL AlCl₃ (10%) – επώαση για t=5min
- 750μL NaOH (1M)
- 1400μL H₂O

Αφού παρασκευάστηκαν τα παραπάνω διαλύματα, οδηγήθηκαν σε ανάμιξη και εν συνεχεία επώαστηκαν, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για t=15min. Έπειτα, τα δείγματα φωτομετρούνται σε λ_{max}=495nm. Για την καμπύλη αναφοράς ακολουθείται η ίδια μέθοδος χρησιμοποιώντας ως πρότυπο, διάλυμα κατεχίνης που παρασκευάστηκε στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 6-5. Τα δείγματα μετά από 15 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Από τα αριστερά προς τα δεξιά αυξάνεται η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή).

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε ολικά φλαβονοειδή πραγματοποιείται κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που ακολουθήθηκε για την εύρεση των ολικών φαινολικών. Πιο αναλυτικά, μέσω της καμπύλης αναφοράς, μετατράπηκε η μετρούμενη απορρόφηση σε συγκέντρωση, η οποία εκφράζεται σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή:

$$\text{Total Flavonoid Content (TFC)} = \frac{C_{cat} \cdot V_{ext}}{10 \cdot m_{ext}} \text{ (mg/100 g tea)} \quad (2)$$

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.

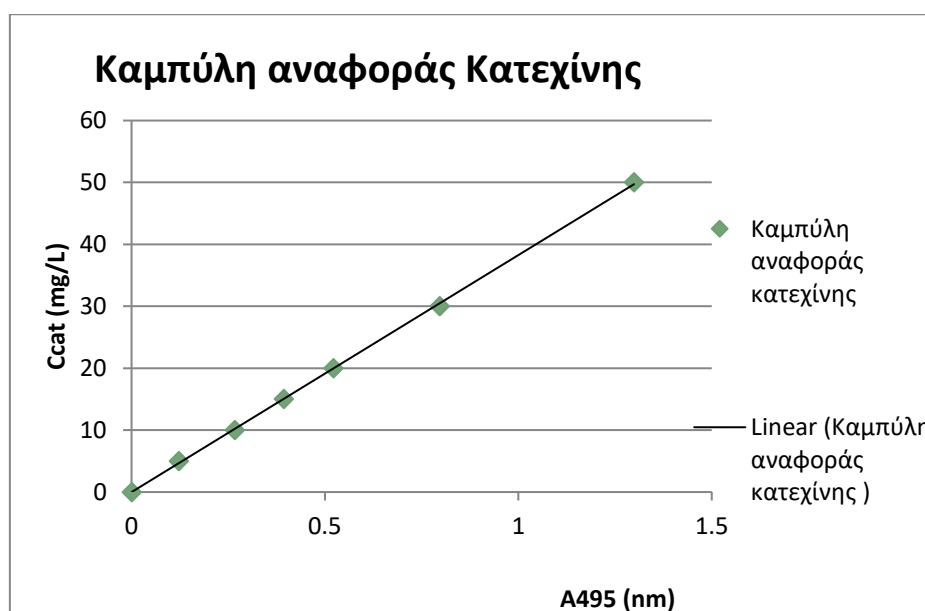
6.3.2.2 Καμπύλη αναφοράς ολικών φλαβονοειδών

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς των φλαβονοειδών έγινε με παρόμοιο τρόπο με αυτόν της καμπύλης αναφοράς των ολικών φαινολικών ενώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις κατεχίνης καθώς και ένα τυφλό

δείγμα (απουσία κατεχίνης) προκειμένου η τιμή της απορρόφησης αυτού να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος κατεχίνης που παρασκευάστηκε είναι $C_0=0.5 \text{ g/L}$. Από το αρχικό αυτό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα των ακόλουθων συγκεντρώσεων τα οποία και φωτομετρήθηκαν σε $\lambda_{\max}=495\text{nm}$.

Πίνακας 6-7. Δεδομένα για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς κατεχίνης

C_{cat} (mg/L)	A_{495} (M.O.) nm
5	0,122
10	0,267
15	0,393
20	0,522
30	0,796
50	1,299



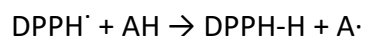
Διάγραμμα 6-2. Καμπύλη αναφοράς Κατεχίνης

Στο Διάγραμμα 6-2 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης που προκύπτει με εξίσωση $C_{cat} = 38.285 * ABS_{495} - 0,0159$ με $R^2 = 0,9997$.

6.3.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέθοδος DPPH

Η μέθοδος του αντιδραστηρίου DPPH αναπτύχθηκε από τον Blois το 1958 και τροποποιήθηκε από τους Brand-Williams et al. το 1995. Στηρίζεται στην αλληλεπίδραση και εξουδετέρωση μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκάστοτε δείγματος. (Brand-Williams et al., 1995)

Πιο αναλυτικά, η ρίζα του DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίο) είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα αζώτου, εμπορικά διαθέσιμη, που εμφανίζει βαθύ πορφυρό χρώμα και ισχυρή απορρόφηση στα 515nm. (Akar et al., 2017). Η απορρόφηση μειώνεται αναλογικά όταν η ρίζα δεσμεύεται από κάποια αντιοξειδωτική ένωση και λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο ή υδρογόνο από αυτή, ενώ το χρώμα αλλάζει σε ανοιχτό κίτρινο. Η μεταβολή της απορρόφησης αυτή, είναι ένδειξη της ικανότητας από-μάκρυνσης ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά (Ak, 2008). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν είτε μέσω του δείκτη IC_{50} , που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί 50% μείωση της ρίζας DPPH[·], είτε ως ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH[·] σε σταθερή συγκέντρωση αντιοξειδωτικού για όλα τα δείγματα, είτε ως ισοδύναμα L-ασκορβικού οξέος (Akar et al., 2017; Fadda et al., 2014).

6.3.3.1 Διαδικασία

Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, ζυγίζονται 2.50 mg DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη φιάλη προστίθεται διάλυμα μεθανόλης σταδιακά και ανακινείται έντονα. Αφού το DPPH διαλυθεί πλήρως, γίνεται προσθήκη μεθανόλης μέχρι τη χαραγή. Τονίζεται ότι το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται εκ νέου σε κάθε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ώστε να διατηρείται φρέσκο και φυλάσσεται στο σκοτάδι καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα ώστε να μετρηθεί η μεταβολή της απορρόφησης. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αραιώσεις από δείγμα αρχικής συγκέντρωσης C_0 : $0.8C_0$, $0.6C_0$, $0.4C_0$, $0.2C_0$ και σε ορισμένες περιπτώσεις $0.1C_0$ και $0.05C_0$.

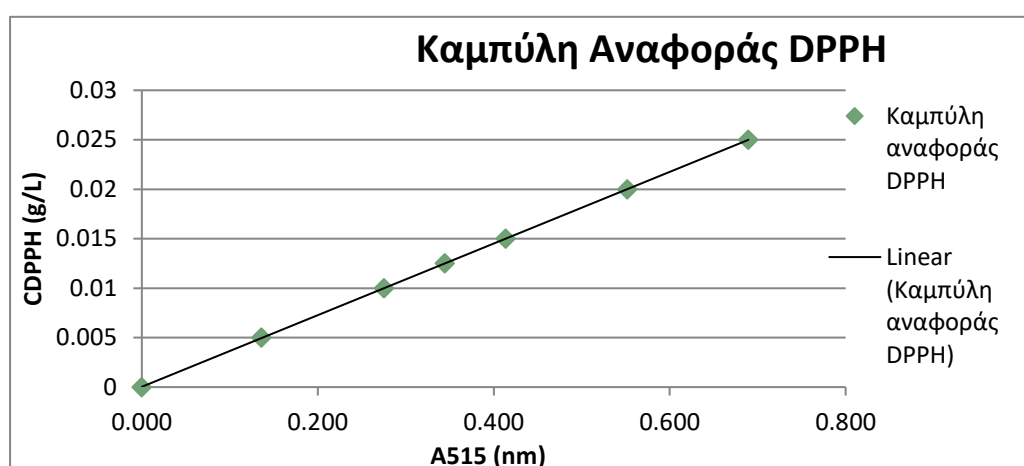
Αναμιγνύονται 3.9mL του διαλύματος DPPH με 0.1mL του εκάστοτε δείγματος και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώζονται για $t=30\text{min}$, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στο UV-Vis, σε $\lambda_{\text{max}}=515\text{nm}$. (Brand-Williams et al., 1995).

6.3.3.2 Καμπύλη αναφοράς αντιοξειδωτικών

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίστηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH, η οποία δείχνει την επίδραση της συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου DPPH στην απορρόφηση. Το αρχικό διάλυμα DPPH που παρασκευάστηκε είναι συγκέντρωσης $C_0=0.025\text{ g/L}$. Οι συγκεντρώσεις των αραιώσεων και τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης φαίνονται στην συνέχεια.

Πίνακας 6-8. Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του DPPH

CDPPH (g/L)	A515 (M.O.) (nm)
0,005	0,136
0,01	0,276
0,0125	0,345
0,015	0,414
0,02	0,552
0,025	0,690



Διάγραμμα 6-3 Καμπύλη αναφοράς DPPH

Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε προέκυψε η εξίσωση

$$C_{DPPH} = 0.0362 * A_{515} + 3E - 05 \mu\epsilon R^2 = 1.$$

6.3.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης γίνεται με τη μέθοδο GOD/PAP με χρήση ειδικού εμπορικού διαγνωστικού σκευάσματος (kit). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μετατροπή της γλυκόζης μέσω της δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης. Παρουσία του ενζύμου γλυκόζο οξειδάση (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD). Το προϊόν που παράγεται εμφανίζει ερυθρό χρώμα και έχει $\lambda_{max}=510$ nm.

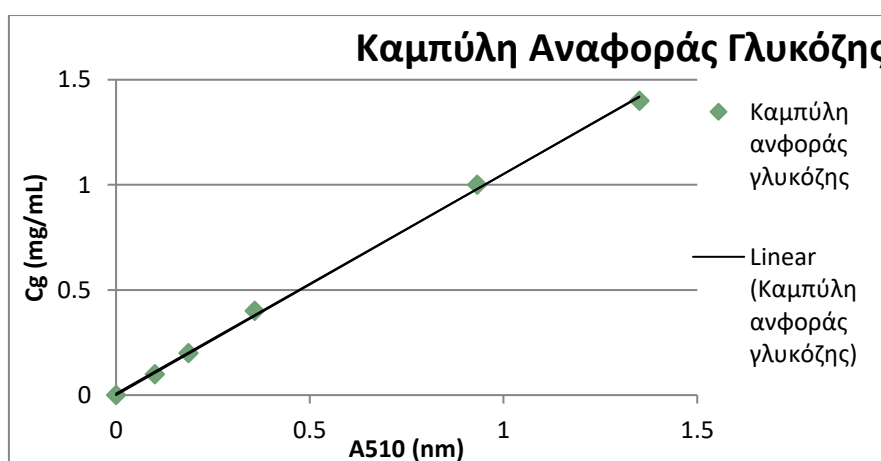
Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται:

- 10 μ L δείγματος
- 240 μ L kit σακχάρου GOD/PAP

Τα διαλύματα αυτά προετοιμάζονται σε microplate και επωάζονται στους 37 °C για 15 λεπτά. Η απορρόφηση τους μετρείται στα 510 nm.

Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται ως πρότυπο, διάλυμα γλυκόζης. Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς γίνεται με όμοιο τρόπο με την καμπύλη αναφοράς των ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών. Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα και ισούται με

$$C_{gl} = 1.0441 * A_{510} + 0.0073 \mu\epsilon R^2 = 0.9991$$



Διάγραμμα 6-4. Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης

6.3.5 Προσδιορισμός ολικών αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των ολικών αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο DNS (3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος), σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιούνται:

- 250 μ L του εκάστοτε δείγματος
- 250 μ L DNS

Τα διαλύματα αυτά τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 λεπτά και ακολουθεί προσθήκη 2 mL H_2O . Τέλος τα διαλύματα φωτομετρούνται σε $\lambda_{max}=540$ nm. Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθεί την ίδια μέθοδο και, όπως και στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γλυκόζης, ως πρότυπο διάλυμα γλυκόζης. Έτσι προκύπτει η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης είναι ίση με $C_g = 1,4838 * A_{540}$ ($R^2 = 0,9950$).

6.4 Προσδιορισμός βασικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα

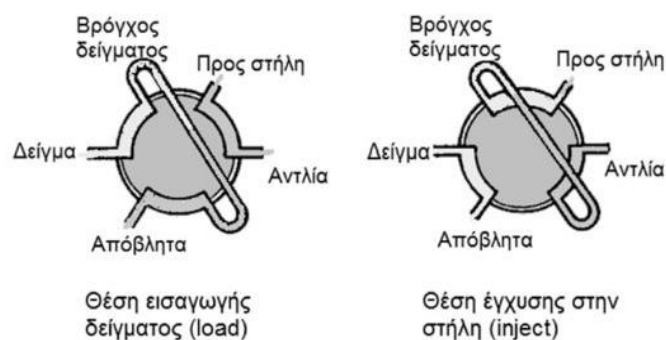
Ο προσδιορισμός της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης, της λιγνίνης αλλά και της υγρασίας στα δείγματα του τσαγιού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (NREL/TP-510-42618). Σύμφωνα με αυτό υδατικό διάλυμα 5% w/v του προς εξέταση τσαγιού εκχυλίζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία 50 °C. Μετά το πέρας της εκχύλισης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό, σε προζυγισμένο ηθμό. Το στερεό υπόλειμμα τοποθετείται στο φούρνο ξήρανσης στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Έπειτα, μεταφέρεται σε ξηραντήρα (με silica gel) για τουλάχιστον 30 λεπτά προκειμένου να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να επαναπροσλάβει επιπλέον υγρασία. Τέλος, καταγράφεται το βάρος ηθμού μαζί με το ξηρό πλέον δείγμα, και υπολογίζεται η υγρασία του δείγματος.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται όξινη υδρόλυση 300 mg ξηρού στερεού υπολείμματος με 3 mL διαλύματος 72% θειικού οξέος για 60 λεπτά στους 30°C. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού το διάλυμα αραιώνεται με 84 mL απιονισμένο νερό και επωάζεται σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 60 λεπτά. Το διάλυμα διηθείται και λαμβάνεται μικρή ποσότητα της υγρής φάσης η οποία φωτομετρείται σε $\lambda_{max}=205$ nm. Η υπόλοιπη ποσότητα της υγρής φάσης εξουδετερώνεται με ποσότητα $CaCO_3$ μέχρι pH=5.5-6.0 και φυγοκεντρείται για 10 min στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο οδηγείται προς ανάλυση με χρήση του kit για προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης και προσδιορισμό ολικών αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS (Sluiter et al., 2008).

6.5 Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια διαχωριστική τεχνική κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων, οργανικών και ανόργανων. Ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχεται από το φάσμα μαζών της. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό καθώς η μορφή του φάσματος μαζών μιας ένωσης, κάτω από αυστηρές συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της ένωσης αυτής και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της (Skoog et al., 2007).

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με έγχυση μέσα από φιλτράκι Nylon Valuprep, διαμέτρου 0.45 μm , με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων στερεών υπολειμμάτων τσαγιού μεγαλύτερης διαμέτρου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση τους με χρήση υγρού χρωματογράφου, συζευγμένου με φασματομέτρο μάζας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος VARIAN 212-LC. Η εισαγωγή των επιθυμητών δειγμάτων έγινε μέσω βαλβίδας 2 θέσεων-6 οπών.



Εικόνα 6-6 Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (6 οπών - 2 θέσεων)

Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα μίγμα νερού με 1 ppm φορμικό οξύ (A) και ακετονουτριλίου (B) μεταβαλλόμενης σύστασης. Η παροχή των διαλυτών ήταν 1 mL/min με αρχική σύσταση 90% A και 10% B, η οποία μεταβαλλόταν σταδιακά έτσι ώστε σε χρόνο 20 min η σύσταση να είναι 70% A και 30% B ενώ η τελική σύσταση, μετά το πέρας της ανάλυσης $t=40$ min, να είναι 10% A και 90% B. Ο χρόνος ανάλυσης κάθε δείγματος ήταν 40 λεπτά. Η τεχνική ιονισμού που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση των δειγμάτων είναι αρνητικός και θετικός χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI negative positive). Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με χρωματογραφική στήλη HYPERSIL BDS C18 5 μm διαστάσεων 250x4.6 mm. Για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε Mass Spectrometer

Varian 500 με παγίδα ιόντων (Ion Trap). Τονίζεται, ακόμη, ότι αναλύθηκαν κάποιες πρότυπες ενώσεις με σκοπό την ταυτοποίηση ενώσεων που περιείχαν τα προς ανάλυση δείγματα.

6.6 Φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) & (ICP-OES)

Η φασματομετρία μαζών ατομικά συζευγμένου πλάσματος είναι μια τεχνική στοιχειακής ανάλυσης. Βρίσκει ευρεία εφαρμογή λόγω των επιτυγχανόμενων χαμηλών ορίων ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία, του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας και της σχετικά καλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας.

Για την ατμοποίηση και τον ιοντισμό χρησιμοποιείται πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP). Η λειτουργία του οργάνου στηρίζεται στην παραγωγή θετικών μεταλλικών ιόντων από έναν πυρσό συμβατικού τύπου. Η εισαγωγή του δείγματος επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μια διαφορικής αντλίας που είναι συνδεδεμένη με το φασματόμετρο μαζών. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το 7700 Series ICP-MS της Agilent Technologies. Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμών των στοιχείων του δείγματος. Χρησιμοποιείται η μέθοδος *no gas* (αντί του Ηλίου (He) και ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με καμπύλες βαθμονόμησης από 1-50 ppb, ενώ χρησιμοποιούνται *super pure* οξέα (HNO₃). Οι μάζες που μετρήθηκαν είναι οι εξής: σκάνδιο ⁴⁵Sc, ύτριο ⁸⁹Y, λανθάνιο ¹³⁹La, δημήτριο ¹⁴⁰Ce, πρασινοδύμιο ¹⁴¹Pr, νεοδύμιο ¹⁴²Nd, σαμάριο ¹⁴⁷Sm, ευρώπιο ¹⁵³Eu, γαδολίνιο ¹⁵⁷Gd, τέρβιο ¹⁵⁹Tb, δυσπρόσιο ¹⁶³Dy, όλμιο ¹⁶⁵Ho, έρβιο ¹⁶⁶Er, θούλιο ¹⁶⁹Tm, υπτέρβιο ¹⁷²Yb, λουτήτιο ¹⁷⁵Lu, θόριο ²³²Th και ουράνιο ²³⁸U.

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η απλούστερη και ευκολότερη ερμηνεία των φασμάτων σε αντίθεση με τα οπτικά φάσματα. Όμως είναι πιθανό να προκύψουν και φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις, όταν ένα ιοντικό σωματίδιο έχει ακριβώς τον ίδιο λόγο *m/z* με το ιόν του αναλύτη.

Η φασματομετρία οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος αργού (ICP-OES) είναι και αυτή μια τεχνική στοιχειακής ανάλυσης. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το 7000DV της PERKIN ELMER. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ακόλουθων μετάλλων στις εξής μάζες: ψευδάργυρος Zn 213,857, σίδηρος Fe 238,204, χαλκός Cu 324,752 και μαγγάνιο Mn 257,610.

Για τον προσδιορισμό των σπάνιων γαιών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ICP/MS έναντι της ICP-OES, καθώς τα όρια ανίχνευσης της πρώτης είναι έως και τρεις τάξεις μεγέθους ανώτερα από αυτά της ICP-OES. Οι μετρήσεις, και για τις δύο τεχνικές, πραγματοποιήθηκαν σε τρία δείγματα του κάθε είδους τσαγιού με τρεις επαναλήψεις στο καθένα.

Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει τη χώνευση του με μικροκύματα (microwave digestion). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το όργανο Microwave Digestion System της MILESTONE. Ποσότητα 0,5g από κάθε είδος τσαγιού ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε ειδικά αυτόκλειστα Teflon δοχεία στα οποία προστέθηκαν 6 mL νιτρικού οξέος, HNO_3 65% και 2 mL υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 30%. Επιπλέον ετοιμάστηκε ένα τυφλό δείγμα, το οποίο δεν περιείχε τσάι. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει άνοδο της θερμοκρασίας έως τους 200°C στα 15 πρώτα λεπτά και παραμονή στη θερμοκρασία αυτή για άλλα 15 λεπτά.



Αποτελέσματα και Συζήτηση

7 Προσδιορισμός βασικών υδατανθράκων και λιγνίνης στη βιομάζα

Στο δείγμα *Sideritis scardica* πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου αλλά και της υγρασίας σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL (NREL/TP-510-42618), με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 6. Αρχικά υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας του, το οποίο ισούται με το $6,68\% \pm 0,07$ του βάρους του. Το ποσοστό της κυτταρίνης βρέθηκε ίσο με $14,53\% \pm 0,55$ επί του ξηρού βάρους, ενώ το ποσοστό ημικυτταρίνης ισούται με $45,21\% \pm 0,13$ επί του ξηρού βάρους. Το σύνολο της λιγνίνης του δείγματος αποτελεί το $25,89\% \pm 2,5$ επί του ξηρού βάρους, με την όξινη διαλυτή να ανέρχεται στο $3,97\% \pm 0,18$ ενώ την όξινη αδιάλυτη στο $21,93\% \pm 2,33$. Το ανόργανο υπόλειμμα τέφρας υπολογίστηκε ίσο με $4,6\%$.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία Martinez T. (2000), στο είδος *Sideritis glacialis* βρέθηκε το ποσοστό κυτταρίνης ίσο με $12,5\%$ και το συνολικό ποσοστό λιγνίνης ίσο με 26% . Επιπλέον σύμφωνα με τους Uzun et al. (2010), σε απόβλητο τσαγιού το υπόλειμμα τέφρας υπολογίστηκε ίσο με $3,88\%$, η υγρασία του δείγματος $7,26\%$ ενώ το ποσοστό λιγνίνης ίσο με $25,68\%$. Μελέτη επίσης σε απόβλητο τσαγιού από τους Yagmur et al. (2008), έδειξε τέφρα $4,4\%$, υγρασία $5,1\%$, κυτταρίνη $17,5\%$ και ημικυτταρίνη $41,3\%$ επί ξηρού βάρους. Οι τιμές αυτές είναι κοντά στις τιμές που προσδιορίστηκαν κατά την παρούσα μελέτη.

8 Μελέτη βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων

Σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν υπολογίστηκε η απώλεια βάρους του στερεού, μετά την εκχύλιση, το περιεχόμενο τους σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά όπως επίσης και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

8.1 Συμβατική εκχύλιση

8.1.1 Επίδραση σύστασης διαλύτη

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης του χρησιμοποιούμενου διαλύτη σε συμβατική εκχύλιση του φυτού *Sideritis scardica* για 72h. Συγκεκριμένα οι αναλογίες διαλυτών, αιθανόλης (EtOH) και νερού (H₂O), που χρησιμοποιήθηκαν στα προς εξέταση διαλύματα ήταν: 100% EtOH, 20% EtOH, 40% EtOH, 60% EtOH, 80% και 0% EtOH.

Απώλεια Βάρους

Στον πίνακα 8-1 παρουσιάζεται η απώλεια βάρους των δειγμάτων μετά το πέρας της εκχύλισης.

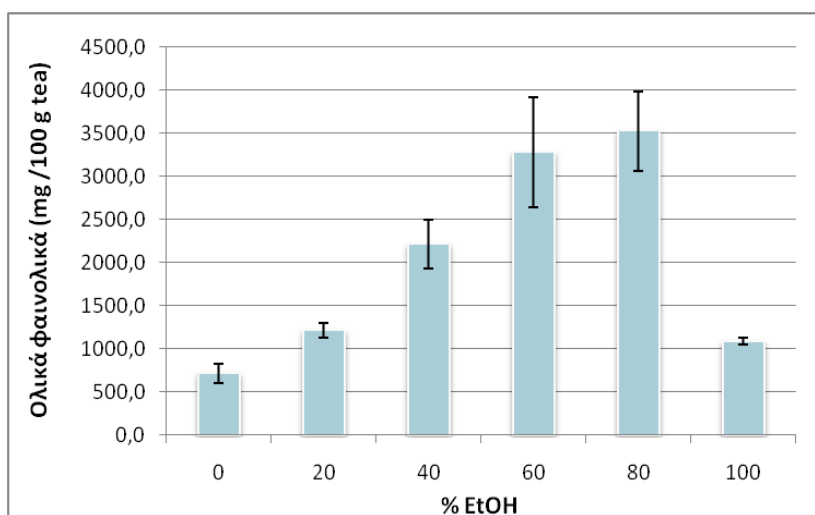
Πίνακας 8-1. Απώλεια βάρους των δειγμάτων διαφορετικής σύστασης διαλύτη

%EtOH	% Απώλεια βάρους
0	26,6
20	26,4
40	28,6
60	29,3
80	27,2
100	16,6

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα η % απώλεια βάρους παρουσιάζει μικρή αύξηση καθώς αυξάνεται το ποσοστό αιθανόλης στο διαλύτη, με μέγιστη τιμή 29,3% για διάλυμα που περιέχει 60% EtOH. Μετά από την τιμή αυτή η απώλεια βάρους μειώνεται.

Ολικά φαινολικά

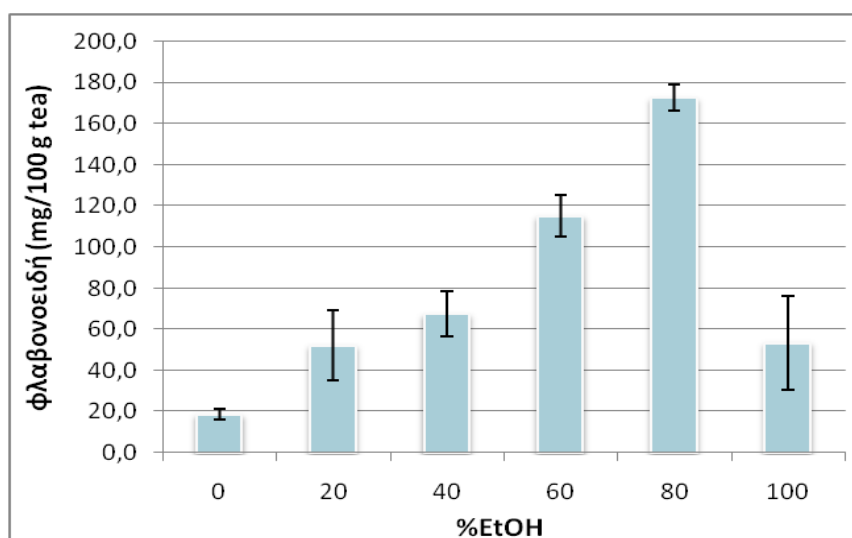
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με χρήση της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέως σε mg/L και με αναγωγή τους σε mg/100 g τσαγιού με τη βοήθεια της εξίσωσης (1) δίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα. Σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα μεγαλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών εντοπίζεται στο δείγμα με 80% EtOH και είναι ίση με $3524,4 \pm 461$ mg ολικών φαινολικών/ 100 g τσαγιού. Ακολουθεί το δείγμα που περιέχει 60% EtOH με $3328,4 \pm 550$ mg ολικών φαινολικών/ 100 g τσαγιού.



Διάγραμμα 8-1. Περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα διαφορετικής σύστασης διαλύτη

Φλαβονοειδή

Αντίστοιχα το περιεχόμενο των δειγμάτων σε ολικά φλαβονοειδή που προκύπτει με χρήση της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης σε g/L και αναγωγή σε mg/100 g τσαγιού με τη βοήθεια της εξίσωσης (2) δίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα (8-2).



Διάγραμμα 8-2. Περιεχόμενο φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα διαφορετικής σύστασης διαλύτη

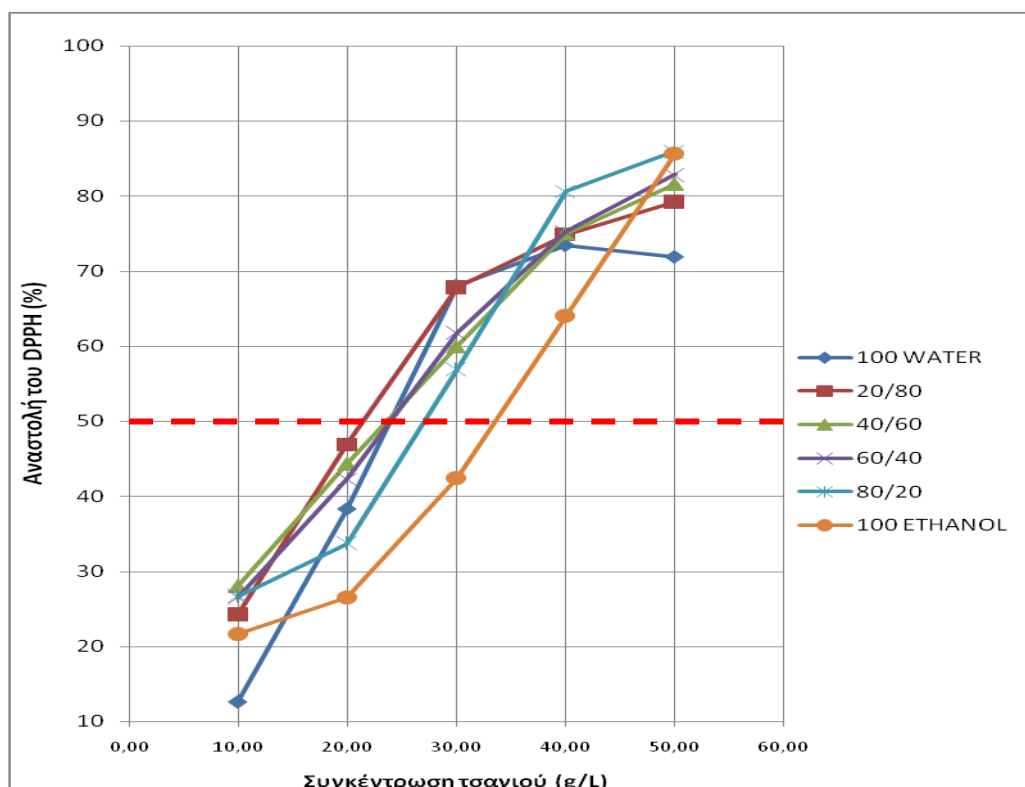
Όμοια με τα ολικά φαινολικά συστατικά, τα ολικά φλαβονοειδή εντοπίζονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο διάλυμα που περιέχει 80% EtOH και ακολουθεί αυτό με 60% EtOH. Συγκεκριμένα τα διαλύματα περιέχουν $172,6 \pm 6,3$ και $121,7 \pm 3,1$ mg φλαβονοειδή/ 100 g τσαγιού αντίστοιχα.

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{Αναστολή DPPH} = \left(\frac{A_{\text{αρχική}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{αρχική}}} \right) \cdot 100$$

Όπου $A_{\text{αρχική}}$ είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.



Διάγραμμα 8-3 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-2) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Πίνακας 8-2 Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων

% EtOH στο διάλυμα	IC ₅₀ (g/L)
0	23,9
20	21,5
40	23,6
60	23,4
80	27,0
100	33,5

Συμφώνα με τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί διαλύτης σύστασης 60% EtOH και 40% H₂O στα πειράματα που ακολούθησαν. Η επιλογή αυτή στηρίζεται στην υψηλή ποσότητα ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών, στη μεγαλύτερη απώλεια βάρους και στην καλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται και για 80% EtOH, όμως μειονεκτεί έναντι της επιλεχθείσας σύστασης λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού οργανικού διαλύτη. Η χρήση μικρότερης ποσότητας οργανικού διαλύτη καθιστά την εκχύλιση φιλικότερη προς το περιβάλλον και μειώνει το κόστος της.

8.1.2 Επίδραση συγκέντρωσης τσαγιού

Ο επόμενος παράγοντας που εξετάστηκε είναι η συγκέντρωση του τσαγιού. Δείγματα *Sideritis scardica* συγκέντρωσης 1%, 2%, 4% και 7% εκχυλίστηκαν συμβατικά για 24 ώρες και προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Απώλεια Βάρους

Στον πίνακα 7-3 παρουσιάζεται η απώλεια βάρους των δειγμάτων μετά την ξήρανση.

Πίνακας 8-3. Απώλεια βάρους των δειγμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης τσαγιού.

Συγκέντρωση <i>Sideritis scardica</i>	% Απώλεια βάρους
1%	33,5 ± 1,3

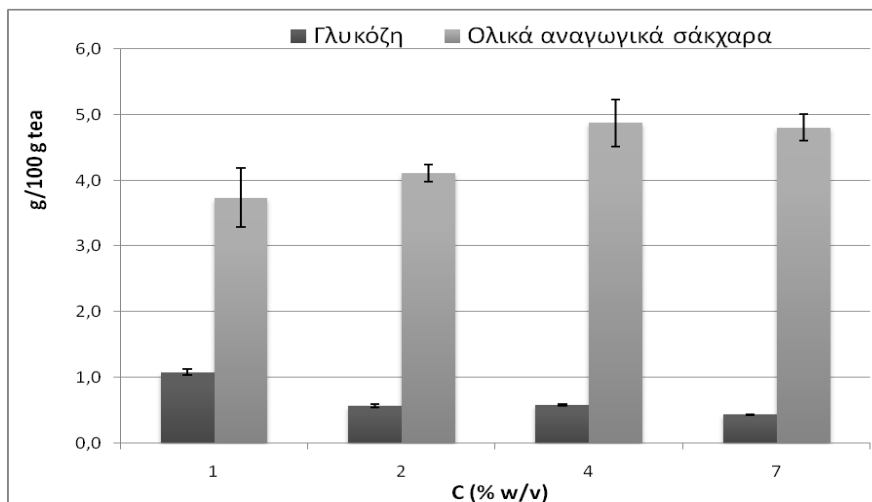
2%	30,1 ± 1,4
4%	28,5 ± 0,1
7%	26,3 ± 1,0

Είναι φανερό ότι αύξηση της συγκέντρωσης του τσαγιού στο προς εκχύλιση δείγμα προκαλεί μείωση της απώλειας βάρους.

Γλυκόζη και Ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-4.

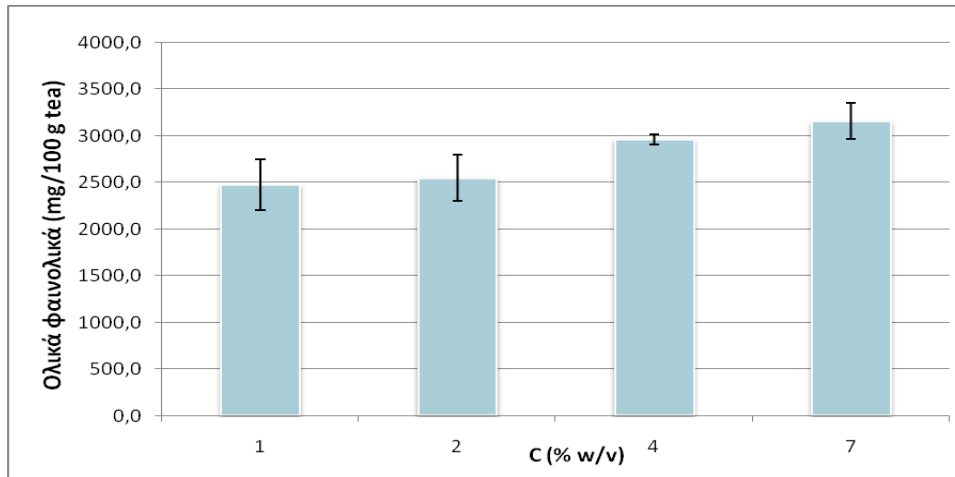
Τα εκχυλίσματα δεν διαφέρουν ιδιαίτερα ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά αναγωγικά σάκχαρα. Αντιθέτως όσον αφορά τη γλυκόζη, στο εκχύλισμα συγκέντρωσης 1% η περιεχόμενη γλυκόζη είναι ίση με $1,1 \pm 0,04$ g/ 100 g τσαγιού, σχεδόν διπλάσια από την ποσότητα που υπάρχει στα υπόλοιπα εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 8-4 Περιεχόμενο γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης τσαγιού.

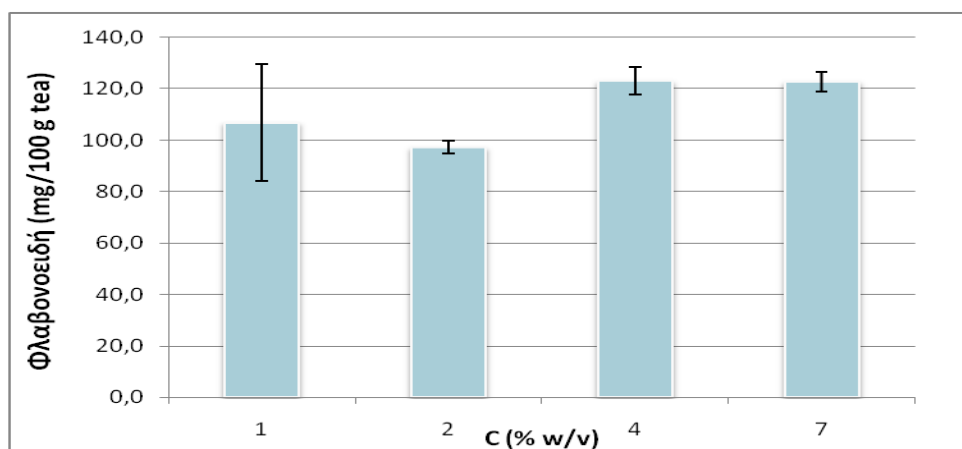
Ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή

Στα Διαγράμματα 8-5 και 8-6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 8-5 Περιεχόμενο ολικών φαινολικών σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης τσαγιού.

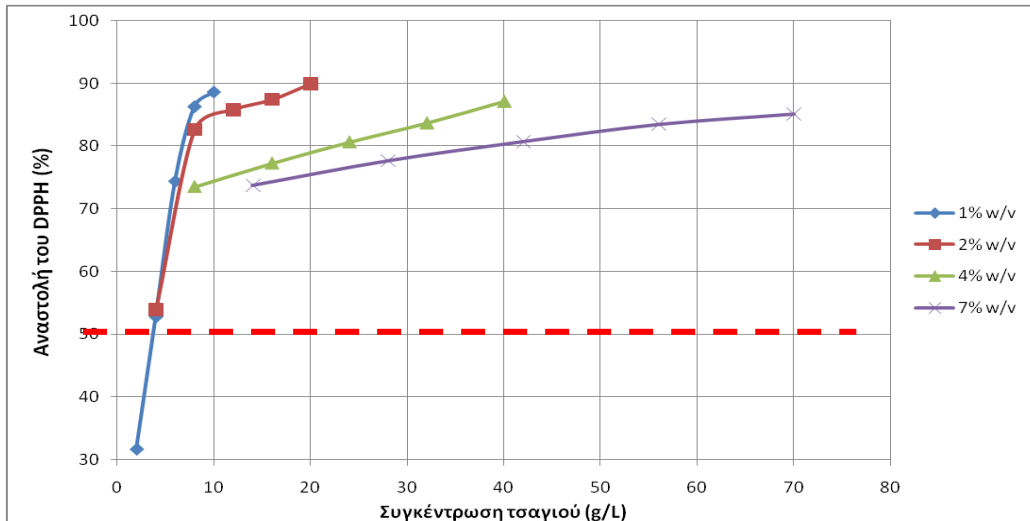
Παρατηρείται ότι, για χαμηλές συγκεντρώσεις τσαγιού στο προς εκχύλιση δείγμα, αύξηση τους προκαλεί μικρή αύξηση στα ανακτώμενα ολικά φαινολικά και флаβονοειδή συστατικά. Όμως μεταξύ των δειγμάτων που περιέχουν 4% και 7% εντοπίζονται πολύ μικρές διαφορές ή ακόμα και καμία, στην περίπτωση των флаβονοειδών με $123,1 \pm 5,2$ και $122,8 \pm 3,8$ mg флаβονοειδή/ 100 g τσαγιού αντίστοιχα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη φαινομένων μεταφοράς μάζας λόγω της υψηλής περιεκτικότητας στερεού στο δείγμα.



Διάγραμμα 8-6. Περιεχόμενο флаβονοειδών σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης τσαγιού.

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, όμοια με την παράγραφο 8.1.1, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH.



Διάγραμμα 8-7 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Από το Διάγραμμα 8-7 παρατηρείται σε μικρότερη συγκέντρωση τσαγιού στο εκχυλιζόμενο δείγμα η αναστολή του DPPH πραγματοποιείται πιο απότομα απ'ότι σε υψηλότερες τιμές.

Συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση του τσαγιού στο προς εκχύλιση δείγμα έχει μικρή επίδραση στα βιοδραστικά συστατικά που ανακτώνται. Μάλιστα οι υψηλές συγκεντρώσεις στερεού στα εκχυλιζόμενα δείγματα, δυσχεραίνουν την πλήρη διαβροχή του τσαγιού από τον διαλύτη και είναι πιθανό να προκαλέσουν παρεμπόδιση των φαινομένων μεταφοράς εντός του διαλύματος.

8.1.3 Επίδραση χρόνου εκχύλισης

Δείγματα συγκέντρωσης 5% του φυτού *Sideritis scardica* εκχυλίστηκαν συμβατικά για 24, 48 και 72 ώρες έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου εκχύλισης κατά την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών.

Απώλεια Βάρους

Η απώλεια βάρους των δειγμάτων μετά την ξήρανση τους συναρτήσε του επιλεγμένου χρόνου εκχύλισης δίνεται στον πίνακα 8-4.

Πίνακας 8-4. Απώλεια βάρους σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης

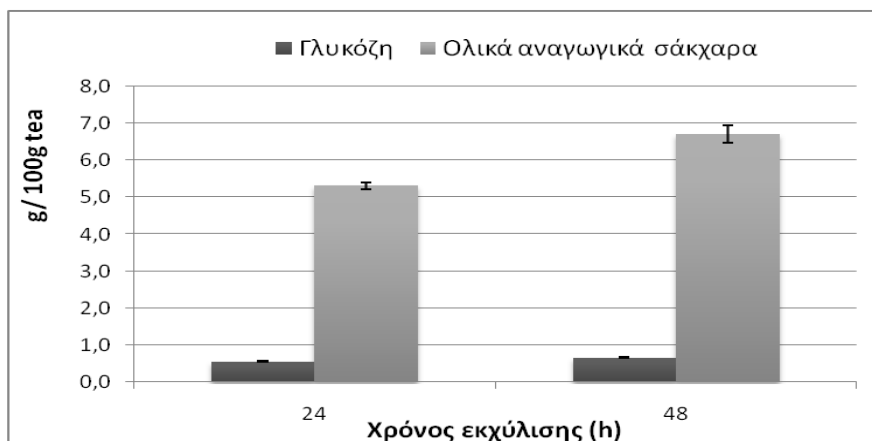
Χρόνος εκχύλισης (h)	% Απώλεια βάρους
24	30,6 ± 0,1

48	30,2 ± 0,2
72	29,3 ± 0,2

Παρατηρείται πως η μεταβολή του χρόνου εκχύλισης δεν έχει μεγάλη επίδραση στην απώλεια βάρους του δείγματος.

Γλυκόζη και Ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-8.

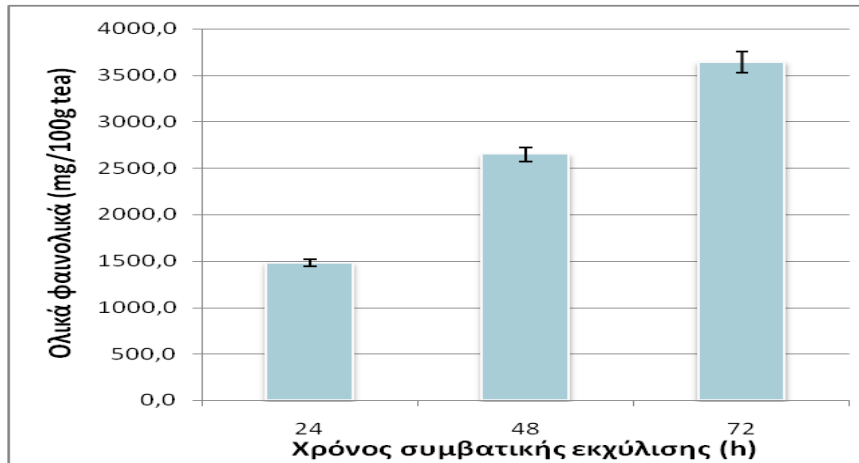


Διάγραμμα 8-8 Περιεχόμενο γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

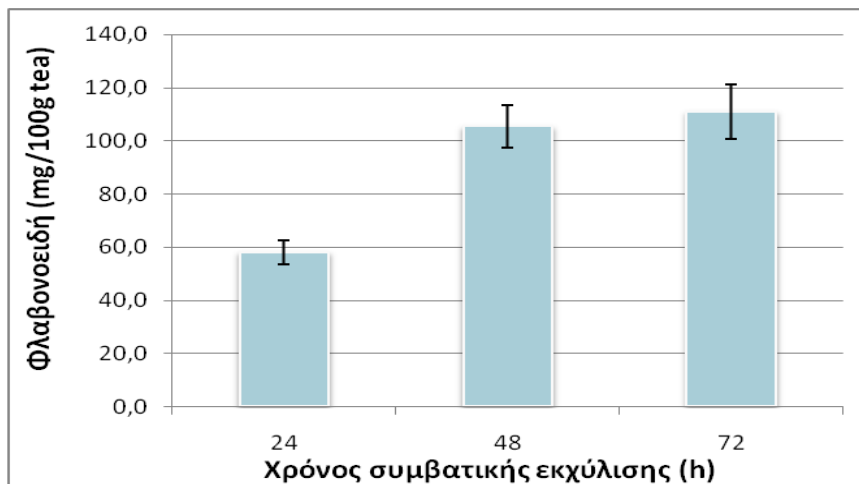
Στα δείγματα των 72 ωρών εκχύλισης δεν πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων. Μεταξύ 24 και 48 ωρών το περιεχόμενο σε γλυκόζη παραμένει σχεδόν σταθερό ενώ εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στο περιεχόμενο των ολικών σακχάρων.

Ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή

Όπως παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 8-9 και 8-10 μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών. Μεταξύ 48 και 72 ωρών ενώ τα ολικά φαινολικά παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση, η συγκέντρωση των φλαβονοειδών παραμένει σχεδόν σταθερή.



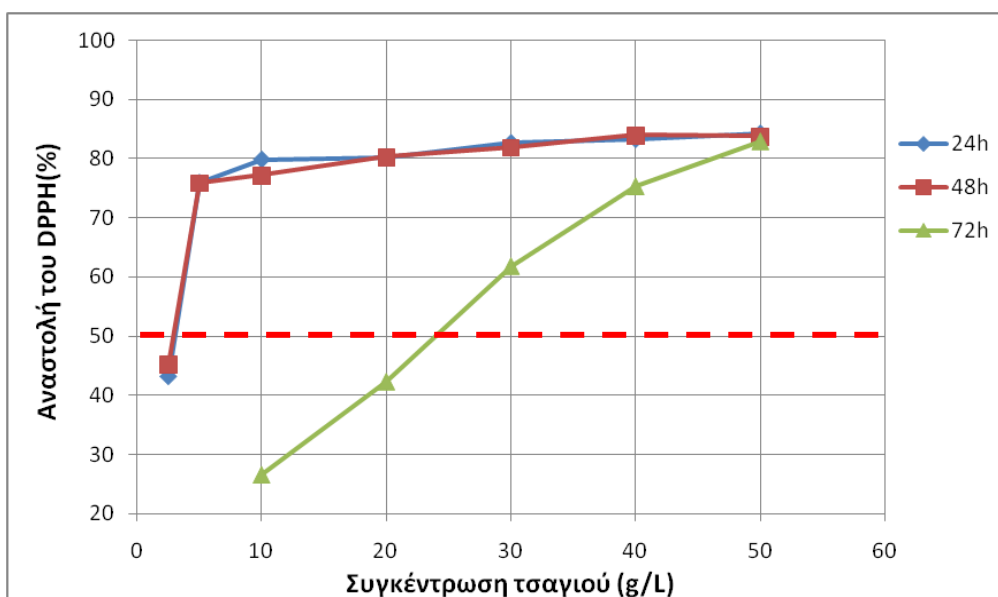
Διάγραμμα 8-9 Περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης



Διάγραμμα 8-10. Περιεχόμενο σε φλαβονοειδή συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Όμοια με την παράγραφο 8.1.1 υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής της δράσης του DPPH. Επιπλέον στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 8-5) παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 8-11 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Πίνακας 8-5 Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

Χρόνος εκχύλισης (h)	IC ₅₀ (g/L)
24	3.0
48	2.9
78	24.0

Εν κατακλείδι αύξηση του χρόνου εκχύλισης προκαλεί αύξηση στο περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή και ολικά αναγωγικά σάκχαρα. Αντιθέτως η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μειώνεται με αύξηση του χρόνου. Η μείωση αυτή ενδεχομένως οφείλεται σε καταστροφή των θερμοευαίσθητων αντιοξειδωτικών συστατικών, που περιέχονται στο φυτό *Sideritis*, όταν τα δείγματα παρέμειναν για περισσότερη ώρα στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση.

8.1.4 Είδος τσαγιού

Μετά τη διεξαγωγή των πειραμάτων που περιγράφηκαν και ανάλυση των αποτελεσμάτων τους, επιλέγονται οι συνθήκες: διαλύτης 60% EtOH, συγκέντρωση τσαγιού 5% και χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, και εκχυλίζονται όλα τα είδη τσαγιού.

Απώλεια Βάρους

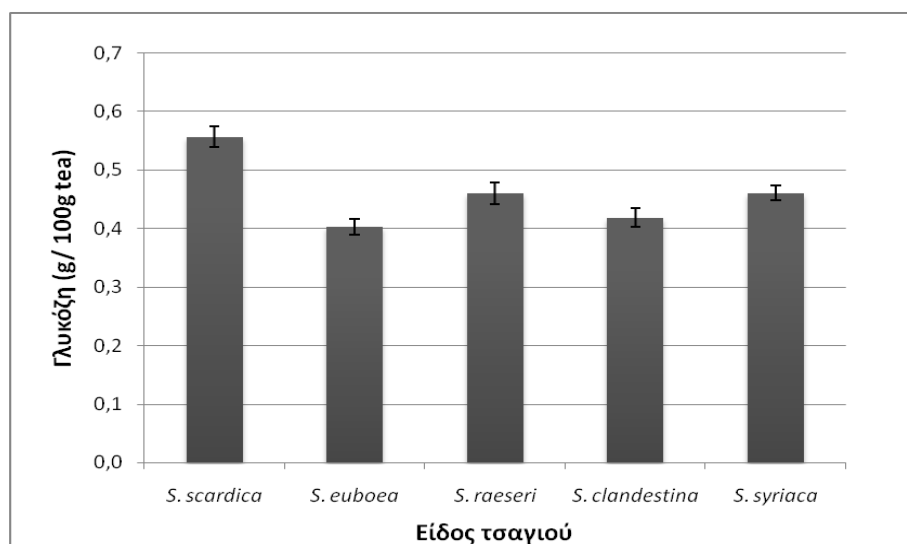
Στον πίνακα 8-6 παρουσιάζεται η απώλεια βάρους των δειγμάτων μετά τη συμβατική εκχύλιση.

Πίνακας 8-6. Απώλεια βάρους για όλα τα είδη τσαγιού

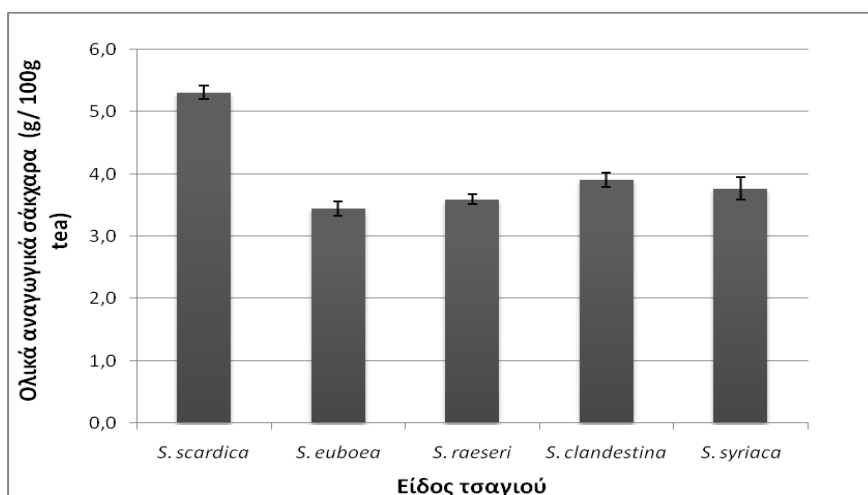
Δείγμα τσαγιού	% Απώλεια βάρους
<i>Sideritis scardica</i>	30,6 ± 0,1
<i>Sideritis euboica</i>	22,5 ± 0,9
<i>Sideritis raeseri</i>	26,5 ± 0,8
<i>Sideritis clandestina</i>	25,8 ± 0,1
<i>Sideritis syriaca</i>	22,6 ± 0,4

Γλυκόζη και ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 8-12 και 8-13.



Διάγραμμα 8-12 Περιεχόμενο γλυκόζης ανά είδος τσαγιού

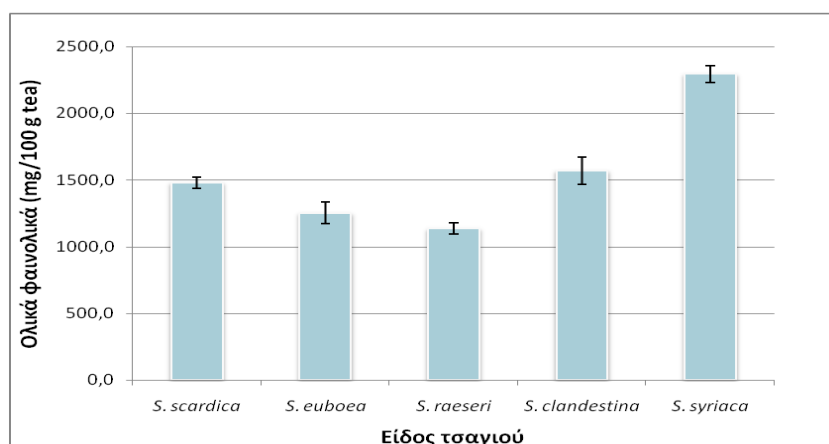


Διάγραμμα 8-13 Περιεχόμενο ολικών αναγωγικών σακχάρων ανά είδος τσαγιού

Μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Sideritis* δεν εντοπίζονται μεγάλες διαφορές σχετικά με το περιεχόμενό τους σε γλυκόζη και ολικά αναγωγικά σάκχαρα. Το είδος *Sideritis scardica* παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη.

Ολικά φαινολικά

Το περιεχόμενο των δειγμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-14.

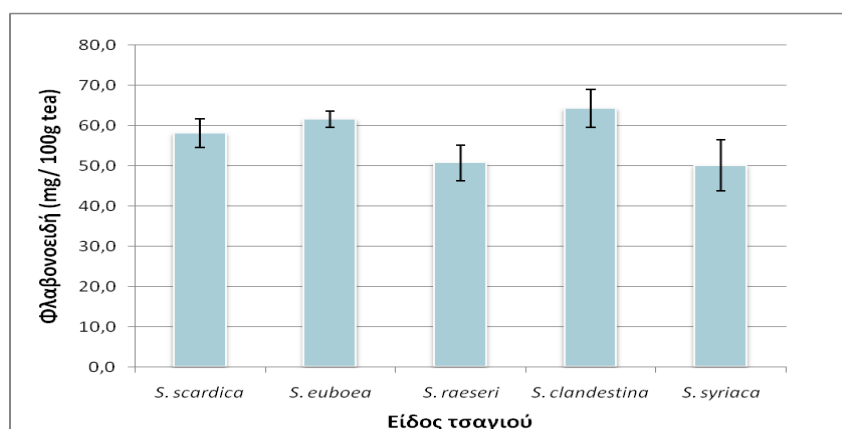


Διάγραμμα 8-14. Περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά όλων των ειδών τσαγιού

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, στο είδος *Sideritis syriaca* και *Sideritis clandestina* εντοπίζεται η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών, ενώ στο *Sideritis raeseri* η χαμηλότερη.

Φλαβονοειδή

Το περιεχόμενο των δειγμάτων σε φλαβονοειδή παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-15

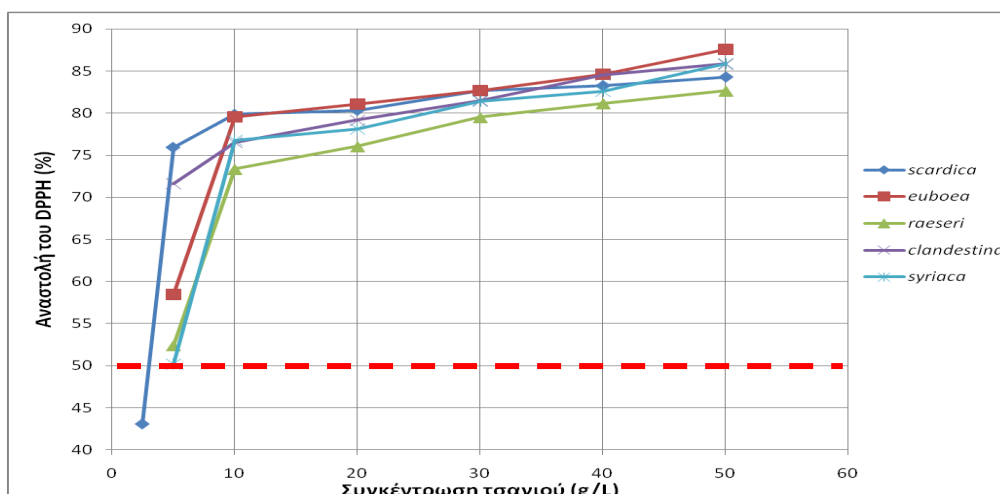


Διάγραμμα 8-15. Περιεχόμενο φλαβονοειδών όλων των ειδών τσαγιού

Όσον αφορά το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών.

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, βάση του υπολογισμού της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 8.1.1



Διάγραμμα 8-16 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 8-16 τα είδη *Sideritis syriaca* και *Sideritis raeseri* έχουν την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ακολουθεί το *Sideritis euboica* και τέλος τα *Sideritis scardica* και *clandestina*.

8.2 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης (Συμβατική και EYE)

8.2.1 Επίδραση ενζυμικού φορτίου Cellic CTec2

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του ενζυμικού φορτίου του σκευάσματος Cellic CTec2, με σκοπό να επιλεχθούν οι τιμές του παράγοντα αυτού που θα χρησιμοποιηθούν κατά τον σχεδιασμό Taguchi. Δείγματα *Sideritis scardica* 2% , εκχυλίζονται υποβοηθούμενα από ένζυμο για 5h και ακολουθεί συμβατική εκχύλιση στους 30°C για 24 ώρες. Επιπλέον εκχυλίζεται υπό τις ίδιες συνθήκες δείγμα απουσία ενζύμου (Blank).

Απώλεια Βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-7.

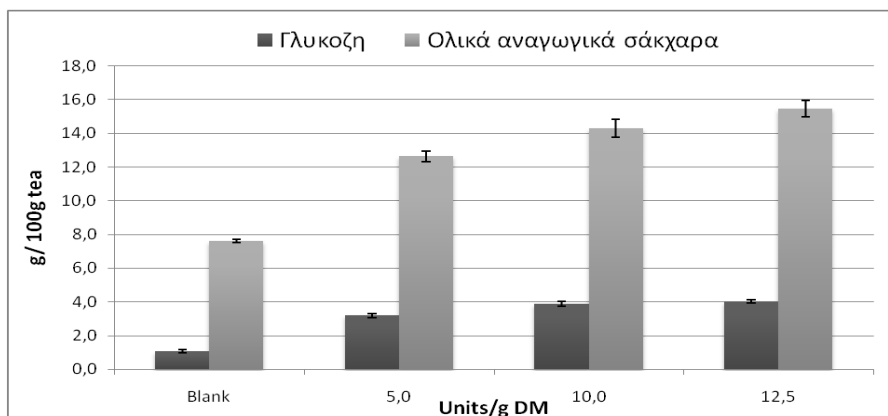
Πίνακας 8-7. Απώλεια βάρους συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Ενζυμικό φορτίο (Units /g DM)	% Απώλεια βάρους
-	27,8 ± 0,7
5,0	34,0 ± 0,4
10,0	35,1 ± 0,8
12,5	36,5 ± 1,9

Με αύξηση του ενζυμικού φορτίου παρατηρείται αύξηση της απώλειας βάρους. Επιπλέον το ποσοστό απώλειας βάρους, ακόμα και για το μικρότερο ενζυμικό φορτίο είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό του είδους *Sideritis scardica* μετά από συμβατική εκχύλιση (30,6 ± 0,1).

Γλυκόζη και Ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-17.

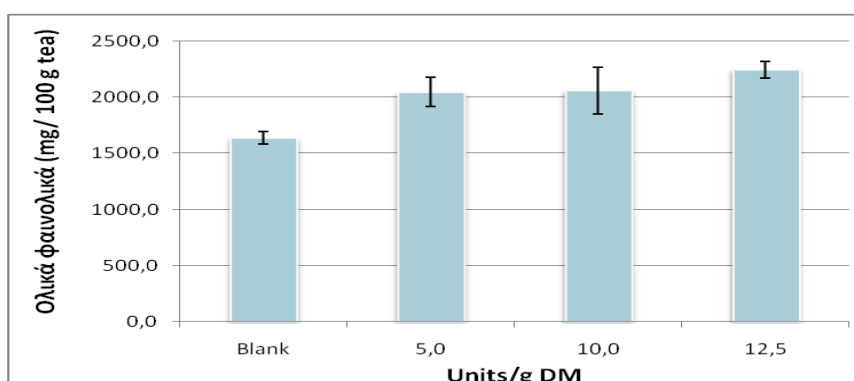


Διάγραμμα 8-17 Περιεχόμενο γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Το τυφλό δείγμα (απουσία ενζύμου) παρουσιάζει πολύ χαμηλότερες τιμές απελευθερούμενης γλυκόζης και ολικών αναγωγικών σακχάρων συγκριτικά με τα δείγματα που περιείχαν ένζυμο. Όμως μεταξύ των υπόλοιπων δειγμάτων η ποσότητα ανακτώμενης γλυκόζης παραμένει σχεδόν σταθερή, ενώ μικρή αύξηση εντοπίζεται για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα όταν αυξάνεται το ενζυμικό φορτίο.

Ολικά φαινολικά

Στο Διάγραμμα 8-18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα.

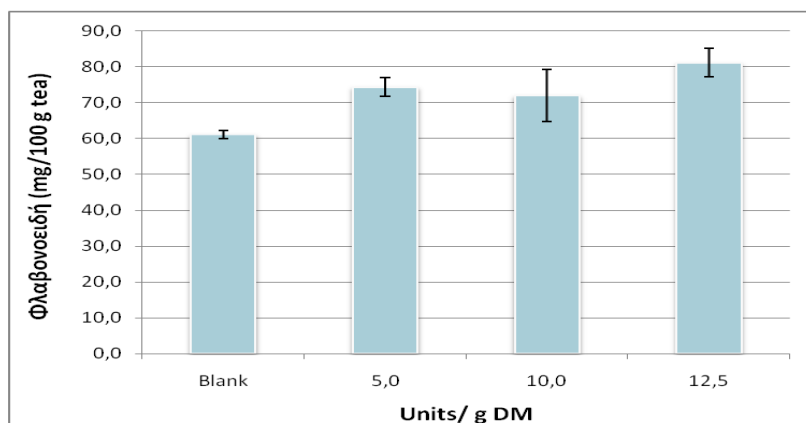


Διάγραμμα 8-18 Περιεχόμενο ολικών φαινολικών συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Αύξηση του ενζυμικού φορτίου στα εκχυλίσματα δεν προκαλεί μεταβολή στο περιεχόμενο των ολικών φαινολικών.

Φλαβονοειδή

Στο Διάγραμμα 8-19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα.

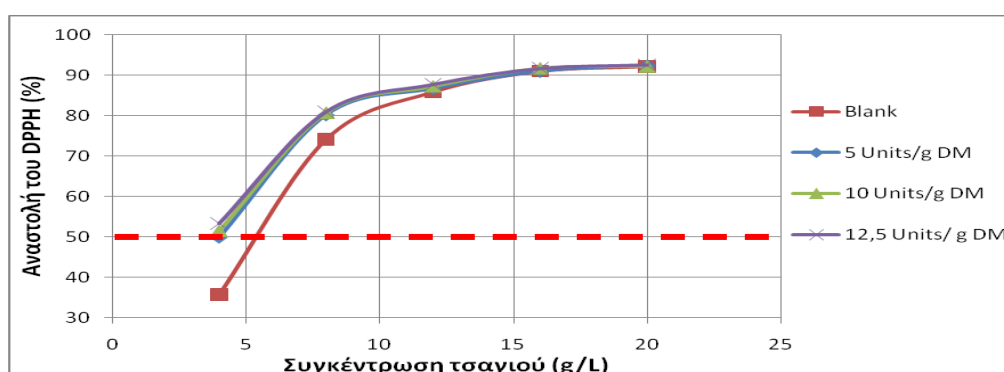


Διάγραμμα 8-19 Περιεχόμενο φλαβονοειδών συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου

Όμοια με τα ολικά φαινολικά συστατικά, αύξηση του ενζυμικού φορτίου στα εκχυλίσματα δεν προκαλεί μεταβολή στο περιεχόμενο φλαβονοειδών. Επιπλέον το δείγμα απουσία ενζύμου παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερο περιεχόμενο φλαβονοειδών σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, υπολογίζεται βάση της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, όμοια με την περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης.



Διάγραμμα 8-20 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-8) παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα.

Πίνακας 8-8 Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC ₅₀ (g/L)
-	5.4
5	4.0
10	3.8
12,5	3.5

Παρατηρείται ότι οι τιμές αυτές του ενζυμικού φορτίου δεν προκαλούν έντονες μεταβολές στα ανακτώμενα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων τσαγιού. Όμως, συγκριτικά με το δείγμα απουσία ενζύμου και με τα αποτελέσματα της συμβατικής εκχύλισης, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται μετά την προκατεργασία με ένζυμο. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέγονται τα όρια του πειραματικού σχεδιασμού Taguchi σε ότι αφορά το ενζυμικό φορτίο (ελάχιστο φορτίο: 2.5 και μέγιστο φορτίο: 7.5 Units/g DM).

8.2.2 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec2

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-9. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

Πίνακας 8-9 Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Cellic CTec2

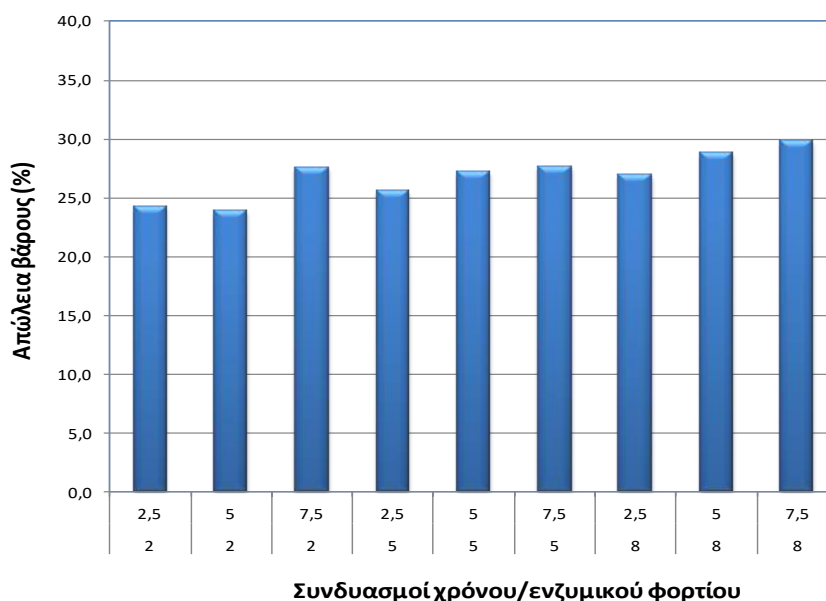
Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5

7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Τα 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)

Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-21, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-10.



Διάγραμμα 8-21 Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-10 Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

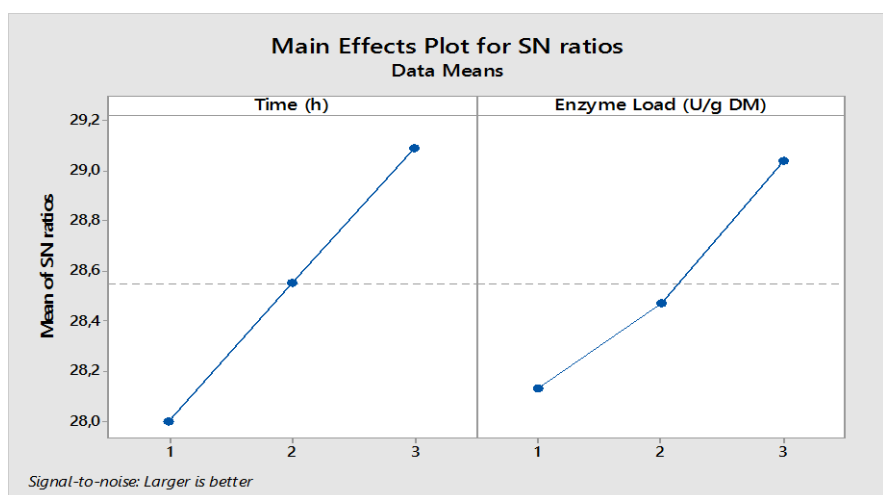
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	26,43 ± 1,9
5	-	26,71 ± 1,6
8	-	26,20 ± 2,0

Στον Πίνακα 8-11 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-11 Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	24,15	27,66
1	2	23,88	27,56
1	3	27,48	28,78
2	1	25,52	28,14
2	2	27,20	28,69
2	3	27,64	28,83
3	1	26,93	28,60
3	2	28,72	29,16
3	3	29,84	29,50

Ανάλογα με τη φύση του κάθε ποιοτικού χαρακτηριστικού ο πειραματιστής μπορεί να επιθυμεί την μεγιστοποίηση του (*larger the better*), την ελαχιστοποίηση του (*smaller the better*) ή όσο γίνεται την μικρότερη απόκλιση του από μια συγκεκριμένη τιμή (*nominal is better*) (παράγραφος 6.1). Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (*Main effect*) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-22 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 8-12 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-22 S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους

Πίνακας 8-12 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απώλεια βάρους

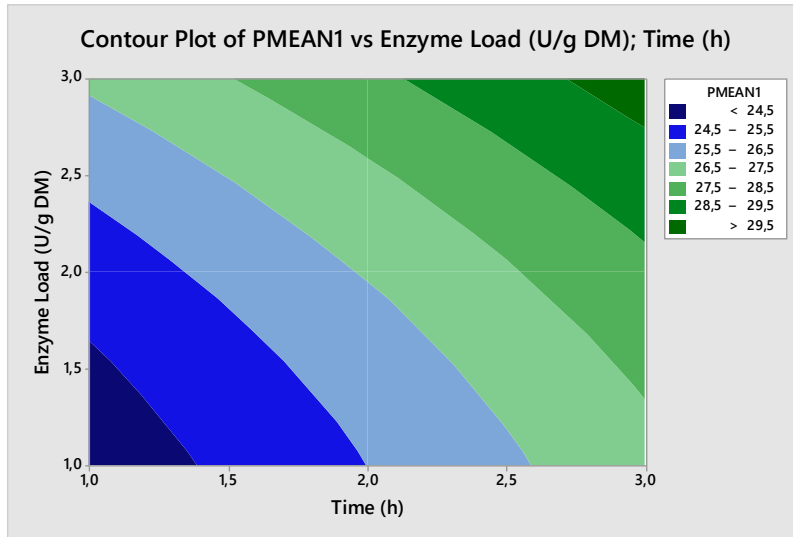
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	28,00	28,13
2	28,55	28,47
3	29,01 ^α	29,44 ^α
(max-min)	1,09	0,97
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N =28,60

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 8-12 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) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απώλειας βάρους είναι 29.99%. 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 8-23).

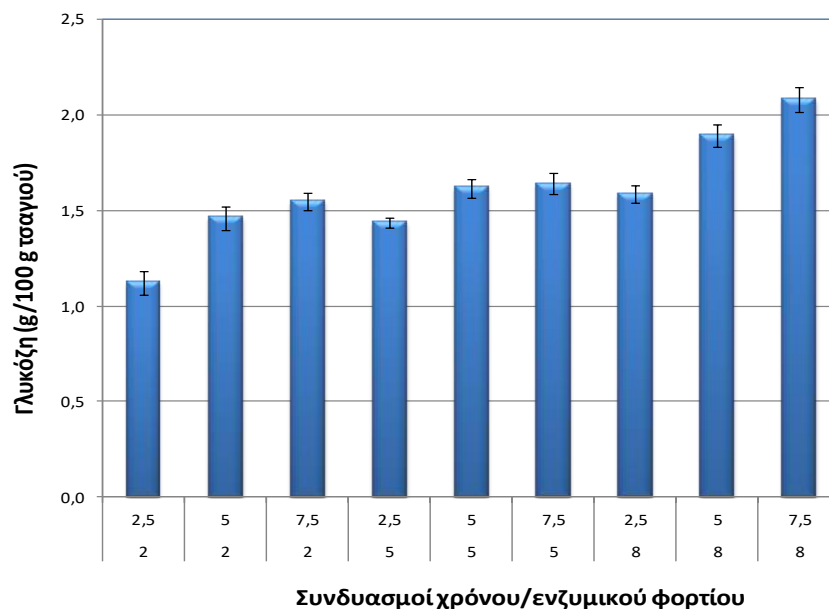


Διάγραμμα 8-23 Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

Γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-24, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-13.



Διάγραμμα 8-24 Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-13 Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

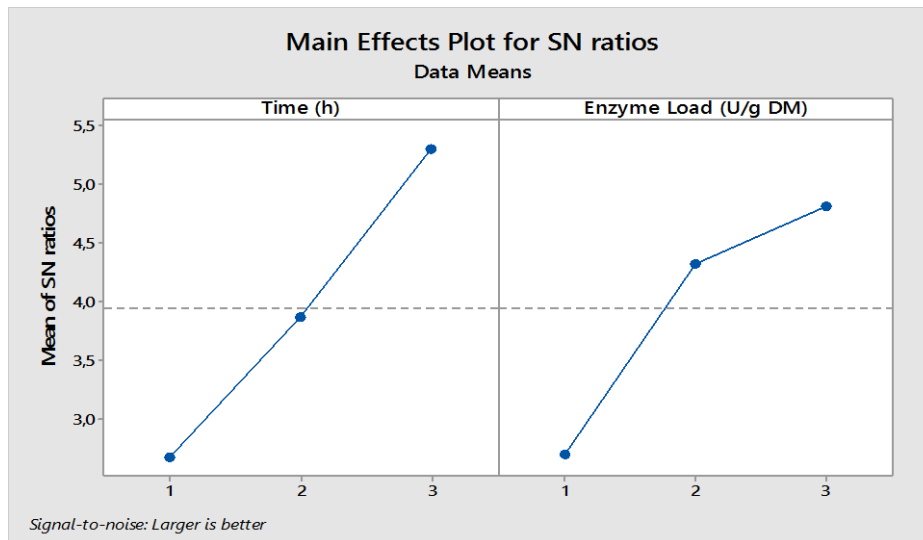
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,85 ± 0,04
5	-	0,75 ± 0,03
8	-	0,83 ± 0,02

Στον Πίνακα 8-14 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-14 Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	1,12	0,97
1	2	1,46	3,27
1	3	1,55	3,79
2	1	1,44	3,15
2	2	1,62	4,16
2	3	1,64	4,29
3	1	1,59	4,00
3	2	1,89	5,53
3	3	2,08	6,35

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-25 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 απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 8-15 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-25 S/N διάγραμμα για την απελευθερούμενη γλυκόζη

Πίνακας 8-15 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απελευθερούμενη γλυκόζη

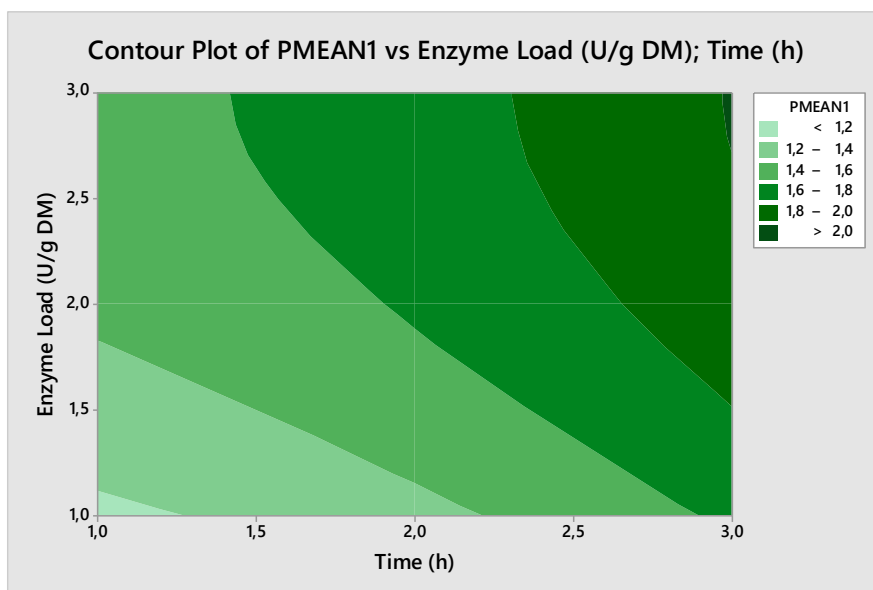
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	2,68	2,70
2	3,86	4,32
3	5,29 ^α	4,81 ^α
(max-min)	2,62	2,10
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 3.94

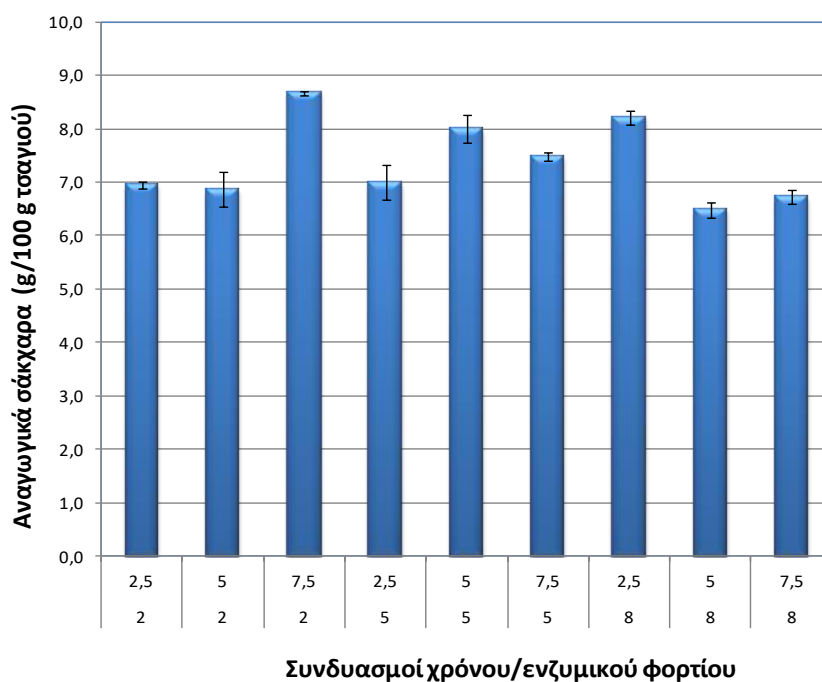
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-16 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 3,3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 2.01 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απελευθερούμενη γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-26).



Διάγραμμα 8-26 Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-27, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-16.



Διάγραμμα 8-27 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-16 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

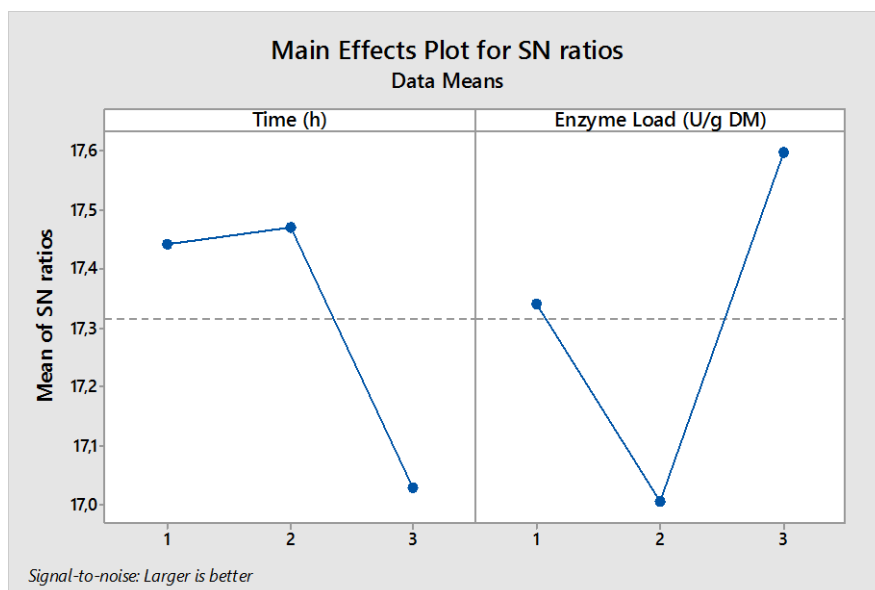
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	6,21 ± 0,8
5	-	5,83 ± 0,5
8	-	5,68 ± 0,3

Στον Πίνακα 8-17 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-17 Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	6,96	16,85
1	2	6,87	16,73
1	3	8,67	18,76
2	1	7,00	16,89
2	2	8,00	18,06
2	3	7,48	17,48
3	1	8,21	18,29
3	2	6,48	16,23
3	3	6,74	16,57

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-28 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 8-18 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-28 S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

Πίνακας 8-18 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

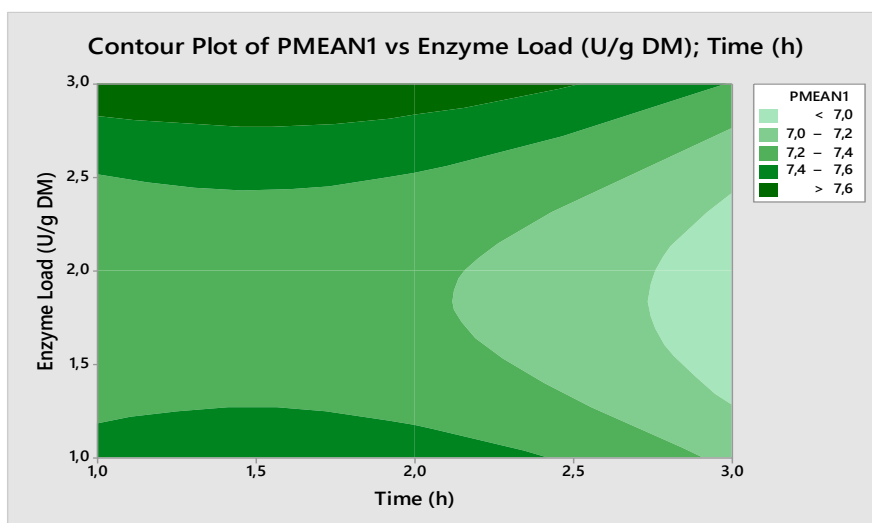
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	17,44	17,34
2	17,47 ^α	17,00
3	17,03	17,60 ^α
(max-min)	0,44	0,59
Ranking	2	1

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 17,31

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-18 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 5 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 2,3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 7.74 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

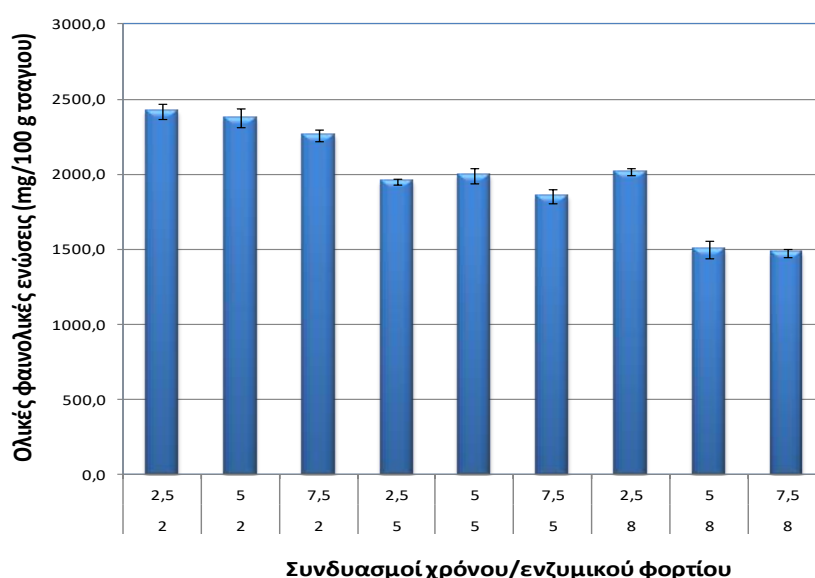
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-29).



Διάγραμμα 8-29 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-30, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-19.



Διάγραμμα 8-30 Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-19 Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

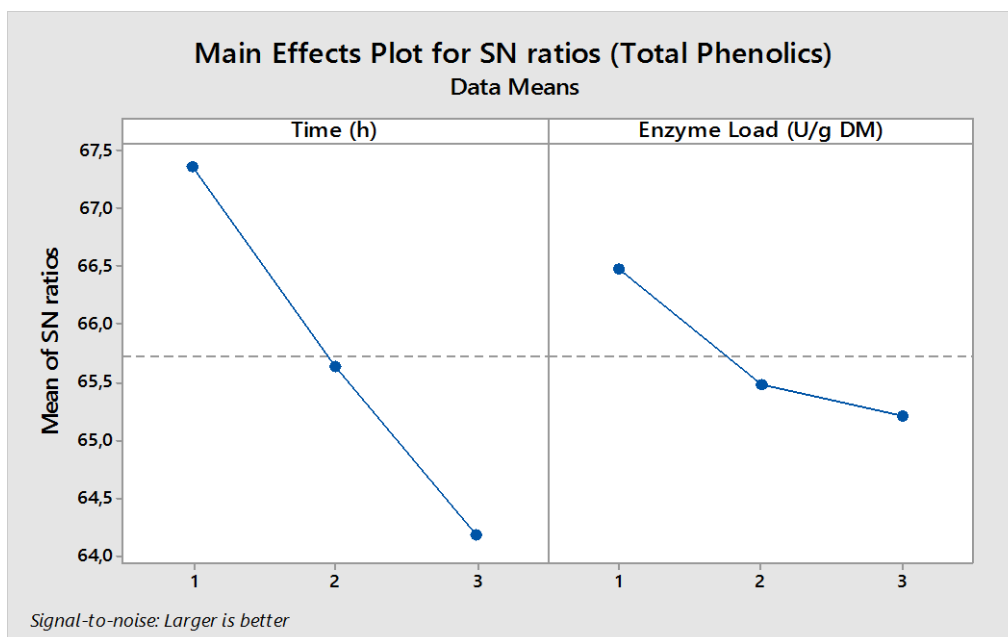
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	2198,3 ± 117,2
5	-	1955,3 ± 66,9
8	-	1732,0 ± 50,2

Στον Πίνακα 8-20 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-20 Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	2383,94	67,54
1	2	2329,72	67,34
1	3	2282,42	67,17
2	1	1966,35	65,87
2	2	1956,13	65,82
2	3	1817,39	65,18
3	1	2000,21	66,02
3	2	1454,81	63,24
3	3	1454,81	63,25

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-31 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 8-21 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-31 S/N διάγραμμα για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Πίνακας 8-21 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

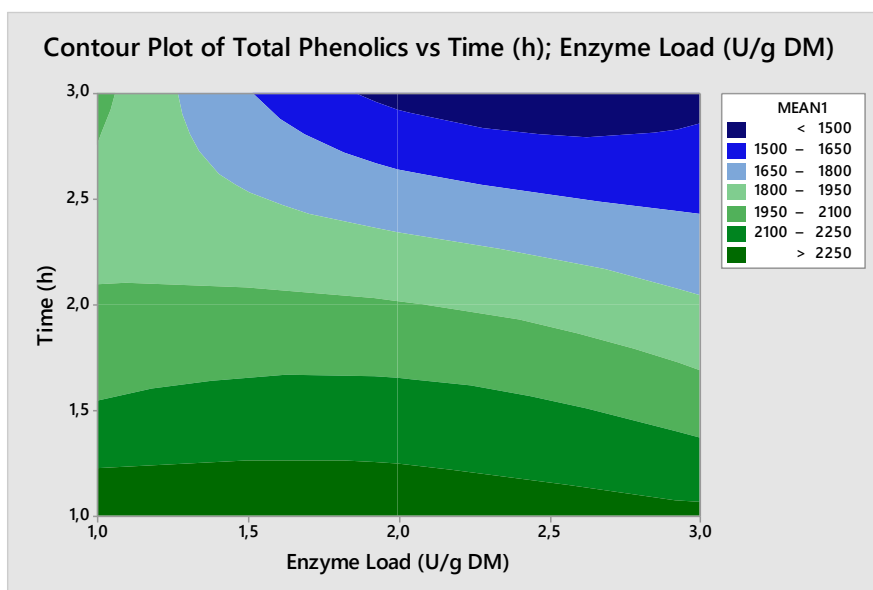
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	67,35 ^α	66,48 ^α
2	65,63	65,47
3	64,17	65,20
(max-min)	3,18	1,28
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 65,72

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-21 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM (επίπεδα 1,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2488,21 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

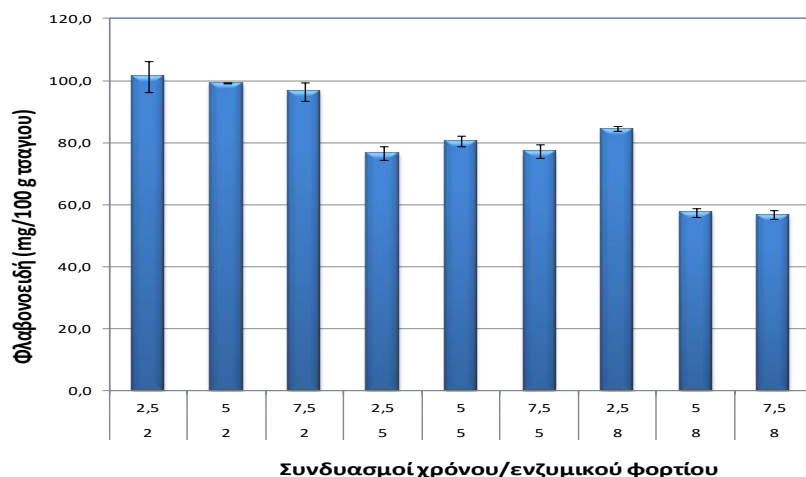
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-32).



Διάγραμμα 8-32 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-33, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-22.



Διάγραμμα 8-33 Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-22 Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	67,2 ± 3,8
5	-	53,4 ± 1,6
8	-	47,4 ± 1,6

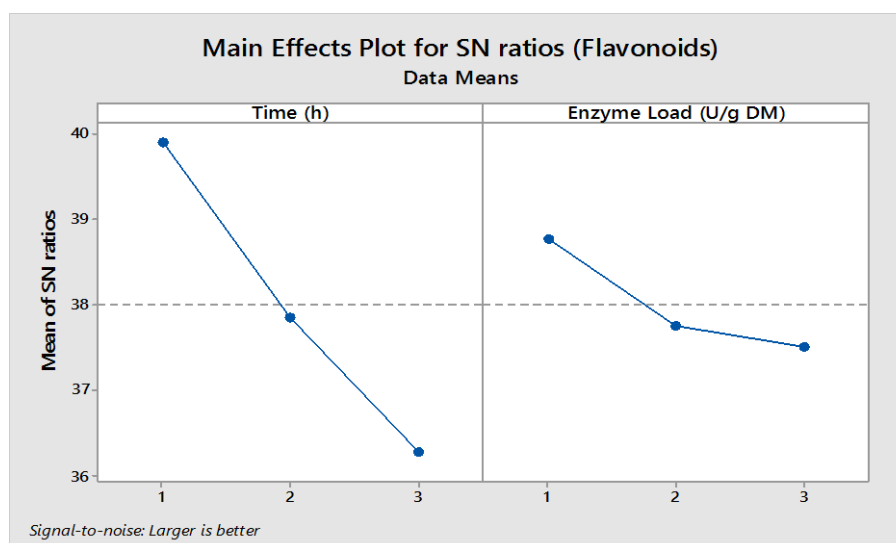
Στον Πίνακα 8-23 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-23 Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	101,26	40,09
1	2	99,19	39,93
1	3	96,51	39,69
2	1	76,53	37,67
2	2	80,49	38,11
2	3	77,18	37,74
3	1	84,54	38,54
3	2	57,46	35,18
3	3	56,69	35,07

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-34 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 φλαβονοειδή και στον Πίνακα 8-24 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-34 S/N διάγραμμα για τα φλαβονοειδή

Πίνακας 8-24 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα φλαβονοειδή

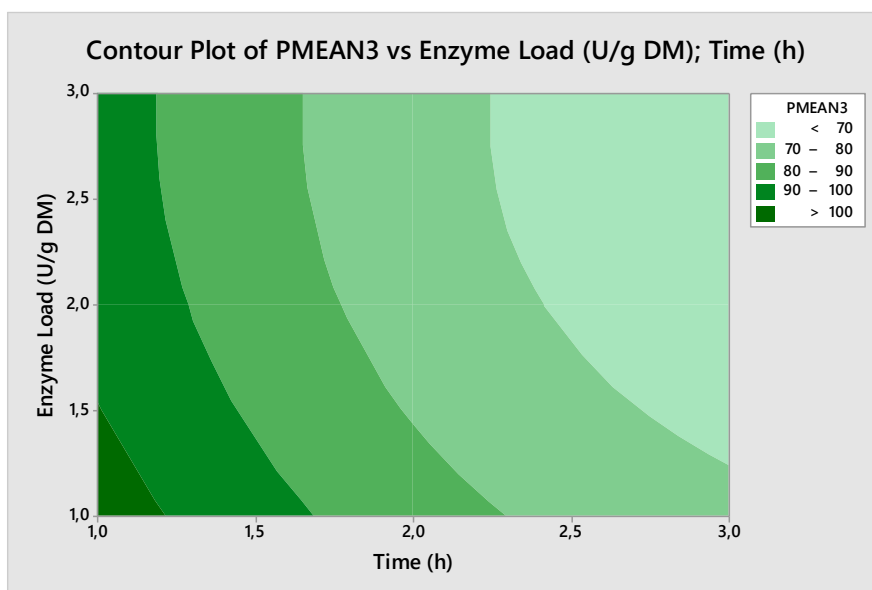
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	39,90 ^a	38,77 ^a
2	37,84	37,74
3	36,26	37,50
(max-min)	3,64	1,27
Ranking	1	2

^aΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 38,00

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-24 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM (επίπεδα 1,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή φλαβονοειδών είναι 105,33 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-35).



Διάγραμμα 8-35 Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

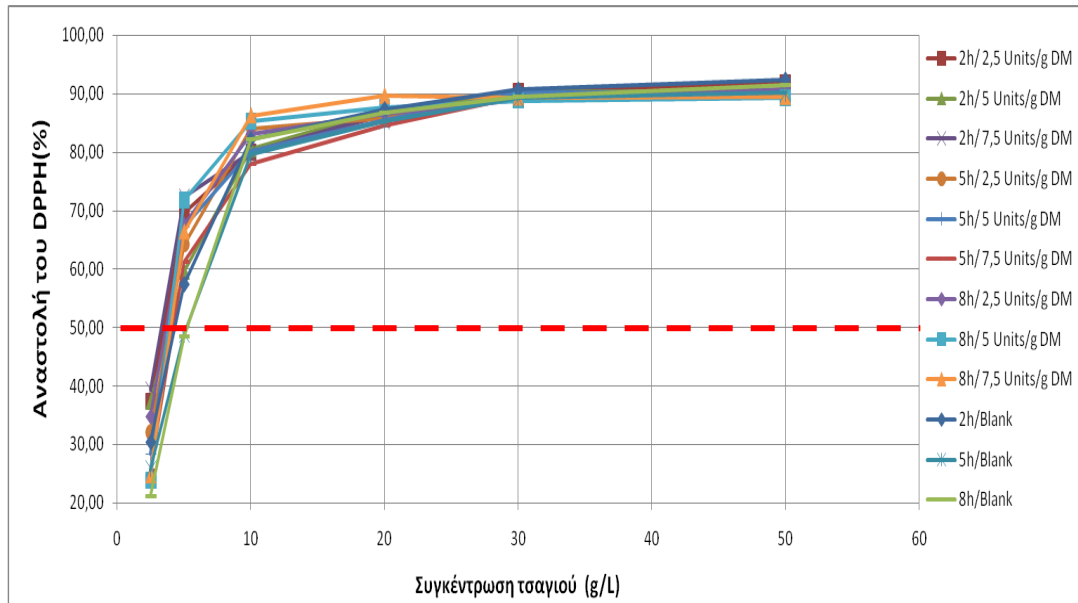
Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH (Διάγραμμα 8-36), η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{Αναστολή DPPH} = \left(\frac{A_{\text{αρχική}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{αρχική}}} \right) \cdot 100$$

Όπου $A_{\text{αρχική}}$ είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-25) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 8-36 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Πίνακας 8-25 Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC ₅₀ (g/L)
2	2,5	3,5
2	5	4,0
2	7,5	3,3
5	2,5	3,9
5	5	3,9
5	7,5	4,2
8	2,5	3,7
8	5	3,9
8	7,5	4,0
2	-	4,1
5	-	5,2
8	-	5,2

8.2.3 ΕΥΕ με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Viscozyme

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα Viscozyme παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-26. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

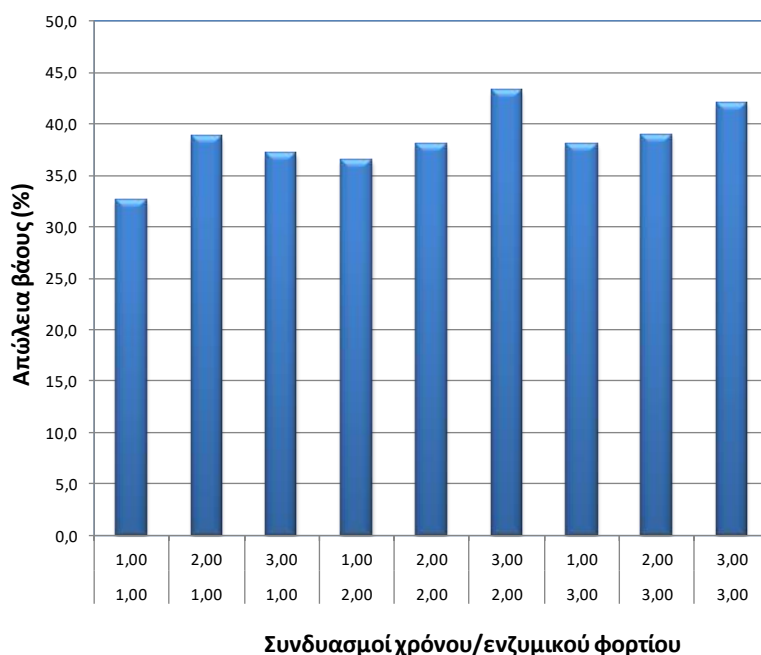
Πίνακας 8-26 Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της ΕΥΕ με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Viscozyme

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 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)

Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την ΕΥΕ και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-37, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-27.



Διάγραμμα 8-37 Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-27 Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	26,43 ± 1,9
5	-	26,71 ± 1,6
8	-	26,20 ± 2,0

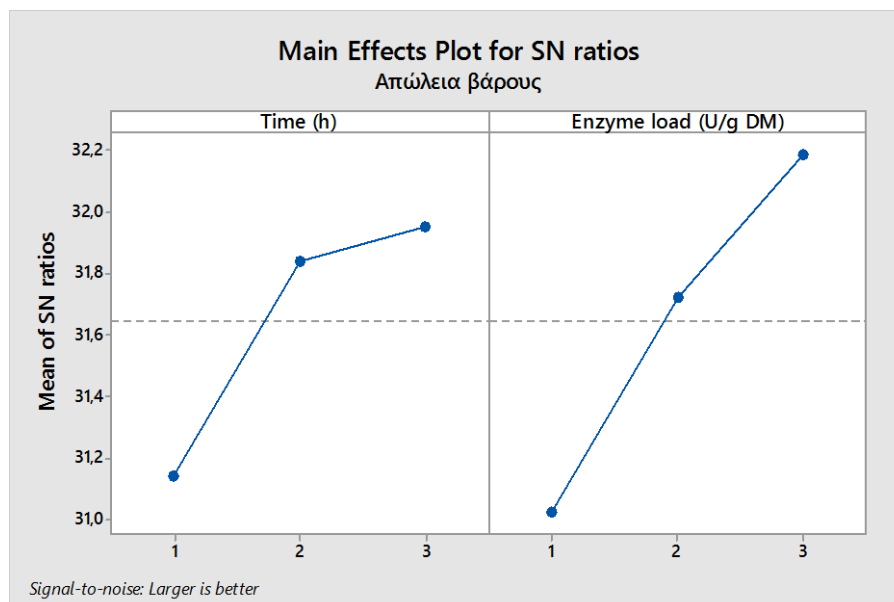
Στον Πίνακα 8-28 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-28 Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Viscozyme

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	32,53	30,25
1	2	38,82	31,78

1	3	37,12	31,39
2	1	36,41	31,22
2	2	38,02	31,60
2	3	43,17	32,70
3	1	37,98	31,59
3	2	38,88	31,80
3	3	42,02	32,47

Ανάλογα με τη φύση του κάθε ποιοτικού χαρακτηριστικού ο πειραματιστής μπορεί να επιθυμεί την μεγιστοποίηση του (larger the better), την ελαχιστοποίηση του (smaller the better) ή όσο γίνεται την μικρότερη απόκλιση του από μια συγκεκριμένη τιμή (nominal is better) (παράγραφος 6.1). Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-38 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 8-29 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-38 S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους

Πίνακας 8-29 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απώλεια βάρους

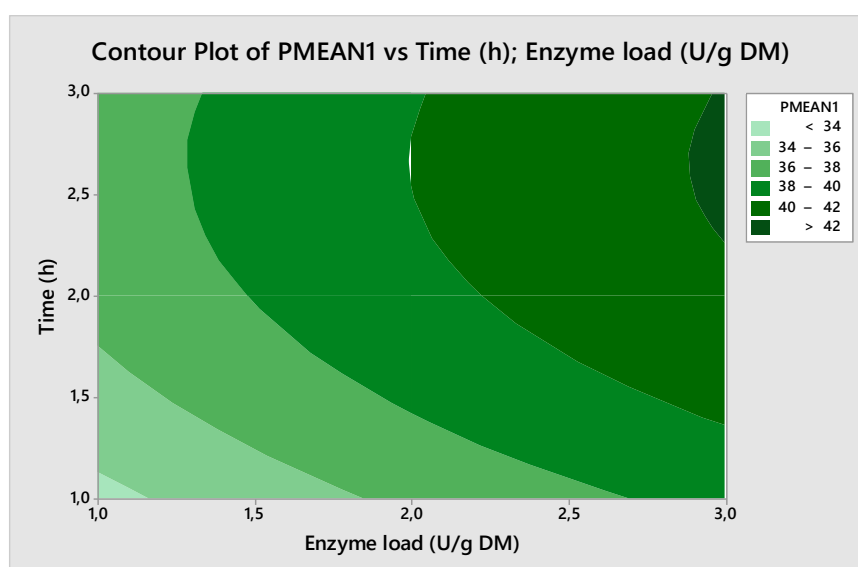
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	31,14	31,01
2	31,84	31,72
3	31,95 ^α	32,19 ^α
(max-min)	0,81	1,17
Ranking	2	1

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 31,64

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 8-29 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) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απώλειας βάρους είναι 42,07%. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο 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 8-39).

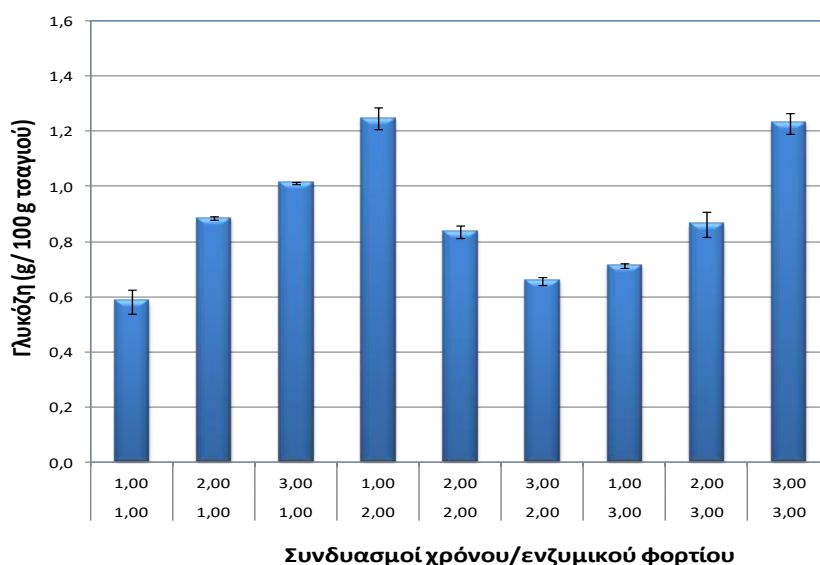


Διάγραμμα 8-39 Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσεως των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Όμοια με την κατεργασία με ένζυμο Cellic CTec2 παρατηρείται ότι μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και χρόνους κατεργασίας.

Γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-40, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-30.



Διάγραμμα 8-40 Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-30 Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

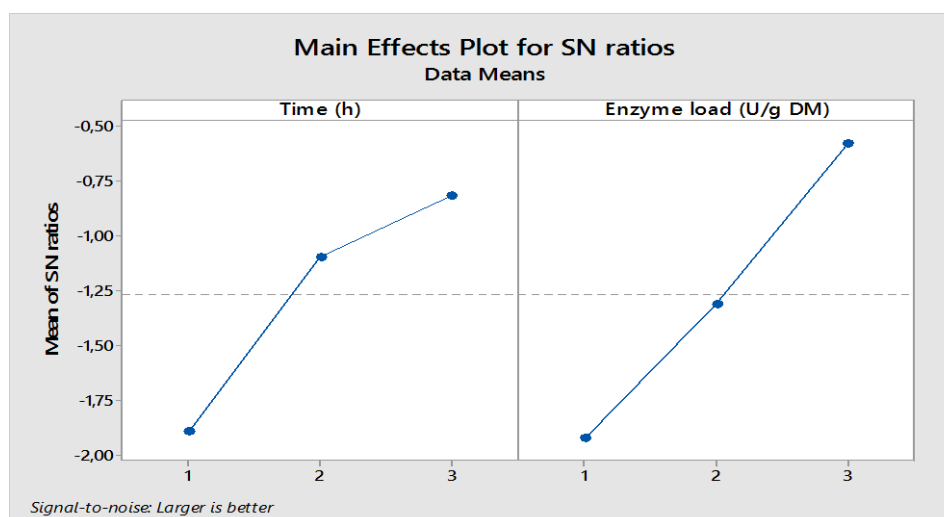
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,85 ± 0,04
5	-	0,75 ± 0,03
8	-	0,83 ± 0,02

Στον Πίνακα 8-31 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-31 Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Viscozyme L

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	0,58	-4,73
1	2	0,89	-1,06
1	3	1,01	0,11
2	1	1,25	1,91
2	2	0,84	-1,57
2	3	0,66	-3,64
3	1	0,71	-2,95
3	2	0,86	-1,30
3	3	1,23	1,79

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-41 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 8-32 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-41 S/N διάγραμμα για την απελευθερούμενη γλυκόζη

Πίνακας 8-32 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απελευθερούμενη γλυκόζη

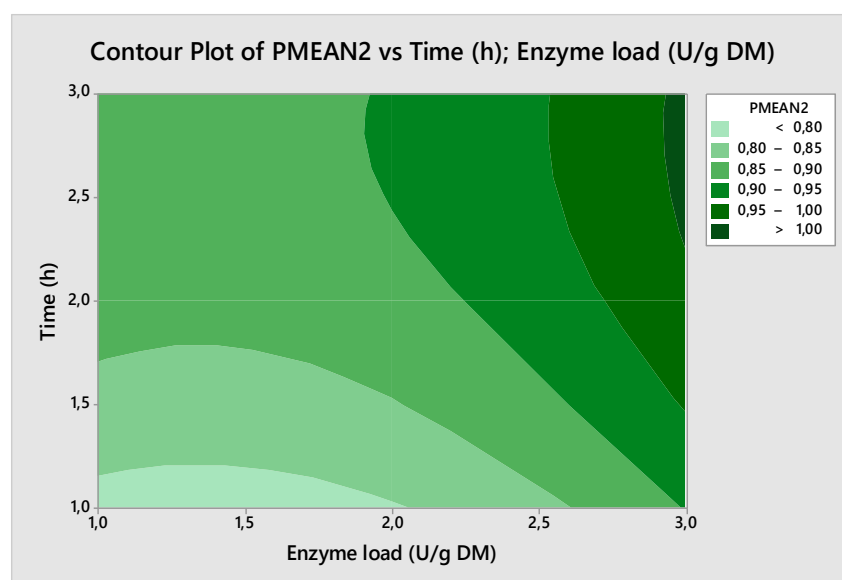
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	-1,89	-1,92
2	-1,10	-1,31
3	-0,82 ^α	-0,58 ^α
(max-min)	1,07	1,34
Ranking	2	1

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = -1,27

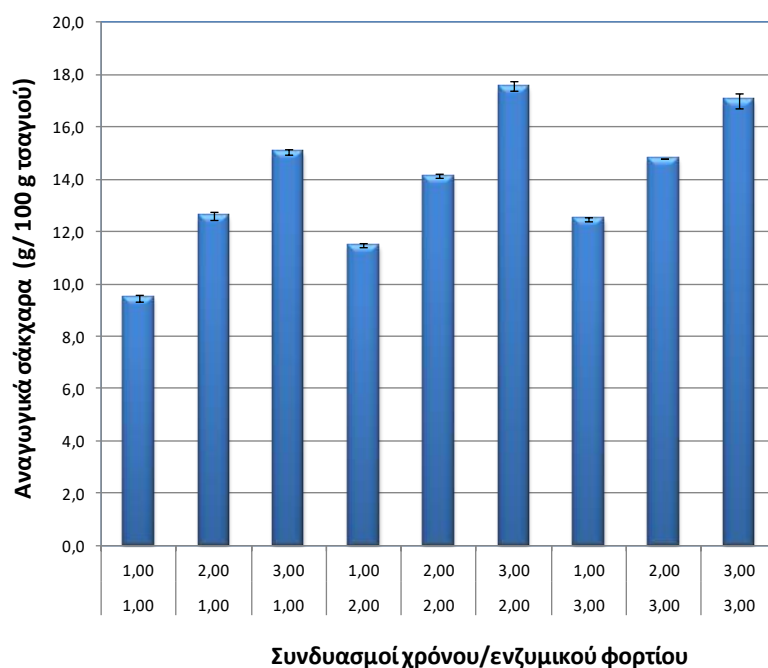
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-32 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 3,3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 1.01 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απελευθερούμενη γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-42).



Διάγραμμα 8-42 Ισοψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-43, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-33.



Διάγραμμα 8-43 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-33 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	6,21 ± 0,8
5	-	5,83 ± 0,5
8	-	5,68 ± 0,3

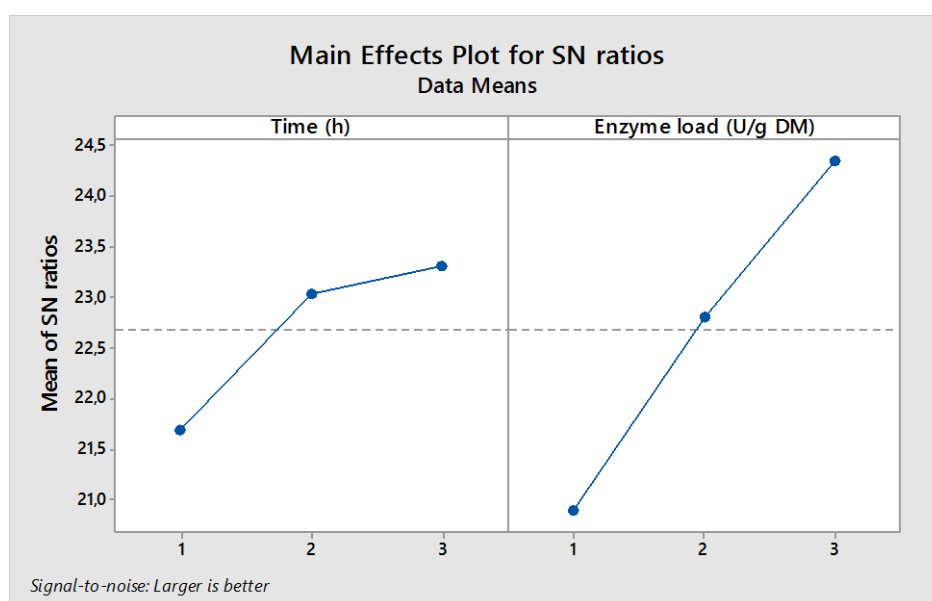
Στον Πίνακα 8-34 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-34 Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Viscozyme

Παράγοντες ελέγχου	Πειραματικές τιμές
--------------------	--------------------

A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	9,47	19,52
1	2	12,60	22,00
1	3	15,03	23,54
2	1	11,48	21,20
2	2	14,13	23,00
2	3	17,57	24,89
3	1	12,49	21,93
3	2	14,79	23,40
3	3	17,00	24,61

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-44 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 8-35 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-44 S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Πίνακας 8-35 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

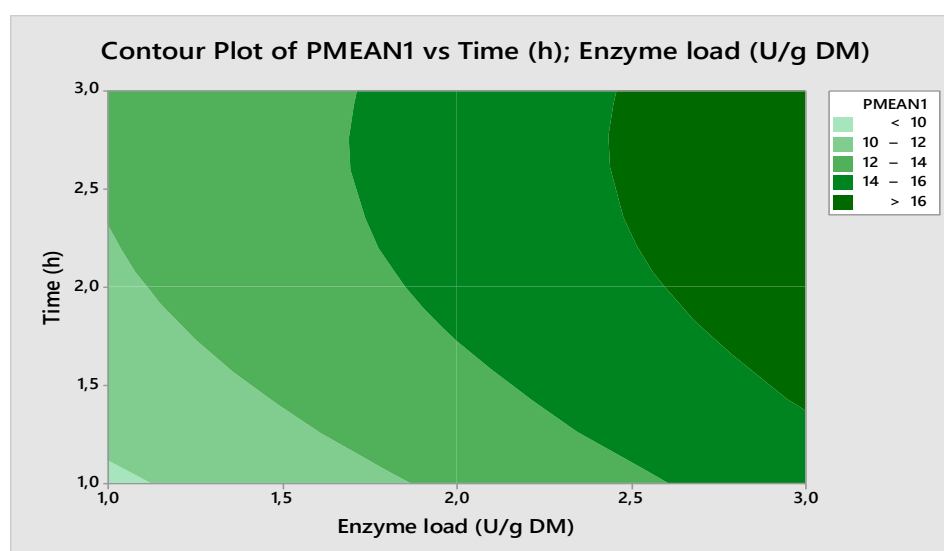
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	21,69	20,89
2	23,03	22,80
3	23,31 ^α	24,35 ^α
(max-min)	1,63	3,46
Ranking	2	1

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 22,68

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-35 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 3, 3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 17.46 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

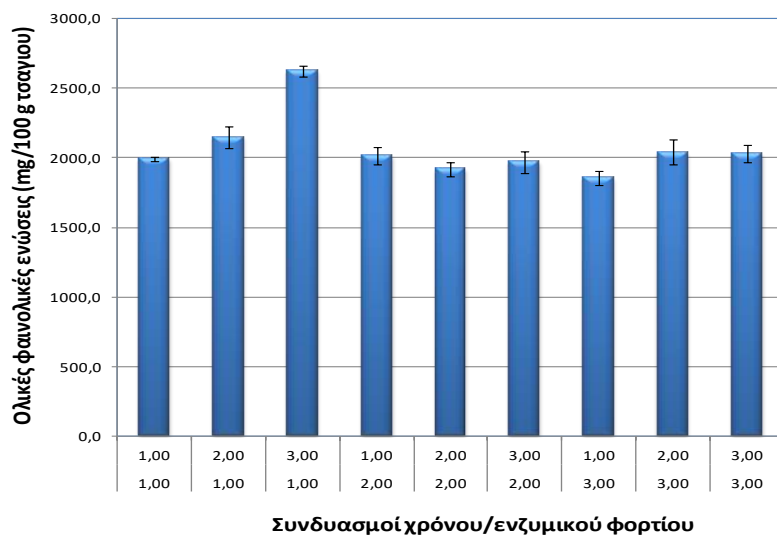
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-45).



Διάγραμμα 8-45 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσεως των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-46 ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-36.



Διάγραμμα 8-46 Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-36 Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	2198,3 ± 117,2
5	-	1955,3 ± 66,9
8	-	1732,0 ± 50,2

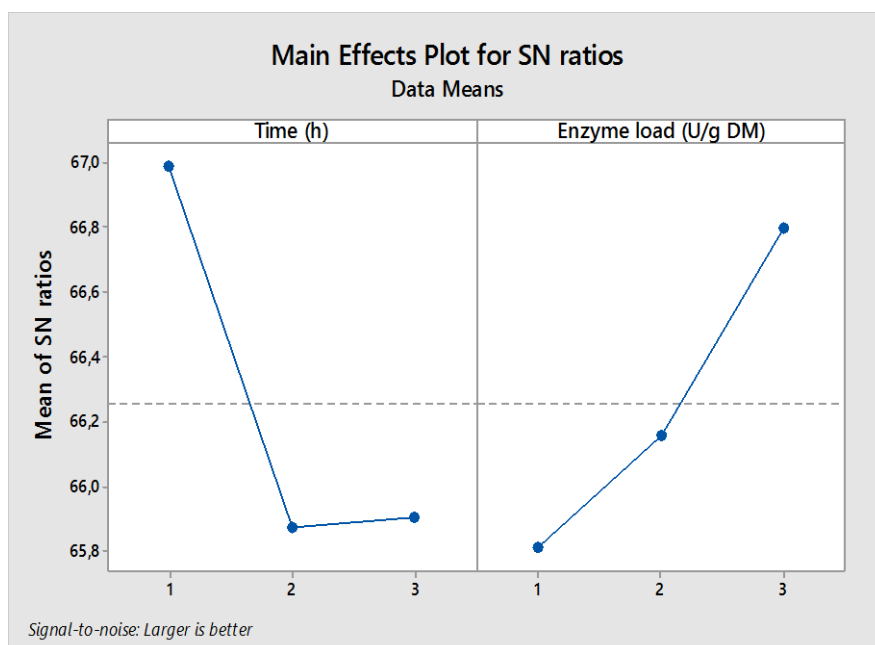
Στον Πίνακα 8-37 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-37 Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Viscozyme

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις	S/N

(mg/100 g τσαγιού)			
1	1	1990,79	65,98
1	2	2144,49	66,62
1	3	2621,35	68,37
2	1	2014,43	66,08
2	2	1919,85	65,66
2	3	1971,08	65,88
3	1	1856,79	65,37
3	2	2042,02	66,19
3	3	2030,20	66,14

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-47 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 8-38 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-47 S/N διάγραμμα για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Πίνακας 8-38 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

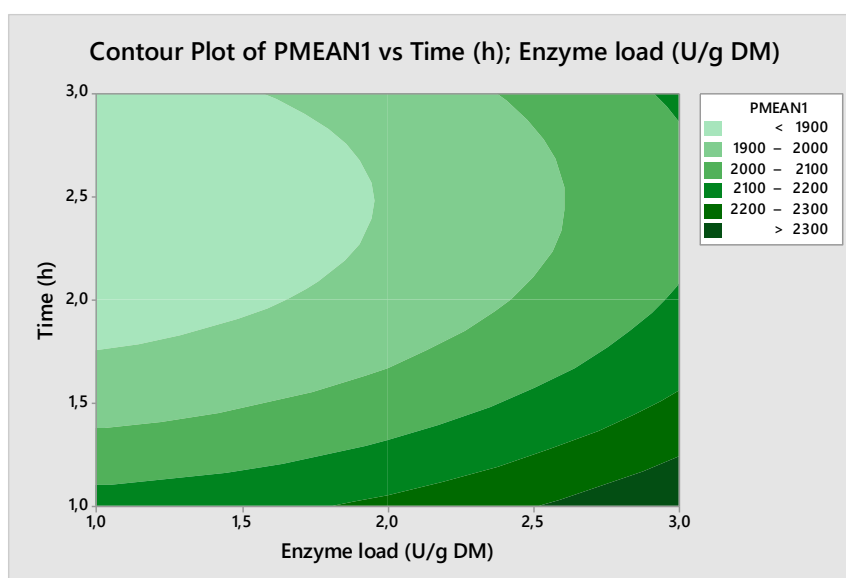
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	66,99 ^α	65,81
2	65,87	66,16
3	65,90	66,80 ^α
(max-min)	1,12	0,99
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 66,26

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-38 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) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2394,08 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

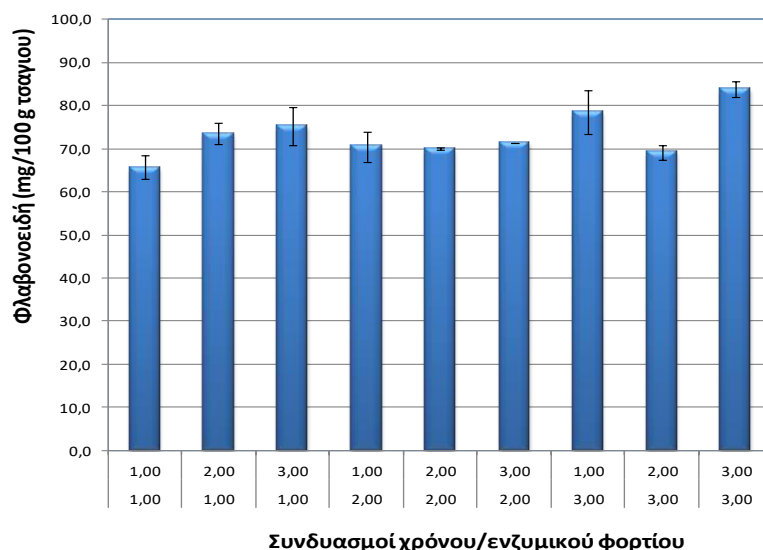
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-48).



Διάγραμμα 8-48 Ισοψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσεως των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-49, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-39.



Διάγραμμα 8-49 Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-39 Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	67,2 ± 3,8
5	-	53,4 ± 1,6
8	-	47,4 ± 1,6

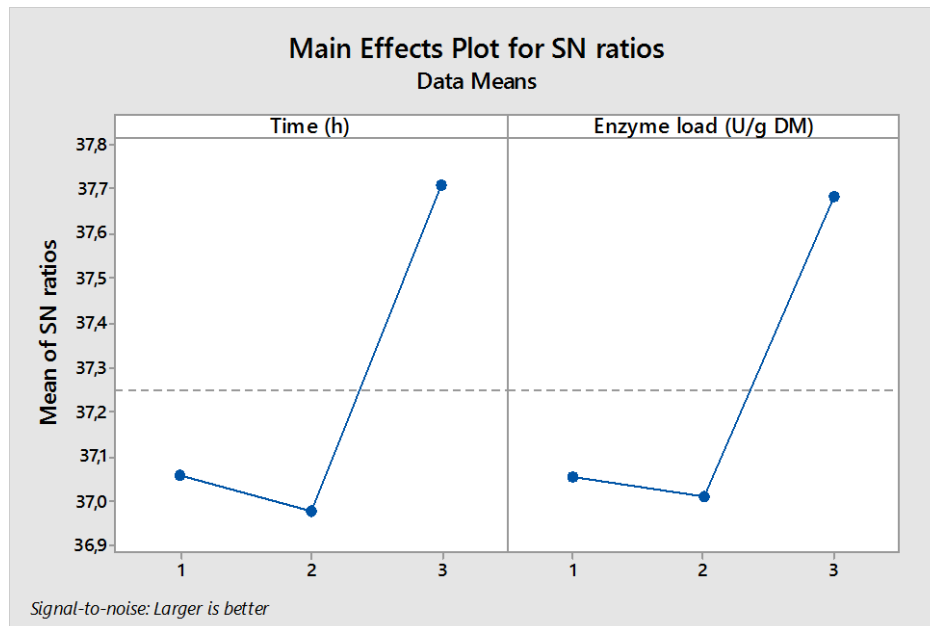
Στον Πίνακα 8-40 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-40 Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Viscozyme

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N

1	1	65,72	36,34
1	2	73,54	37,32
1	3	75,26	37,51
2	1	70,48	36,94
2	2	70,09	36,91
2	3	71,43	37,08
3	1	78,52	37,87
3	2	69,14	36,79
3	3	83,88	38,47

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-50 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 φλαβονοειδή και στον Πίνακα 8-41 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-50 S/N διάγραμμα για τα φλαβονοειδή

Πίνακας 8-41 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα φλαβονοειδή

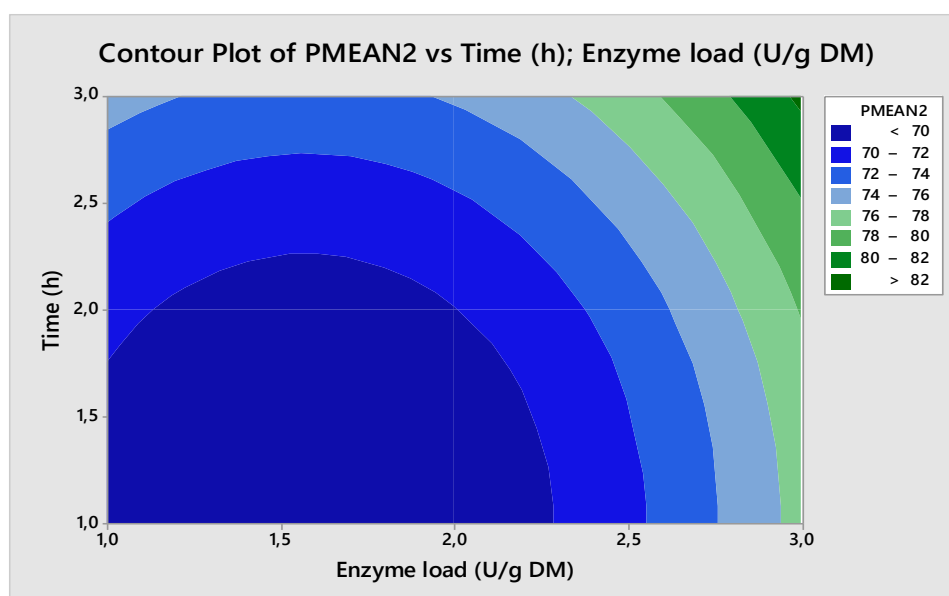
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	37,06	37,05
2	36,98	37,01
3	37,71 ^α	37,69 ^α
(max-min)	0,73	0,68
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 37,25

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-41 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 3, 3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή φλαβονοειδών είναι 82,40 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος κατεργασίας είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-51).



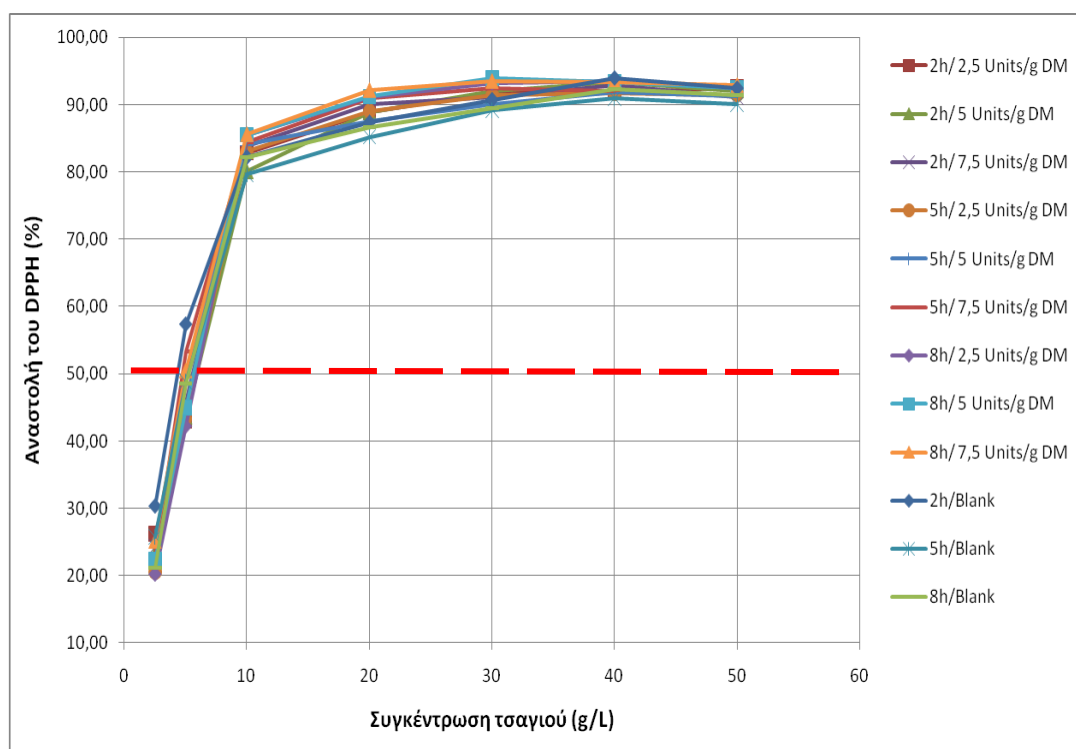
Διάγραμμα 8-51 Ισοψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{Αναστολή DPPH} = \left(\frac{A_{\text{αρχική}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{αρχική}}} \right) \cdot 100$$

Όπου $A_{\text{αρχική}}$ είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.



Διάγραμμα 8-52 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-42) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Πίνακας 8-42 Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC ₅₀ (g/L)
2	2,5	5,9
2	5	5,9
2	7,5	5,6
5	2,5	5,9
5	5	5,0
5	7,5	4,8
8	2,5	5,9
8	5	4,7
8	7,5	5,0
2	-	4,1
5	-	5,2
8	-	5,2

8.2.4 EYE με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Οι δοκιμές που έγιναν με σκοπό τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Cellic CTec2 και Cellic HTec2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-43. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε υδατική εκχύλιση σε pH 5,0 για 2h (control).

Πίνακας 8-43 Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση της συνεργιστικής δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Cellic CTec2 και Cellic HTec2

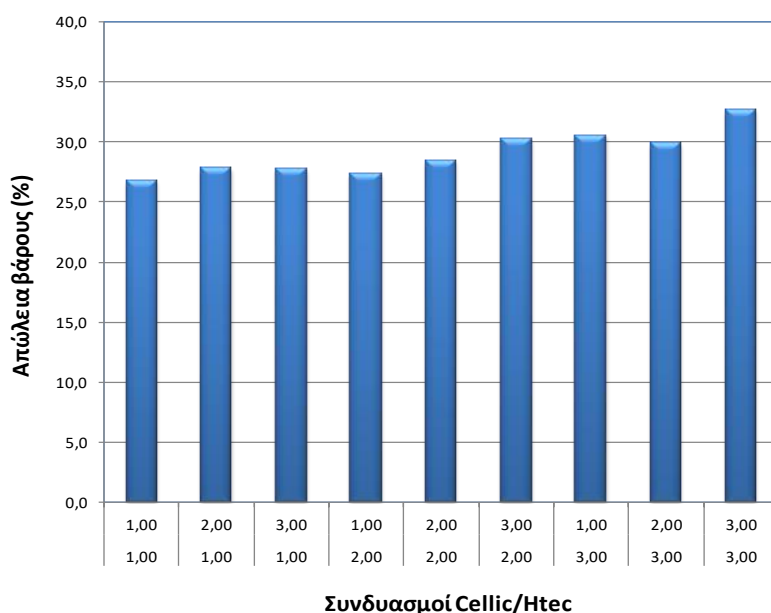
Αριθμός πειράματος	Factor A: ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (units/g D.M)	Factor B: ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (units/g D.M)
1	2,25	0,25
2	2,25	0,5

3	2,25	0,75
4	4,5	0,25
5	4,5	0,5
6	4,5	0,75
7	6,75	0,25
8	6,75	0,5
9	6,75	0,75

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).

Απώλεια βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-53, ενώ η απώλεια βάρους του δείγματος απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-44.



Διάγραμμα 8-53 Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-44 Απώλεια βάρους του δείγματος απουσία ενζύμου

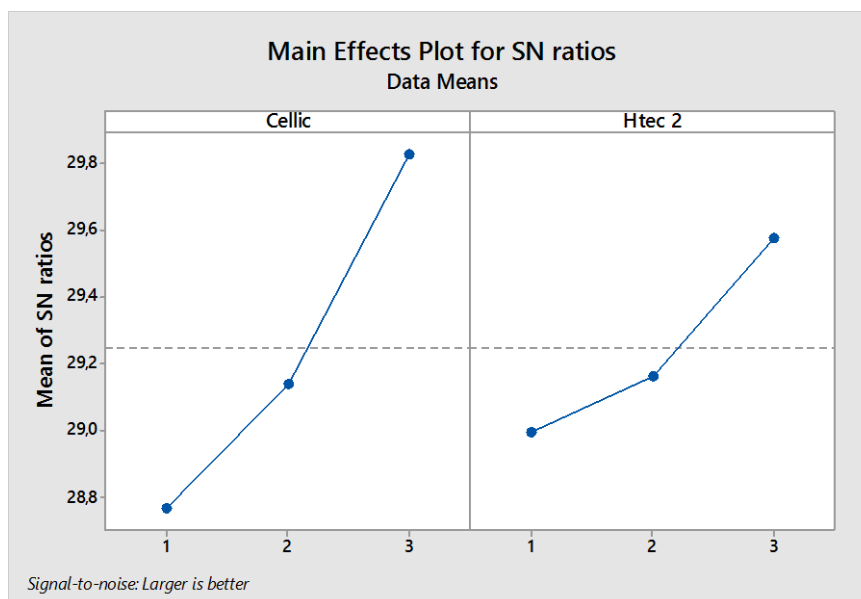
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	26,43 ± 1,9

Στον Πίνακα 8-45 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-45 Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	26,80	28,56
1	2	27,79	28,88
1	3	27,71	28,85
2	1	27,33	28,73
2	2	28,48	29,09
2	3	30,18	29,59
3	1	30,49	29,68
3	2	29,92	29,52
3	3	32,65	30,28

Ανάλογα με τη φύση του κάθε ποιοτικού χαρακτηριστικού ο πειραματιστής μπορεί να επιθυμεί την μεγιστοποίηση του (larger the better), την ελαχιστοποίηση του (smaller the better) ή όσο γίνεται την μικρότερη απόκλιση του από μια συγκεκριμένη τιμή (nominal is better) (παράγραφος 6.1). Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-54 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 8-46 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-54 S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους

Πίνακας 8-46 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απώλεια βάρους

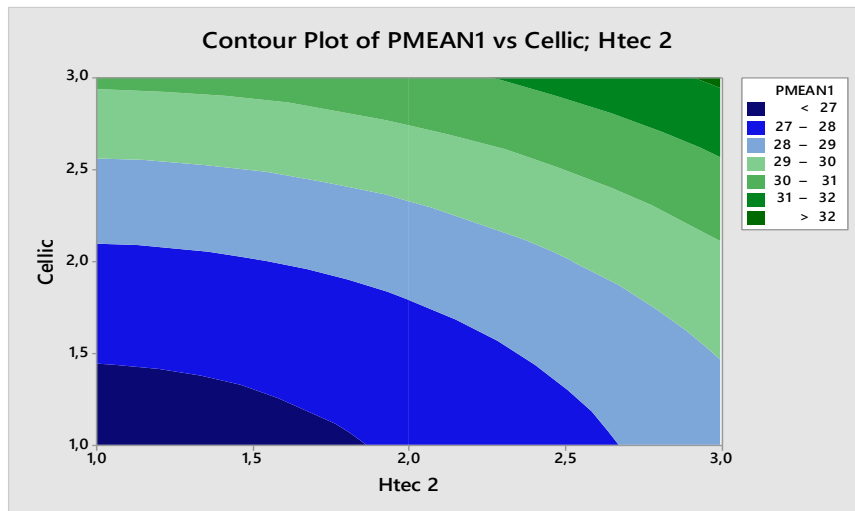
Επίπεδο	Παράγοντας A : Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g DM)	Παράγοντας B: Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g DM)
1	28,76	28,99
2	29,14	29,16
3	29,83 ^α	29,58 ^α
(max-min)	1,06	0,58
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 29,24

Σύμφωνα με τους Ηασχαλίκ & Ζαγδαζ (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-46 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται με ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 6.75 Units/g DM και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 0.75 Units/g DM (επίπεδα 3,3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απώλειας βάρους είναι 32,16%. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο του Cellic CTec2 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 8-55).

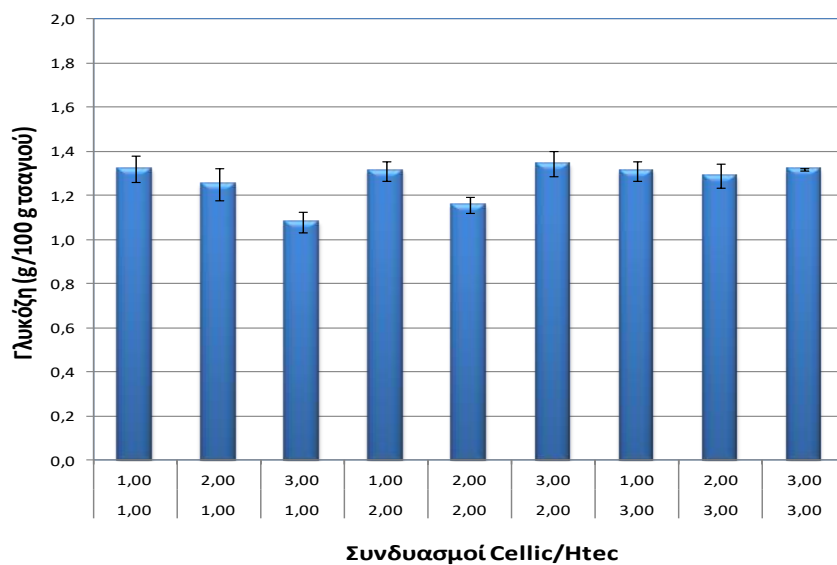


Διάγραμμα 8-55 Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί υψηλά ενζυμικά φορτία και των δύο ενζυμικών σκευασμάτων.

Γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8-56, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-47.



Διάγραμμα 8-56 Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-47 Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

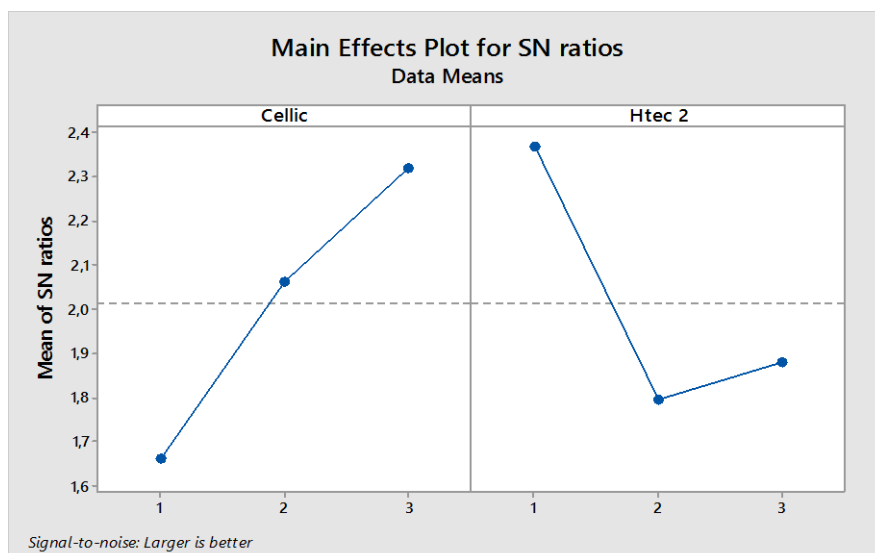
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,85 ± 0,04

Στον Πίνακα 8-48 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-48 Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	1,32	2,40
1	2	1,25	1,92
1	3	1,08	0,66
2	1	1,31	2,36
2	2	1,16	1,26
2	3	1,35	2,57
3	1	1,31	2,34
3	2	1,29	2,20
3	3	1,32	2,41

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-57 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 8-49 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-57 S/N διάγραμμα για την απελευθερούμενη γλυκόζη

Πίνακας 8-49 Πίνακας μέσων τιμών S/N για την απελευθερούμενη γλυκόζη

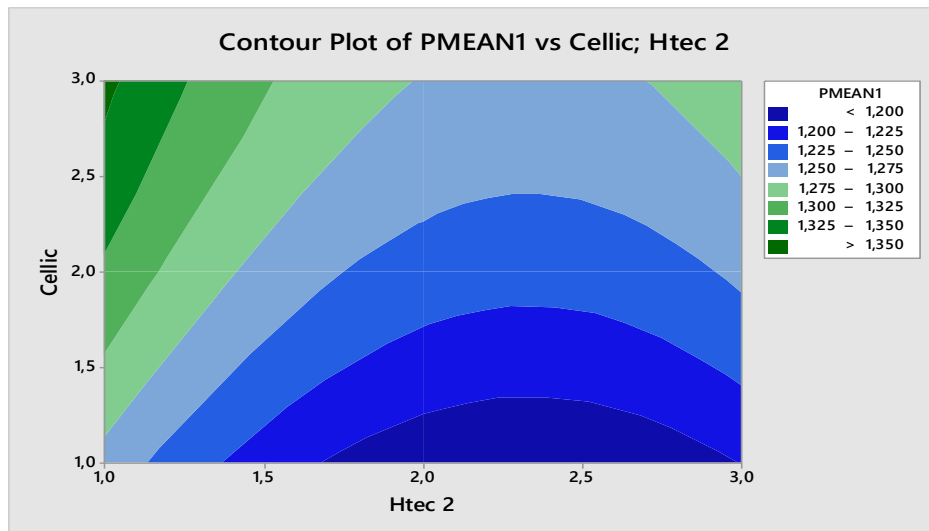
Επίπεδο	Παράγοντας Α: Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g DM)	Παράγοντας Β: Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g DM)
1	1,66	2,37 ^α
2	2,06	1,79
3	2,32 ^α	1,88
(max-min)	0,66	0,58
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 2,01

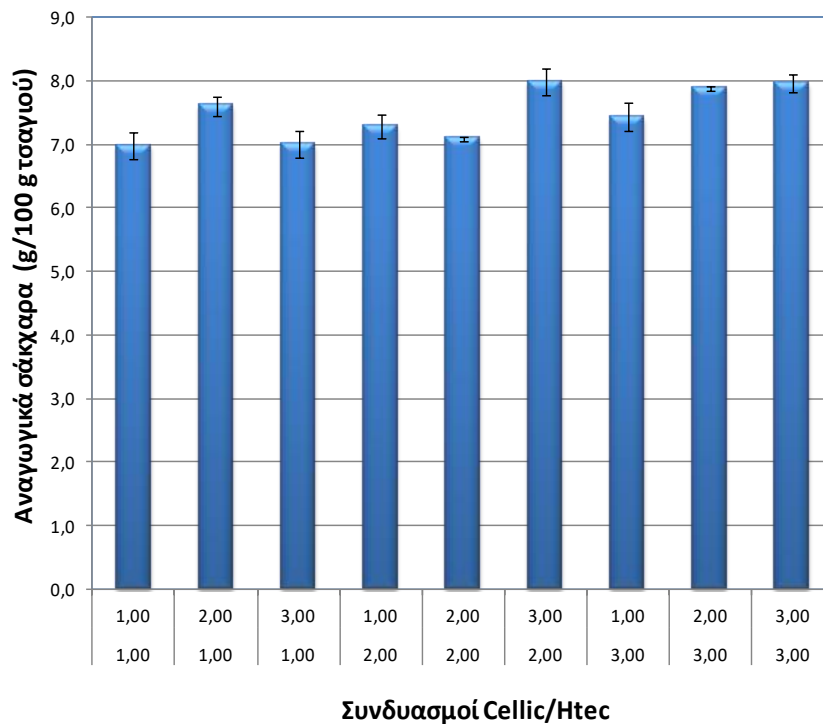
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-49 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 6.75 Units/g DM και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 0.25 Units/g DM (επίπεδα 3, 1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 1.36 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απελευθερούμενη γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-58).



Διάγραμμα 8-58 Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-59, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-50.



Διάγραμμα 8-59 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-50 Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

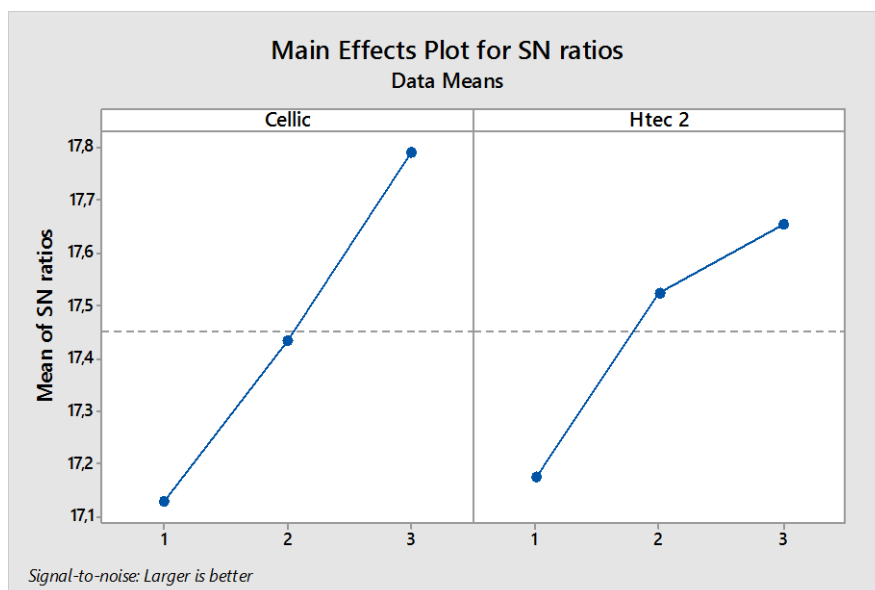
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	6,21 ± 0,8

Στον Πίνακα 8-51 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-51 Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	6,97	16,86
1	2	7,61	17,62
1	3	7,00	16,90
2	1	7,28	17,23
2	2	7,09	17,02
2	3	8,00	18,05
3	1	7,44	17,42
3	2	7,88	17,94
3	3	7,96	18,02

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-60 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 8-52 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-60 S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Πίνακας 8-52 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

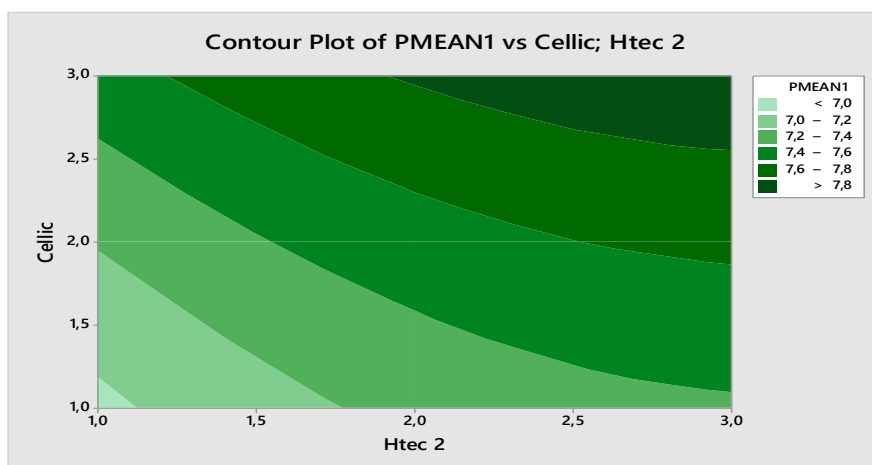
Επίπεδο	Παράγοντας A : Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g DM)	Παράγοντας B: Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g DM)
1	17,13	17,17
2	17,43	17,52
3	17,79 ^a	17,66 ^a
(max-min)	0,66	0,48
Ranking	1	2

^aΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 17,45

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-52 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται με ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 6.75 Units/g DM και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 0.75 Units/g DM (επίπεδα 3, 3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών αναγωγικών σακχάρων είναι 7.94 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο του Cellic CTec2 είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

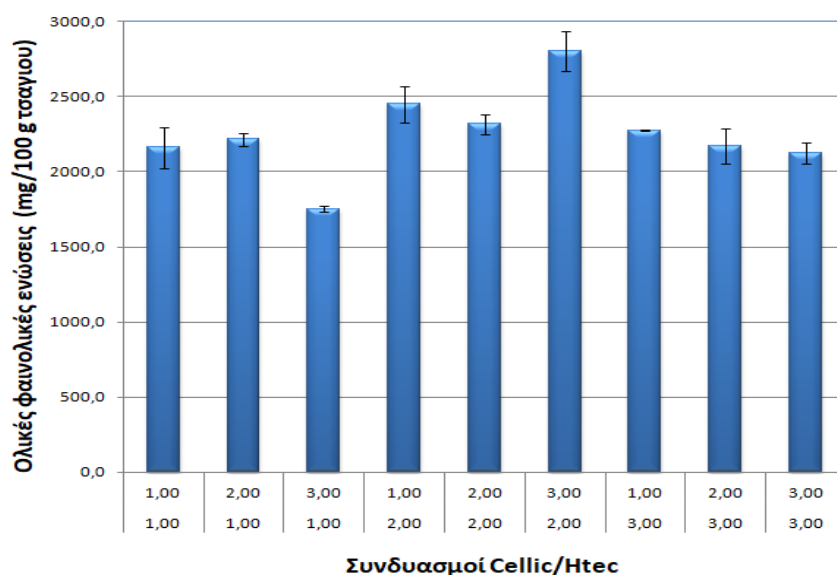
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-61).



Διάγραμμα 8-61 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-62, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-53.



Διάγραμμα 8-62 Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-53 Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

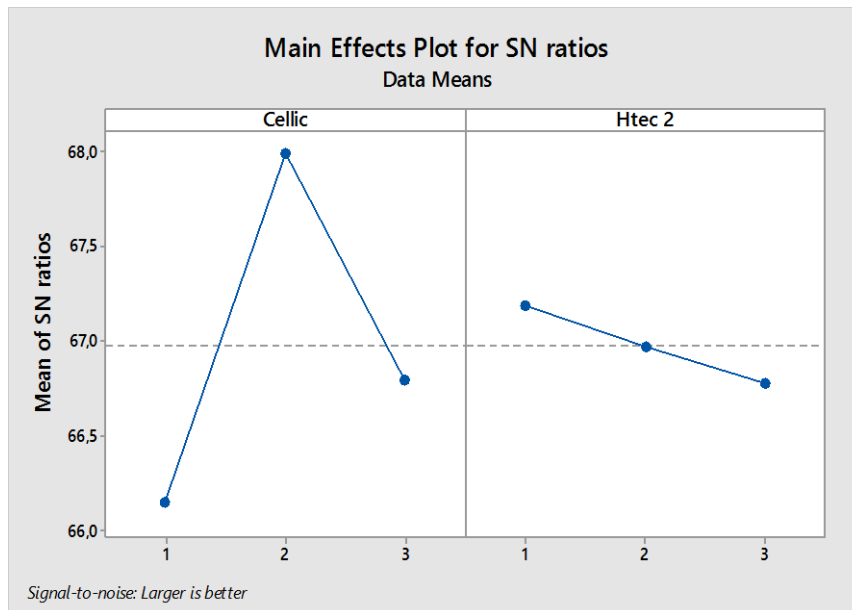
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	2198,3 ± 117,2

Στον Πίνακα 8-54 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-54 Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις(mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	2160,25	66,67
1	2	2214,54	66,90
1	3	1753,63	64,88
2	1	2448,95	67,76
2	2	2317,89	67,30
2	3	2800,97	68,93
3	1	2275,45	67,14
3	2	2169,47	66,71
3	3	2123,08	66,53

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-63 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 8-55 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-63 S/N διάγραμμα για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

Πίνακας 8-55 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

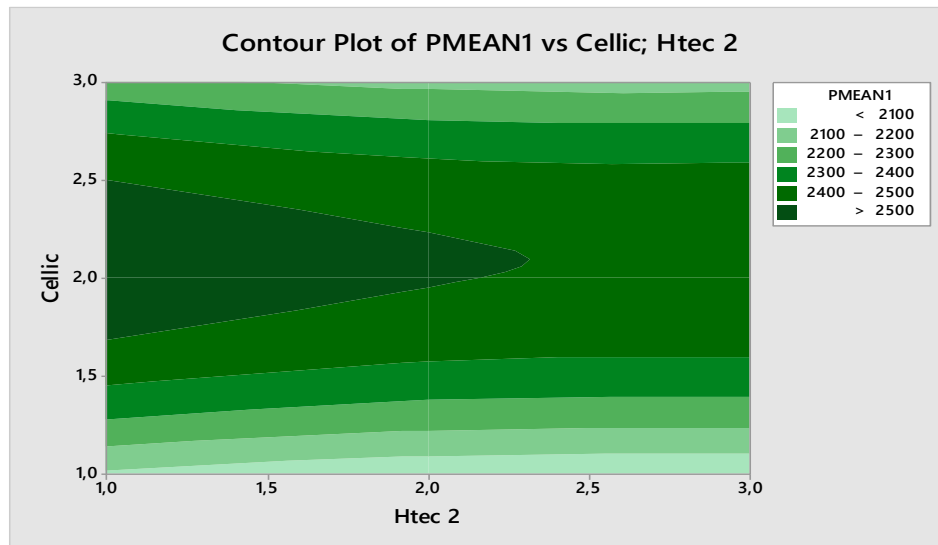
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g DM)	Παράγοντας Β: Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g DM)
1	66,15	67,19 ^α
2	68,00 ^α	66,97
3	66,79	66,78
(max-min)	1,85	0,41
Ranking	1	2

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 66,98

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-55 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται με ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 4.5 Units/g DM και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 0.25 Units/g DM (επίπεδα 2, 1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2565,91 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο του Cellic CTec2 είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

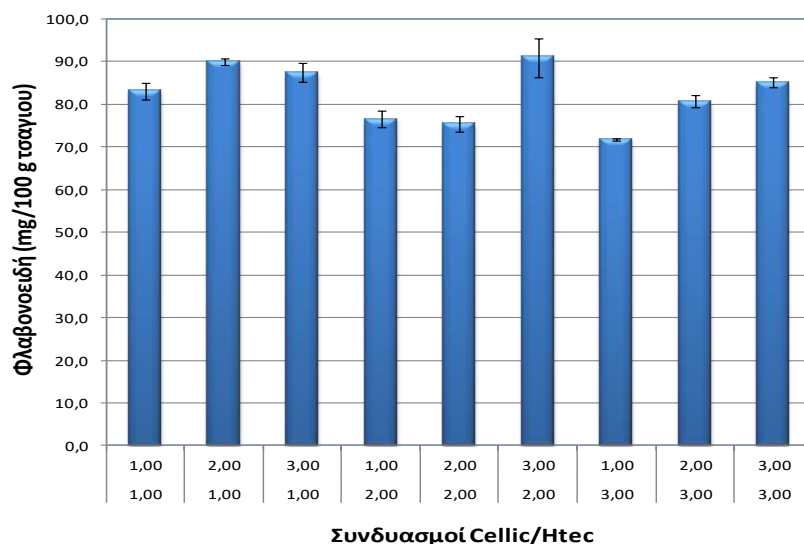
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-64).



Διάγραμμα 8-64 Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8-65, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8-56.



Διάγραμμα 8-65 Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Πίνακας 8-56 Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

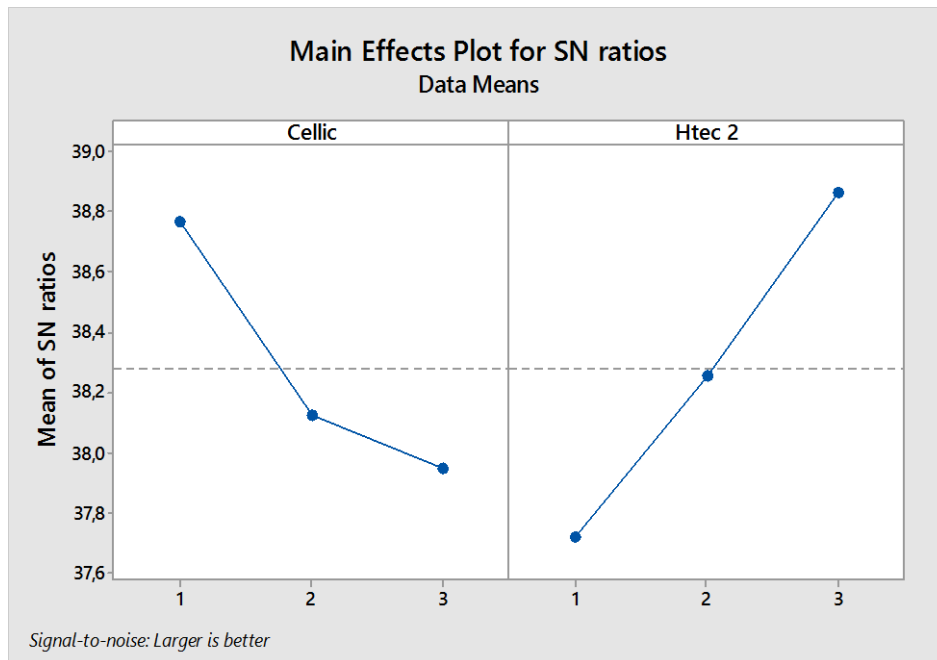
Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	67,2 ± 3,8

Στον Πίνακα 8-57 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Πίνακας 8-57 Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Cellic CTec2 και Cellic HTec2

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	83,11	38,39
1	2	89,97	39,08
1	3	87,48	38,83
2	1	76,51	37,67
2	2	75,45	37,55
2	3	90,97	39,16
3	1	71,65	37,10
3	2	80,72	38,14
3	3	85,15	38,60

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 8-66 παρουσιάζονται τα γραφήματα των τιμών S/N για τους δύο παράγοντες ελέγχου (ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα φλαβονοειδή και στον Πίνακα 8-58 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 8-66 S/N διάγραμμα για τα φλαβονοειδή

Πίνακας 8-58 Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα φλαβονοειδή

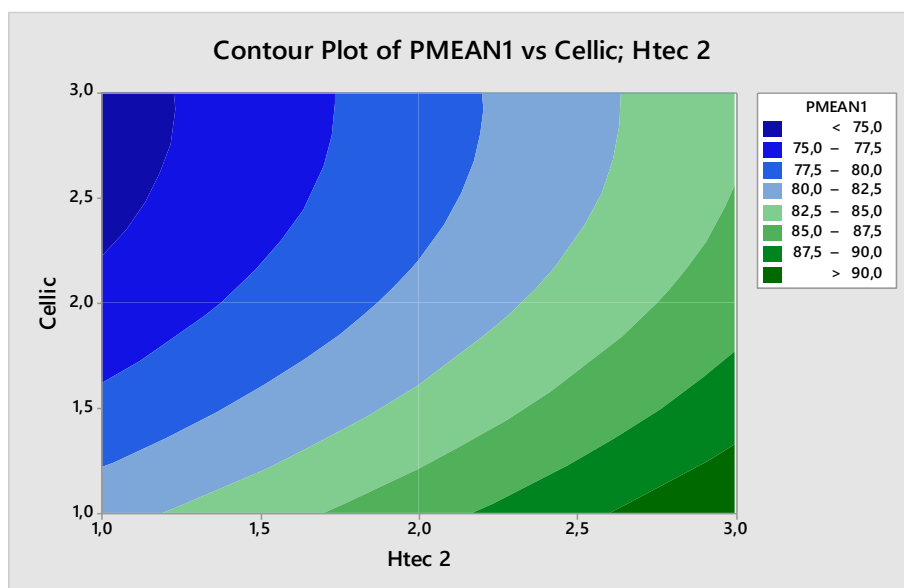
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g DM)	Παράγοντας Β: Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g DM)
1	38,77 ^α	37,72
2	38,13	38,26
3	37,95	38,87 ^α
(max-min)	0,82	1,14
Ranking	2	1

^αΒέλτιστη τιμή

Μέση τιμή του S/N = 38,28

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 8-58 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των φλαβονοειδών επιτυγχάνεται με ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 2.25 Units/g DM και ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 0.75 Units/g DM (επίπεδα 1, 3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή φλαβονοειδών είναι 92,38 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο του Cellic HTec2 είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 8-67).



Διάγραμμα 8-67 Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

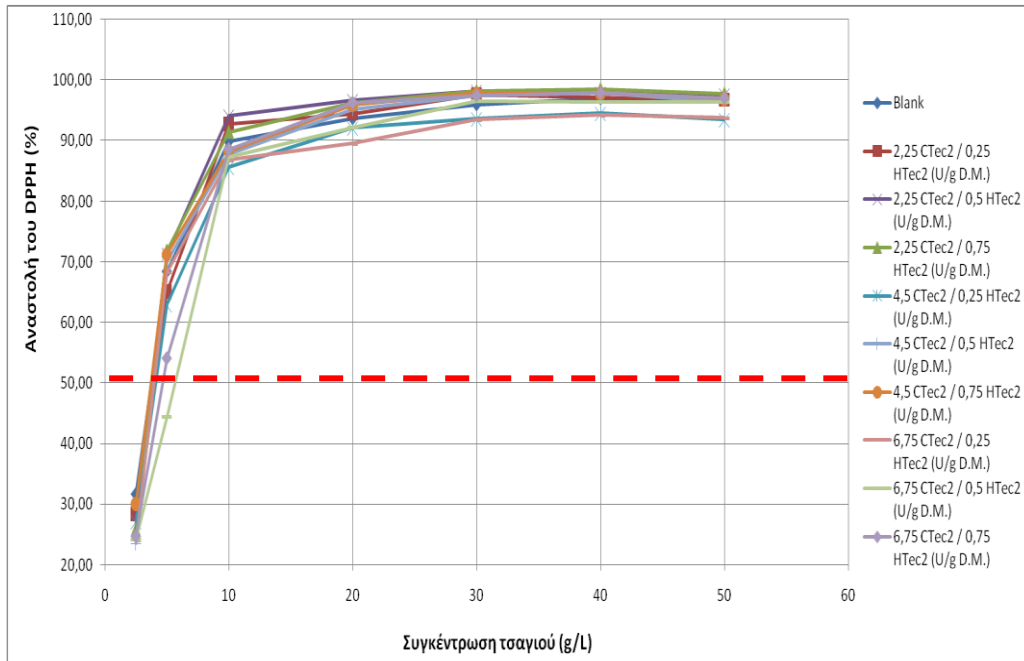
Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH, η οποία εκτιμά το υπόλοιπο συγκέντρωσης της ρίζας, μετά την αντίδρασή της με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις από το εκάστοτε εκχύλισμα, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{Αναστολή DPPH} = \left(\frac{A_{\text{αρχική}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{αρχική}}} \right) \cdot 100$$

Όπου $A_{\text{αρχική}}$ είναι η απορρόφηση του DPPH χωρίς το εκχύλισμα, και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-59) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 8-68 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Πίνακας 8-59 Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

Ενζυμικό φορτίο Cellic CTec2 (U/g D.M)	Ενζυμικό φορτίο Cellic HTec2 (U/g D.M)	IC ₅₀ (g/L)
2,25	0,25	4,0
2,25	0,5	3,8
2,25	0,75	3,8
4,5	0,25	4,1
4,5	0,5	3,9
4,5	0,75	3,7
6,75	0,25	4,0
6,75	0,5	5,7
6,75	0,75	4,7
-	-	4,1

Από τα χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων που μετρούνται, μείζονος σημασίας είναι τα ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ποσοστό απώλειας βάρους, η γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα αυξάνονται αναλογικά με αύξηση του χρόνου της ενζυμικής κατεργασίας αλλά και του ενζυμικού φορτίου. Συγκεντρωτικά οι βέλτιστες προβλεπόμενες τιμές τους, και οι συνδυασμοί στους οποίους αντιστοιχούν, που προκύπτουν από την ανάλυση Taguchi των τριών πειραμάτων που περιγράφηκαν στις παραγράφους 7.2.2, 7.2.3 και 7.2.4 παρουσιάζονται στον Πίνακα 7-60.

8-60 Βέλτιστες προβλεπόμενες τιμές σχεδιασμού Taguchi των τριών πειραμάτων

Ένζυμο		Ολικά φαινολικά (mg/100g τσαγιού)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)	IC ₅₀ (g/L)
Cellic CTec2	Προβλεπόμενη Τιμή	2488,21	105,33	3,3
	Συνδυασμός	2h – 2.5 Units/g DM	2h – 2.5 Units/g DM	2h – 7.5 Units/g DM
Viscozyme L.	Προβλεπόμενη Τιμή	2394,08	82,40	4,7
	Συνδυασμός	2h – 7.5 Units/g DM	8h – 7.5 Units/g DM	8h – 5 Units/g DM
Cellic CTec2 & Cellic HTec2	Προβλεπόμενη Τιμή	2565,91	92,38	3,7
	Συνδυασμός	4.5 Units Ctec2/g DM – 0.25 Units HTec2/g DM	2.25 Units Ctec2/g DM – 0.75 Units HTec2/g DM	4.5 Units Ctec2/g DM – 0.75 Units HTec2/g DM

Παρατηρείται ότι το εκχύλισμα που προέκυψε από την κατεργασία του τσαγιού με το ενζυμικό σκεύασμα Viscozyme L. έχει μικρότερη δράση απ ότι τα άλλα δύο εκχυλίσματα. Στο εκχύλισμα που προέκυψε από την κατεργασία του τσαγιού με το ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 βρέθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονοειδών και η καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μέγιστη προβλεπόμενη τιμή ολικών φαινολικών βρέθηκε για το εκχύλισμα που προήλθε από τη συνεργιστική δράση Cellic CTec2 και Cellic HTec2.

Η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου για συγκεκριμένη διάρκεια ενζυμικής εκχύλισης και τιμή ενζυμικού φορτίου βασίζεται στην επιλογή των συνθηκών που δίνουν όσο το δυνατόν καλύτερα αποτελέσματα και για τα τρία αυτά χαρακτηριστικά. Η

ταυτόχρονη χρήση Cellic CTec2 και Cellic HTec σε φορτία 2 4.5 Units/g DM και 0.25 Units/g DM αντίστοιχα, η οποία οδηγεί σε εκχύλισμα με μέγιστο περιεχόμενο ολικών φαινολικών, μειονεκτεί λόγω του χαμηλού περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή συστατικά ($76,51 \pm 1,89$ mg/100 g τσαγιού). Αντιθέτως από τη χρήση ενζύμου Cellic CTec2 για 2 ώρες ενζυμικής κατεργασίας και ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM προκύπτει το εκχύλισμα με το μέγιστο περιεχόμενο φλαβονοειδών, περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά ίσο με 2488,21 mg/100g τσαγιού και $IC_{50} = 3,5$ g/L. Ο συνδυασμός αυτός φαίνεται να αποδίδει συνολικά, το βέλτιστο περιεχόμενο βιοδραστικών συστατικών και συνεπώς επιλέγεται για εκχύλιση όλων των ειδών τσαγιού.

8.2.5 EYE όλων των ειδών τσαγιού

Όλα τα είδη *Sideritis*, σε συγκέντρωση 5%, εκχυλίζονται με σκεύασμα Cellic CTec2, ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM, χρόνο ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης 2 ώρες και ακολουθεί 24 ώρες συμβατική εκχύλιση.

Απώλεια Βάρους

Η απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στον Πίνακα 8-61.

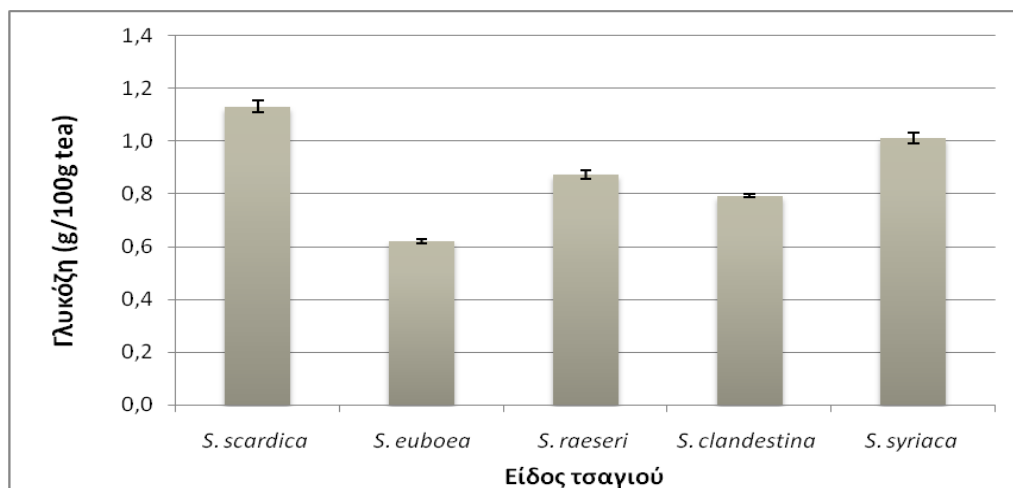
Πίνακας 8-61 Απώλεια βάρους μετά το συνδυασμό μεθόδων εκχύλισης συναρτήσει του είδους τσαγιού

Είδος Τσαγιού	Απώλεια βάρους (%)
<i>Sideritis scardica</i>	$28,9 \pm 1,1$
<i>Sideritis euboica</i>	$21,3 \pm 0,3$
<i>Sideritis raeseri</i>	$22,2 \pm 0,3$
<i>Sideritis clandestina</i>	$26,9 \pm 0,4$
<i>Sideritis syriaca</i>	$26,9 \pm 1,0$

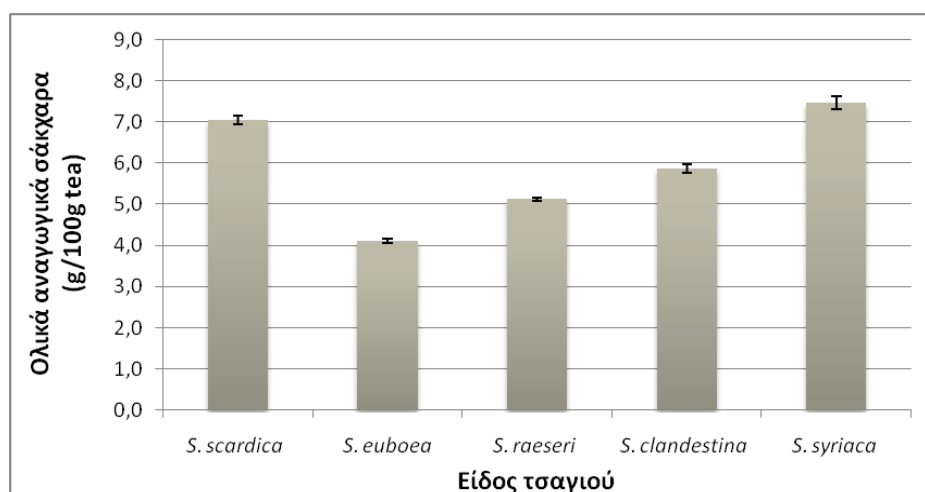
Παρατηρείται ότι υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ κάποιων από τα είδη *Sideritis* στην απώλεια βάρους μετά το πέρας της ενζυμικής και της συμβατικής εκχύλισης. Όμοια με την συμβατική εκχύλιση (παράγραφος 8.1.4), και στην περίπτωση του συνδυασμού μεθόδων, το είδος *Sideritis scardica* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους.

Γλυκόζη και ολικά αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη και τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 8-69 και 8-70.



Διάγραμμα 8-69 Περιεχόμενο γλυκόζης συναρτήσει του είδους τσαγιού

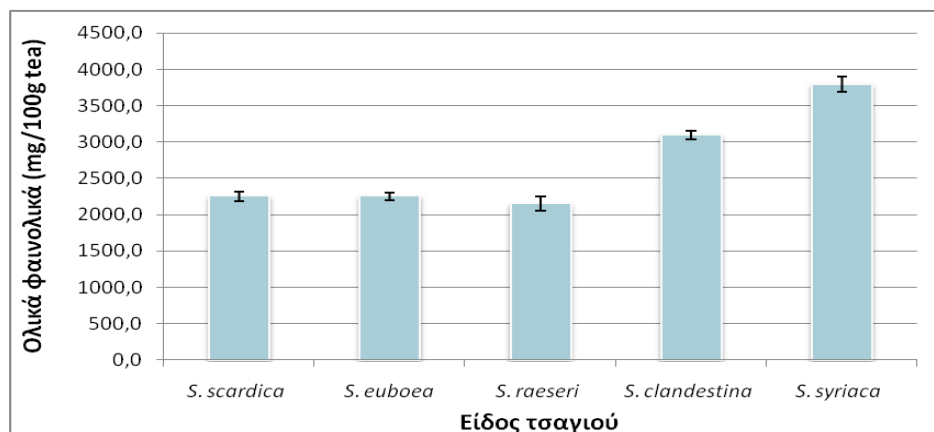


Διάγραμμα 8-70 Περιεχόμενο ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει του είδους τσαγιού

Τα είδη *Sideritis scardica* και *Sideritis syriaca* εμφανίζουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκόζη και ολικά αναγωγικά σάκχαρα, αντίθετα με το είδος *Sideritis Euboea* στο οποίο παρατηρείται χαμηλότερο περιεχόμενο. Επιπλέον, συγκριτικά με το περιεχόμενο που προέκυψε στα εκχυλίσματα της συμβατικής μεθόδου (παράγραφος 8.1.4), παρουσιάζεται σχεδόν διπλάσια περιεκτικότητα γλυκόζης και αρκετά αυξημένη περιεκτικότητα ολικών αναγωγικών σακχάρων.

Ολικά φαινολικά

Στο Διάγραμμα 8-71 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα.

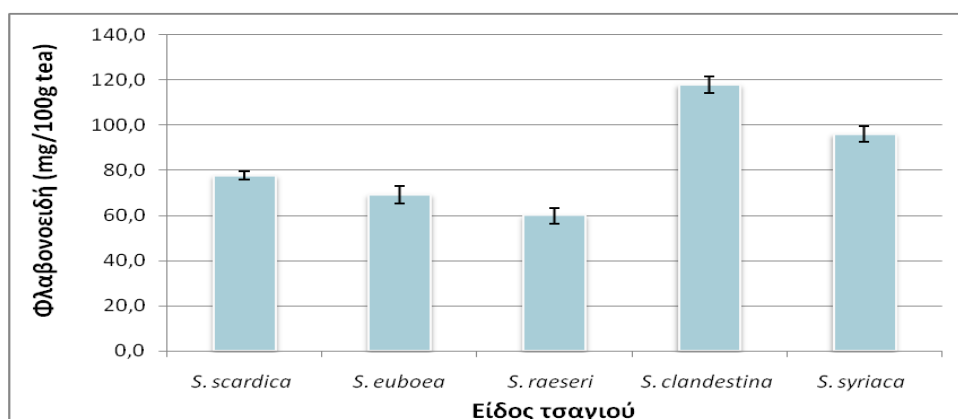


Διάγραμμα 8-71 Περιεχόμενο ολικών φαινολικών στα διαφορετικά είδη τσαγιού

Από το Διάγραμμα 8-71 παρατηρείται ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών. Το είδος *Sideritis Syriaca* είναι αυτό με το πιο πλούσιο περιεχόμενο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως, ανεξαρτήτως το είδος του τσαγιού τα ανακτώμενα ολικά φαινολικά σε αυτή την περίπτωση είναι διπλάσια από αυτά της συμβατικής εκχύλισης.

Φλαβονοειδή

Στο Διάγραμμα 8-72 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα.

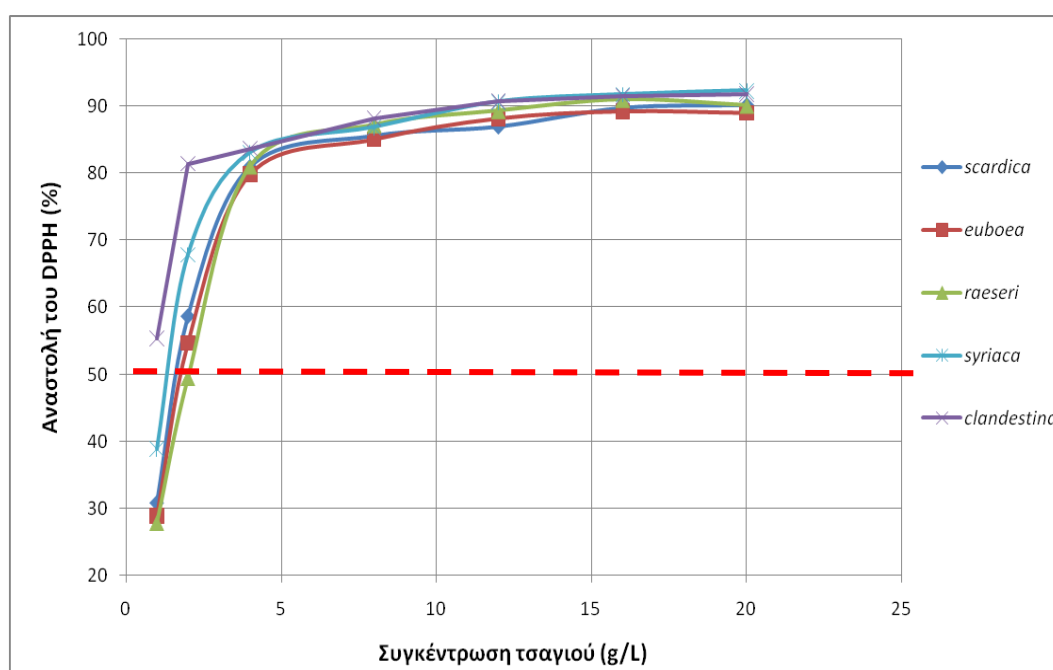


Διάγραμμα 8-72 Περιεχόμενο φλαβονοειδών στα διαφορετικά είδη τσαγιού.

Σχετικά με το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή, παρατηρούνται υψηλές διαφορές μεταξύ των ειδών, με το είδος *Sideritis clandestina* να εμφανίζει σχεδόν διπλάσιο από αυτό του *Sideritis raeseri*. Επιπλέον στο *S. clandestina* εντοπίζεται η υψηλότερη περιεκτικότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη.

Αντιοξειδωτική ικανότητα

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν, με βάση τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του DPPH.



Διάγραμμα 8-73 Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8-62) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή εκφράζει το επί τοις εκατό ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης C του εκχυλίσματος που απαιτείται για την κατά 50% αναστολή. Η μελέτη για την αναστολή της δράσης του DPPH κατά 50% (δείκτης IC_{50}) έγινε μέσω της γραφικής παράστασης της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σχέση με την αναστολή της ρίζας DPPH. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα, υποδηλώνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Πίνακας 8-62 Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

Είδος τσαγιού	IC ₅₀ (g/L)
<i>Sideritis scardica</i>	1,6
<i>Sideritis euboea</i>	1,8
<i>Sideritis raeseri</i>	2,0
<i>Sideritis clandestina</i>	0,8
<i>Sideritis syriaca</i>	1,3

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών, κάποιου είδους τσαγιού του γένους *Sideritis*. Παρόλα αυτά έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε απόβλητα τσαγιού καθώς και στο μαύρο τσάι. Σύμφωνα με τους Han et al. (2016), η εκχύλιση πολυφαινολών από παλιά φύλλα τσαγιού, υποβοηθούμενη από το ένζυμο Celluclast, επιτυγχάνει μέγιστο περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών 7445,00 mg GAE/ 100 g τσαγιού σε συγκέντρωση ενζύμου 2% ο/β. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών αυξάνεται κατά 26,7% συγκριτικά με τα δείγματα της συμβατικής εκχύλισης. Επιπρόσθετα οι Chandini et al. (2011), κατά τη μελέτη βελτίωσης της ποιότητας των εκχυλισμάτων μαύρου τσαγιού με τη βοήθεια ενζυμικής κατεργασίας με χρήση πηκτινάσης, εντόπισαν βελτίωση στην ανάκτηση των πολυφαινολών κατά 14,3%. Σύμφωνα με τους Kim et al. (2010), η προκατεργασία με χρήση ενζύμου αύξησε το περιεχόμενο ολικών φαινολικών σε οργανικά απόβλητα πράσινου τσαγιού. Συγκεκριμένα, μετά τη χρήση κυτταρινάσης από Ασπέργιλλο (*aspergillus niger*) σε διάλυμα θειικού οξέος, η δυνατότητα εκχύλισης των ολικών φαινολικών ενισχύθηκε κατά 132%. Το περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών σε διαλύματα κρύου νερού, ζεστού νερού και θειικού οξέος βρέθηκε ίσο με 3585,45, 4602,94 και 4841,96 mg GAE/ 100 g οργανικού τσαγιού αντίστοιχα. Τέλος, σύμφωνα με τους Lehmberg et al. (1999) η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση τσαγιού, με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων Celluclast και Viscozyme, για pH =5.3, παρουσιάζει ολικά φαινολικά στην ποσότητα των 4280,0 mg GAE/ 100 g τσαγιού.

Παρατηρείται ότι οι τιμές που εντοπίζονται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, διαφέρουν μεταξύ τους, αλλά και με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Σε όλες τις περιπτώσεις βέβαια, παρατηρείται αύξηση των ολικών φαινολικών συστατικών συγκριτικά με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη συμβατική εκχύλιση, σε διάφορα ποσοστά. Ακόμα και στα διαφορετικά είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, το ποσοστό αύξησης των εκχυλιζόμενων ολικών φαινολικών συστατικών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης του κάθε είδους, κυμαίνεται από 52% έως και 97%. Οι διαφορές που εντοπίζονται οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης,

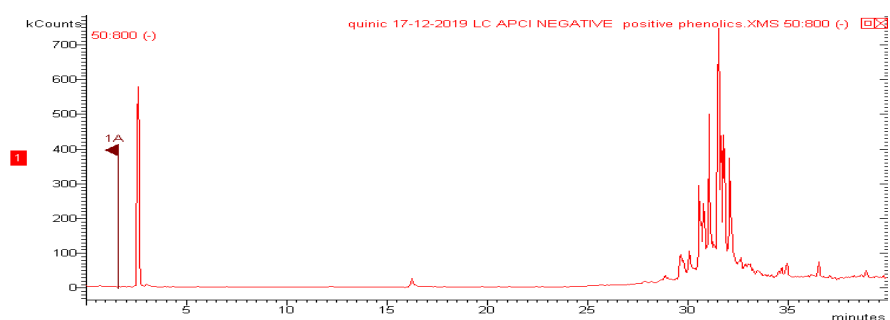
όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης, το pH, η συγκέντρωση του στερεού και η σύσταση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Επιπλέον η χρήση διαφορετικού είδους τσαγιού ή ακόμη και διαφορετικών σημείων του ίδιου είδους, για παράδειγμα χρήση μόνο των φύλλων του τσαγιού, κατά την εκχύλιση είναι πιθανό να επηρεάσει το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά. Τέλος και η περίοδος συγκομιδής του φυτού είναι ένας παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται το φαινολικό του περιεχόμενο.

9 Υγρή χρωματογραφία- Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Προκειμένου να επιτευχθεί ταυτοποίηση ενώσεων των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν, αρχικά μελετήθηκε το φάσμα μάζας κάποιων πρότυπων ουσιών. Από τα γραφήματα αυτά συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με το χρόνο ανάσχεσης κάθε ουσίας και το λόγο m/z , που αποτελούν χαρακτηριστικά μεγέθη της κάθε ένωσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9-1 . Ο λόγος m/z που καταγράφεται αντιστοιχεί στο βασικό ιόν, δηλαδή στην υψηλότερη κορυφή, στην οποία αποδίδεται ένταση 100%.

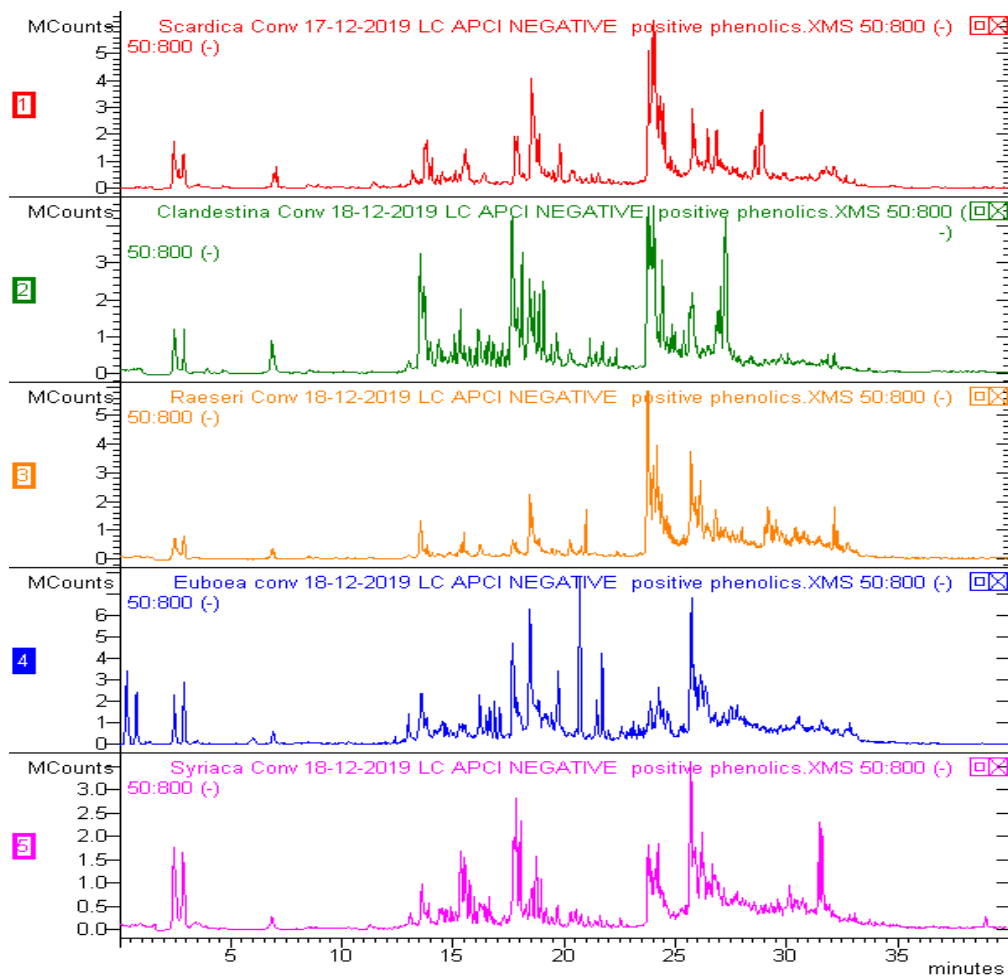
Πίνακας 9-1. Φάσματα μάζας για τις πρότυπες ενώσεις

	RT (min)	m/z
Caffeic acid	08.9	135
Ferulic acid	31.6	339
Quinic acid	02.6	191



Εικόνα 9-1 Χρωματογράφημα ολικών ιόντων αρνητικού ιονισμού του πρότυπου δείγματος κινικού οξέος

Με την τεχνική LC-MS αναλύθηκαν τα διαλύματα που προέκυψαν για όλα τα είδη τσαγιού με συμβατική εκχύλιση, όπως και αυτά με συνδυασμό μεθόδων. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν παρουσιάζονται παρακάτω.



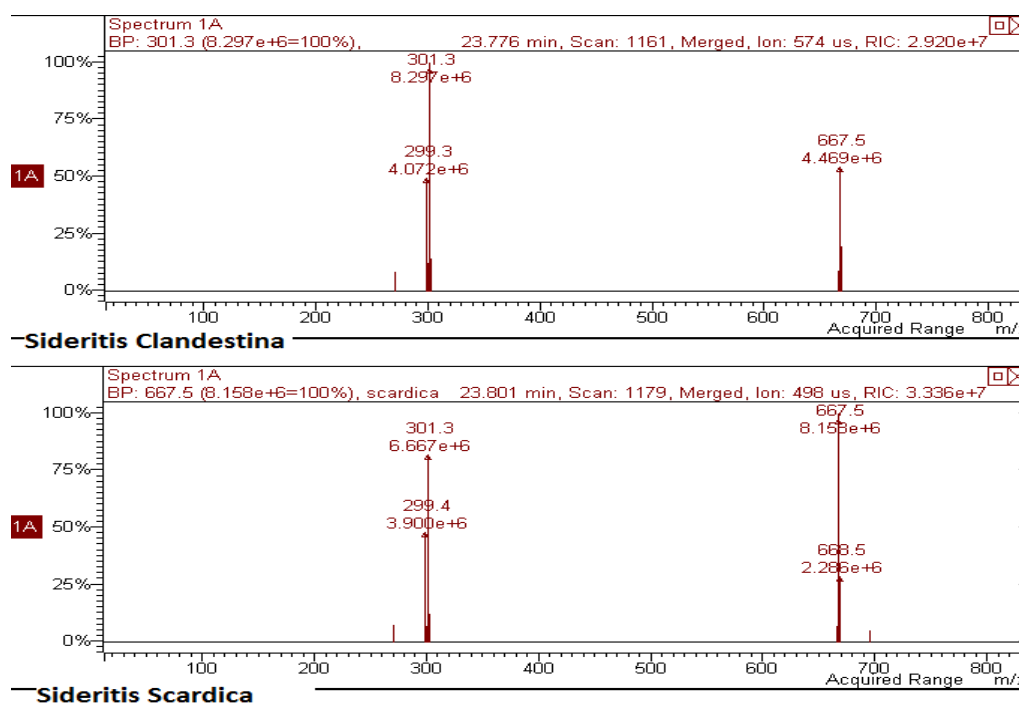
Εικόνα 9-2. Χρωματογραφήματα ολικών ιόντων αρνητικού ιονισμού των δειγμάτων συμβατικής εκχύλισης

Είναι εμφανές πως τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται διαφοροποιούνται ως προς την εμφάνιση και το ύψος ορισμένων κορυφών. Αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται άμεσα με το είδος του τσαγιού που χρησιμοποιήθηκε, καθώς διαφοροποιείται η σύσταση του ανάλογα με τη γεωγραφική του προέλευση.

Αρχικά τα χρωματογραφήματα αυτά συγκρίνονται με εκείνα των πρότυπων ουσιών με σκοπό την ταυτοποίηση ενώσεων. Σε όλα τα δείγματα τσαγιού παρατηρούνται κορυφές που αποδίδονται στο φερουλικό οξύ (RT= 31.6 min, m/z: 339) και στο κινικό οξύ (RT=2.6 min, m/z: 191). Επιπλέον σε χρόνο 6.9 min εμφανίζεται κορυφή με λόγο m/z: 191 (100%) και 353. Με τη βοήθεια της διεθνούς βιβλιογραφίας εντοπίζεται πως η κορυφή αυτή μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στο 3-Caffeoylquinic acid ή στο 5-Caffeoylquinic acid, για τα οποία $[M-H]^- = 353$ και $-MS^2[M-H]^- = 191$.

Για υπόλοιπες κορυφές που παρουσιάζονται στα χρωματογραφήματα, γίνεται προσπάθεια ταυτοποίησης τους με χρήση βιβλιογραφικών πηγών. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι οι υψηλότερες κορυφές που παρουσιάζονται στα είδη *Sideritis scardica*, *Sideritis clandestina* και *Sideritis raeseri* (Εικόνα 8-2) εμφανίζονται σε χρόνο

23.8 min με m/z : 301, 668 και πιθανώς αποδίδονται σε κάποιους γλυκοζίτες της υπολαετίνης (Hypolaetin 7-O-[2''',6'''-di-O-acetyl]allosyl(1 →2)glucoside με $[AGlyc-H]^- = 301$, Hypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]-allosyl(1 → 2)glucoside) με $[M]^- = 668$ και $[AGlyc-H]^- = 301$. Τα συγκεκριμένα ιόντα εντοπίζονται και στα υπόλοιπα είδη τσαγιού στο χρόνο αυτό, ενώ χαρακτηριστική είναι η παρουσία του ιόντος με λόγο m/z : 301 σε διάφορους χρόνους ανάλυσης για το κάθε είδος.



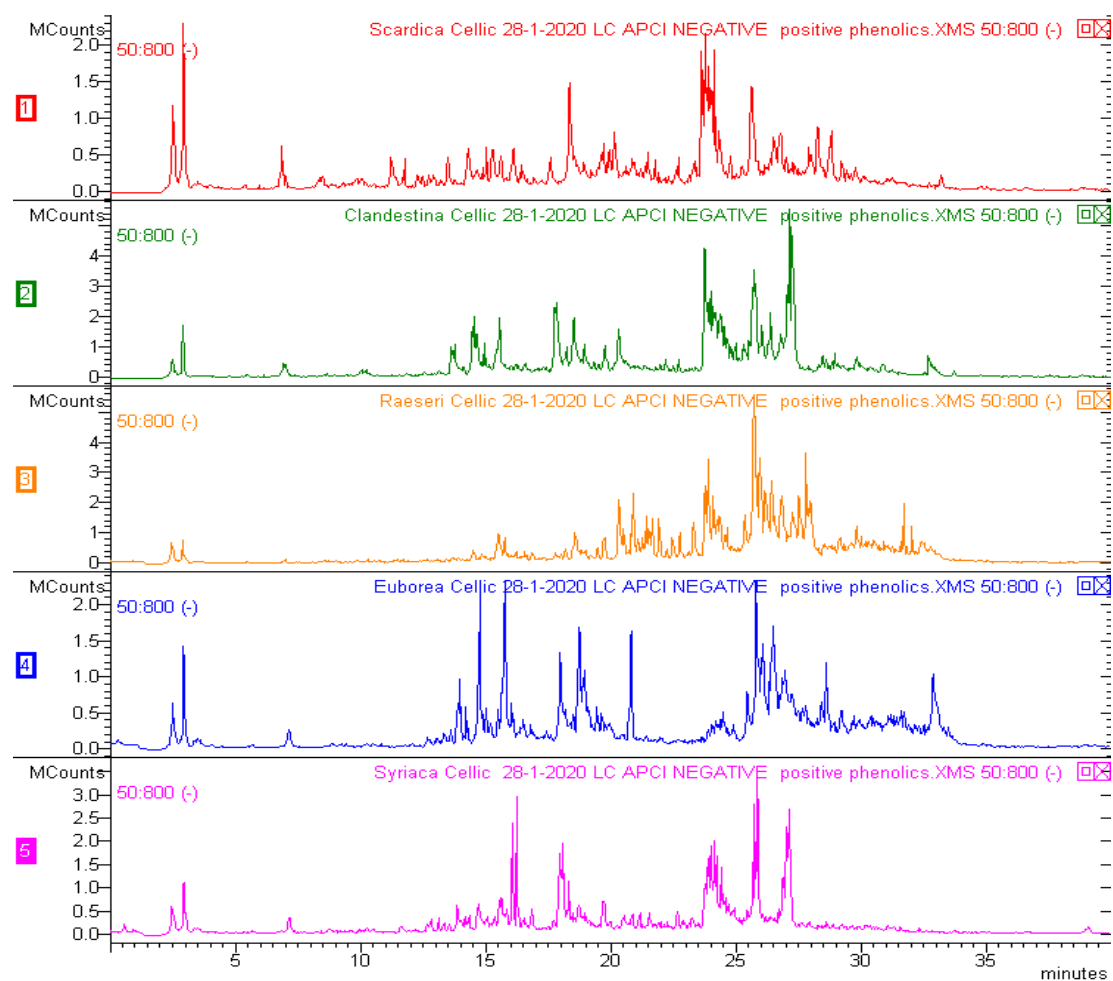
Εικόνα 9-3. Φάσμα μαζών της κορυφής υψηλότερης έντασης για τα είδη *Sideritis Clandestina* και *Sideritis Scardica*.

Η υψηλότερη κορυφή του χρωματογραφήματος του *Sideritis syriaca* εντοπίζεται σε χρόνο 25.7 min με ιόντα λόγου m/z : 578 και 269. Αξίζει να σημειωθεί ότι και αυτές οι κορυφές εμφανίζονται σε όλα τα είδη τσαγιού με αρκετά υψηλή ένταση. Το ιόν m/z : 269 μπορεί να οφείλεται στον γλυκοζίτη της απιγενίνης, Apigenin 7-O-[6'-O-acetyl]-allosyl(1→2)glucoside, όπου $[AGlyc-H]^- = 269$.

Τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις εμφανίζει το είδος *Sideritis euboica*. Ενώ τα ιόντα που εμφανίζονται είναι ίδια με αυτά των υπόλοιπων τσαγιών, παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές στην ένταση του φάσματος συναρτήσει του χρόνου ανάλυσης. Για $t=20.7$ min το είδος αυτό παρουσιάζει μια κορυφή, η οποία αποτελεί και την κορυφή υψηλότερης έντασης του χρωματογραφήματος, που δεν εντοπίζεται σε κανένα άλλο από τα εξεταζόμενα είδη στο χρόνο αυτό. Τα ιόντα που αντιστοιχούν στην κορυφή αυτή έχουν λόγο m/z : 315 και 285. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα ιόντα αυτά είναι πιθανό να αποδοθούν είτε σε φαίνυλο-αιθανοϊκούς γλυκοζίτες (π.χ. Echinacoside, Forsythoside, Verbascoside) είτε σε ακέτυλο-γλυκοζίτες φλαβονοειδών (π.χ. Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl]allosyl(1→2) glucoside,

Isoscutellarein 7-O-[2''',6'''-di-O-acetyl]allosyl(1→2)glucoside με [AGlyc-H]⁻ =285, 3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[2''',6'''-di-O-acetyl]allosyl(1→2)glucoside, 3'-O-Methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl]allosyl(1→2)glucoside) με [AGlyc-H]⁻ =315. Οι ακέτυλο-γλυκοζίτες φλαβονοειδών δίνουν επιπλέον ιόντα με λόγο m/z: 651 και 681 που επίσης εντοπίζονται στα χρωματογραφήματα όλων των ειδών τσαγιού.

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από το συνδυασμό συμβατικής και ενζυμικής εκχύλισης στα πέντε είδη τσαγιού.

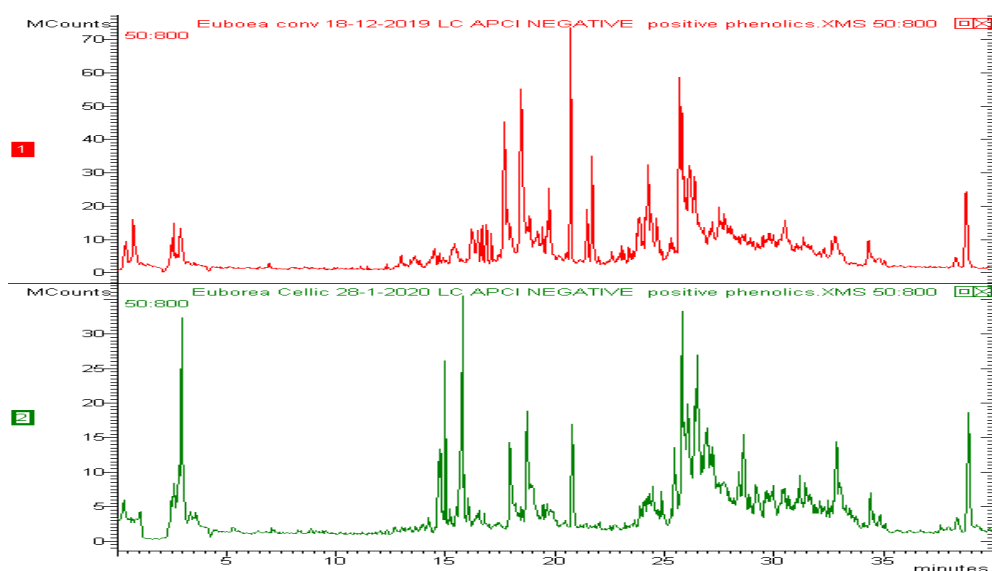


Εικόνα 9-4 Χρωματογραφήματα ολικών ιόντων αρνητικού ιονισμού των δειγμάτων από συνδυασμό συμβατικής εκχύλισης και EYE

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα, ανά είδος τσαγιού, με το αντίστοιχο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος συμβατικής εκχύλισης, επιβεβαιώνεται η παρουσία των ιόντων που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Παρ' όλα αυτά εντοπίζονται διαφορές στο χρόνο ανάσχεσης κάποιων ιόντων και στην ένταση των κορυφών. Για τα είδη *Sideritis clandestina*, *Sideritis scardica* και *Sideritis raeseri* οι διαφορές είναι

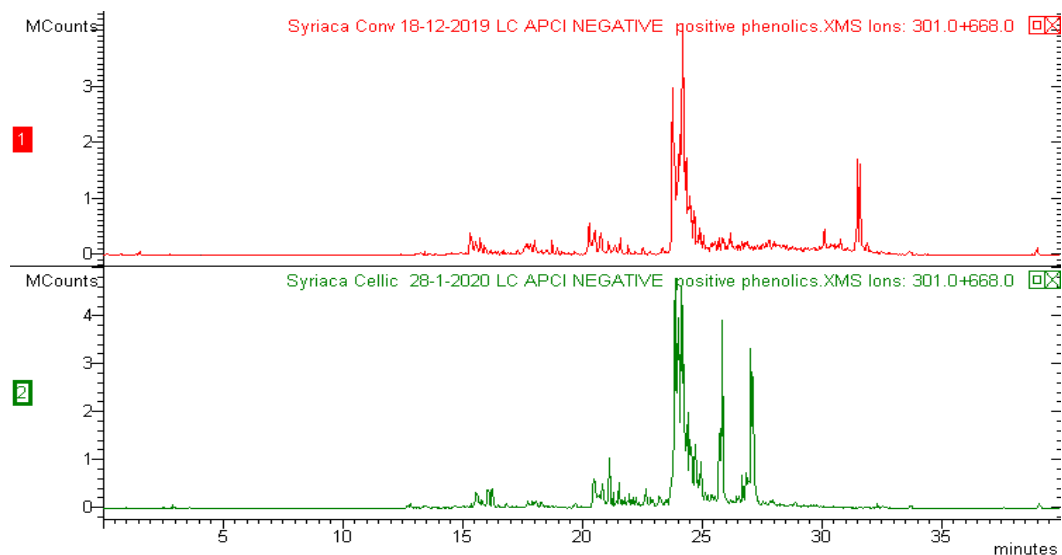
μικρές. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι οι κορυφές που εμφανίζονται στην αρχή του φάσματος ($t=2.97$ min), έχουν μεγαλύτερη ένταση σε σχέση με τα αντίστοιχα γραφήματα της συμβατικής εκχύλισης, η οποία αποδίδεται σε ιόν με m/z : 147. Η διαφορά αυτή είναι εμφανής και στα άλλα δύο είδη *Sideritis* και πιθανώς οφείλεται σε παράγωγα αμίνης. Το αποτέλεσμα αυτό θεωρείται απόλυτα λογικό, καθώς τα ένζυμα περιέχουν αμινο-ομάδες οι οποίες ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Στο είδος *Sideritis clandestina* της ΕΥΕ εντοπίζεται κορυφή σε $t=30.7$ min με λόγο m/z : 285 και 267. Επιπλέον, για το εκχύλισμα του *Sideritis scardica*, οι ενώσεις που αντιστοιχούν στις κορυφές για $t=25-30$ min δεν διαφοροποιούνται, αλλά η ένταση του είναι υψηλότερη στα δείγματα της συμβατικής εκχύλισης.

Όσον αφορά το είδος *Sideritis euboica*, εντοπίζονται κορυφές, στο χρωματογράφημα της ΕΥΕ, για χρόνο 14.81 min και 15.76 min με βασικό ιόν λόγου m/z : 285 και 315 αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα τα ιόντα αυτά πιθανώς αποδίδονται σε φαινυλο-αιθανοικούς γλυκοζίτες ή σε φλαβονοειδείς ακέτυλο-γλυκοζίτες. Επιπλέον η ένταση της κορυφής σε χρόνο 20.7 min είναι αρκετά μειωμένη, ενώ απουσιάζει η κορυφή στα 21.7 min, η οποία επίσης αντιστοιχούσε σε ιόντα λόγου m/z : 315 και 285.



Εικόνα 9-5. Χρωματογραφήματα του *Sideritis Euboica* από συμβατική εκχύλιση (πάνω-κόκκινο) και από συνδυασμό μεθόδων (κάτω-πράσινο).

Τέλος συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων *Sideritis syriaca* παρατηρείται ότι ενώ η ένταση των κορυφών παραμένει σχεδόν ίδια, ο χρόνος ανάσχεσης τους έχει μειωθεί. Για παράδειγμα κορυφή που εντοπίζεται στο δείγμα της συμβατικής εκχύλισης για χρόνο 31.5 min και αποδίδεται σε ιόντα m/z : 269 και 299, στο εκχύλισμα που προέκυψε από το συνδυασμό μεθόδων εμφανίζεται στα 27.2 min.



Εικόνα 9-6. Χρωματογράφημα των ιόντων m/z : 301 και 668 στα δείγματα *Sideritis Syriaca* από συμβατική εκχύλιση (πάνω- κόκκινο) και από συνδυασμό μεθόδων (κάτω- πράσινο)

Εν κατακλείδι, έγινε ταυτοποίηση ορισμένων ενώσεων που είναι χαρακτηριστικές στο είδος *Sideritis*. Εξετάστηκαν επιπλέον πιθανές διαφοροποιήσεις στις ενώσεις που εντοπίζονται μεταξύ των ειδών του αλλά και των μεθόδων εκχύλισης. Μελετώντας τα χρωματογραφήματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι σε όλα τα δείγματα περιέχονται φαινυλο-αιθανοϊκοί γλυκοζίτες και φλαβονοειδείς ακέτυλο-γλυκοζίτες. Επιπλέον επιτεύχθηκε ταυτοποίηση κινικού και φερουλικού οξέος, ή παραγώγων τους, με σύγκριση των φασμάτων των εκχυλισμάτων με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση των πρότυπων ουσιών. Τονίζεται, ότι η ταυτοποίηση όλων των ενώσεων αυτών, δεν θεωρείται απόλυτη, καθώς βασίζεται στο φάσμα μάζας των ουσιών χωρίς τον αντίστοιχο χρόνο ανάλυσης και σε αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές (Petreska et al., 2011; Sahin et al., 2006). Με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των συστατικών που περιέχονται στα είδη του *Sideritis* καθώς και των διαφοροποιήσεων μεταξύ τους. Παρόλο που τα ίδια ιόντα εντοπίστηκαν σε όλα τα είδη τσαγιού, η ένταση των κορυφών και ο χρόνος ανάλυσης τους μεταβάλλεται σε κάποιες περιπτώσεις. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς η σύσταση κάθε είδους και η περιεκτικότητά του σε βιοδραστικά συστατικά διαφοροποιείται.

10 Φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) & (ICP-OES)

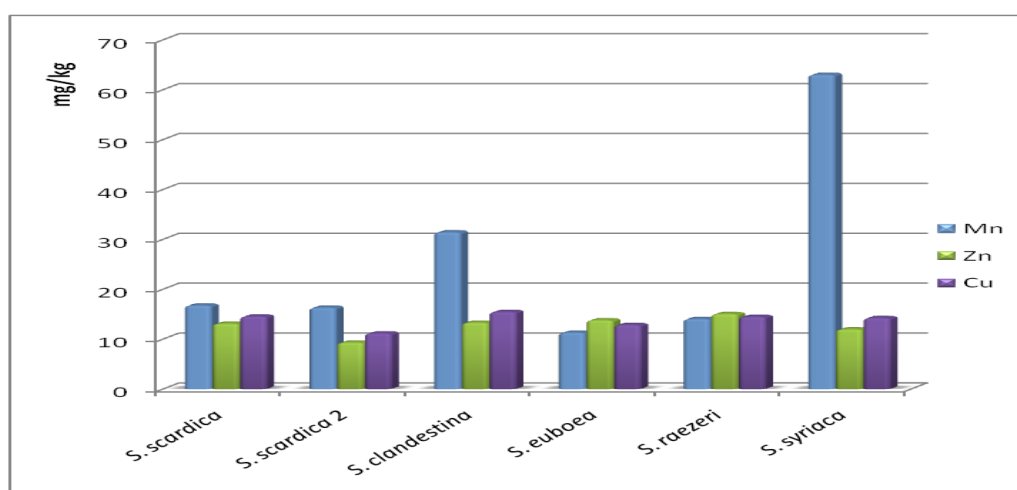
Με τη βοήθεια της τεχνικής ICP-MS και ICP-OES γίνεται μια πρώτη εκτίμηση του περιεχομένου σε μέταλλα και σπάνιες γαίες, στα πέντε διαφορετικά είδη τσαγιού. Συγκεκριμένα στα δείγματα προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε σίδηρο (Fe),

μαγγάνιο (Mn), χαλκό (Cu), ψευδάργυρο (Zn), ύτριο (Y), σκάνδιο (Sc), λανθάνιο (La), σαμάριο (Sm), ευρώπιο (Eu), δημήτριο (Ce), δυσπρόσιο (Dy), πρασινοδύμιο (Pr), νεοδύμιο (Nd), γαδολίνιο (Gd), τέρβιο (Tb), όλμιο (Ho), έρβιο (Er), θούλιο (Tm), υτέρβιο (Yb), λουτήτιο (Lu), θόριο (Th) και ουράνιο (U) . Τα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Στα περισσότερα φυτά η απορρόφηση ανόργανων στοιχείων συμβαίνει αποκλειστικά μέσω των ριζών τους, οι οποίες προσλαμβάνουν τα ιόντα μέσω του υδατικού διαλύματος που τα περιβάλλει. Μικροποσότητες μπορούν επίσης να απορροφηθούν από τα φύλλα μέσω της βροχής ή μέσω καλλιεργητικών πρακτικών (π.χ. ψεκασμός με θρεπτικό λίπασμα). Ως αποτέλεσμα αυτού η σύσταση, και κατ' επέκταση το pH, του εδάφους επηρεάζει σημαντικά την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά. Για παράδειγμα η απορρόφηση νικελίου, κοβαλτίου και μαγγανίου ευνοείται από όξινες συνθήκες. Επομένως γίνεται μελέτη των διαφοροποιήσεων, που ενδεχομένως παρουσιάζουν , τα είδη του τσαγιού ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση.

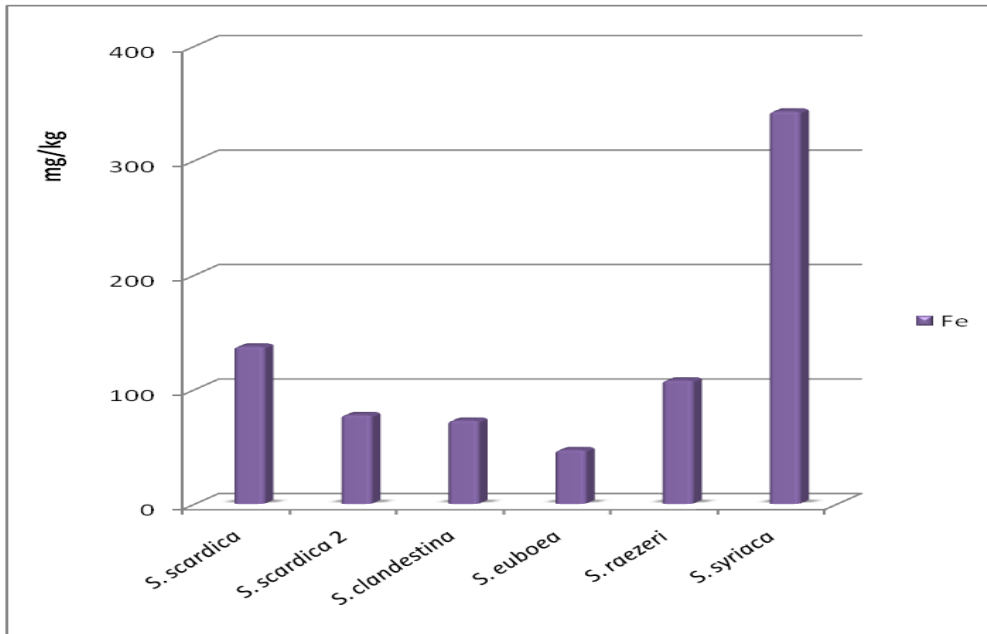
Το δείγμα *Sideritis scardica* 2, είναι δείγμα τσαγιού του Ολύμπου που αγοράστηκε από το εμπόριο διαφορετικό από το δείγμα *Sideritis scardica*.

Στο Διάγραμμα 10-1 παρουσιάζεται το περιεχόμενο των ειδών σε μαγγάνιο, ψευδάργυρο και χαλκό.



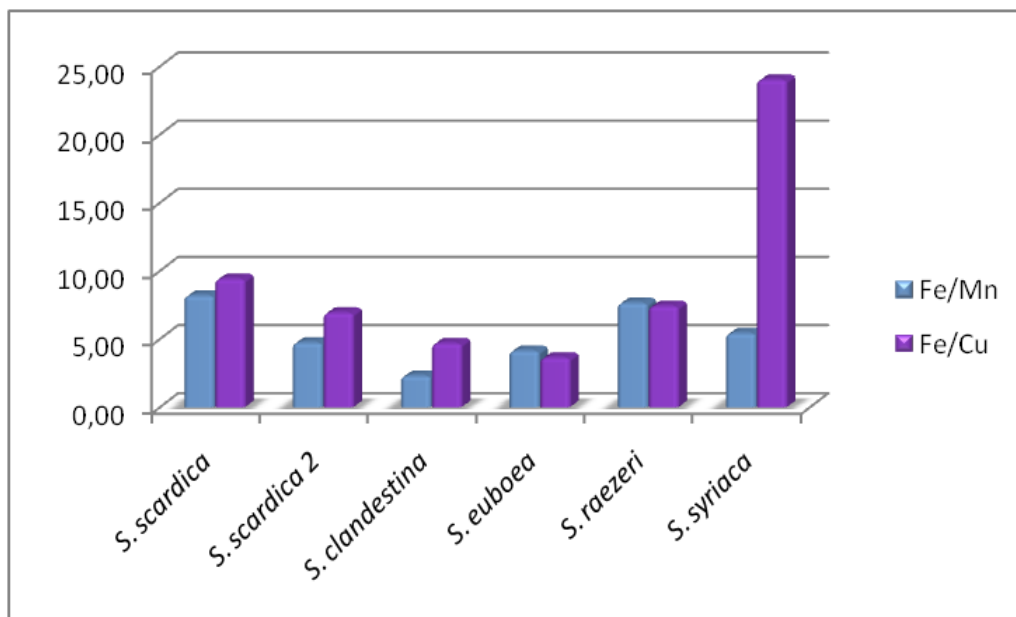
Διάγραμμα 10-1 Περιεκτικότητα ειδών τσαγιού σε Mn, Zn, Cu

Παρατηρείται ότι το περιεχόμενο ψευδαργύρου και χαλκού δεν διαφοροποιείται μεταξύ των ειδών, ενώ το περιεχόμενο σε μαγγάνιο εμφανίζει αύξηση στα δείγματα *Sideritis clandestina* και *Sideritis syriaca* με το δεύτερο να υπερिशύχει κατά πολύ των υπολοίπων. Ως προς την περιεκτικότητα σε σίδηρο το είδος *Sideritis syriaca* εμφανίζει επίσης υψηλή συγκέντρωση σιδήρου όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10-2. ενώ το *Sideritis clandestina* και το *Sideritis euboica* εμφανίζουν το χαμηλότερο περιεχόμενο σιδήρου Fe.



Διάγραμμα 10-2 Περιεκτικότητα ειδών τσαγιού σε σίδηρο Fe

Επιπλέον εξετάζονται οι λόγοι των στοιχείων αυτών Fe/Mn και Fe/Cu, οι οποίοι παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10-3.

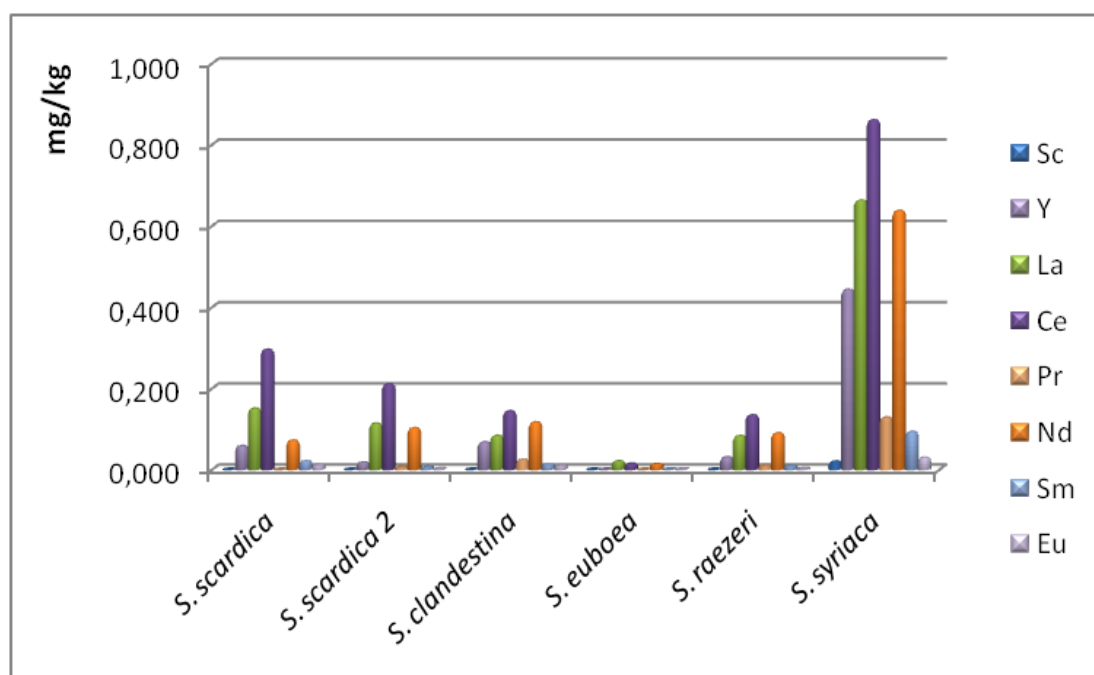


Διάγραμμα 10-3 Λόγοι μετάλλων Fe/Mn και Fe/Cu ανά είδος τσαγιού

Παρατηρείται πως η μορφή του διαγράμματος του λόγου Fe/Cu είναι όμοια με αυτή του Διαγράμματος 10-2 για το σίδηρο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η περιεκτικότητα σε σίδηρο παρουσιάζει έντονες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων σε

αντίθεση με την περιεκτικότητα σε χαλκό που παραμένει σχεδόν σταθερή μεταξύ των διαφορετικών τσαγιών. Αντιθέτως μικρή μεταβολή εντοπίζεται στο λόγο Fe/Mn μεταξύ των δειγμάτων. Με εξαίρεση το δείγμα της Κρήτης που διαφοροποιείται ως προς την υψηλή συγκέντρωση σιδήρου και μαγγανίου, προκύπτει ότι τα στοιχεία αυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια ως δείκτες προέλευσης. Επιπρόσθετα η παρουσία των συγκεκριμένων στοιχείων επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές πρακτικές

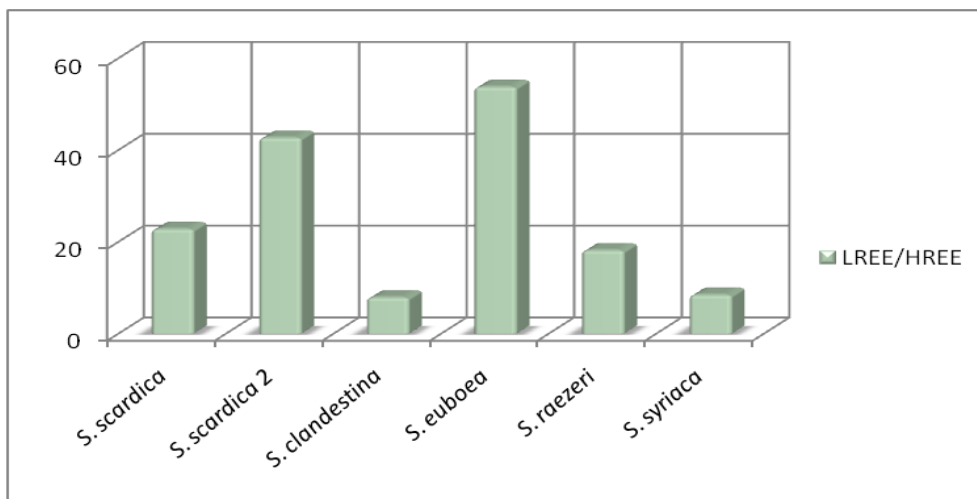
Οι σπάνιες γαίες περιλαμβάνουν τα στοιχεία σκάνδιο, ύτριο και τις λανθανίδες και συνδέονται άμεσα με τη γεωλογία της κάθε περιοχής επομένως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης γεωγραφικής προέλευσης. Οι λανθανίδες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες: τις ελαφριές σπάνιες γαίες (LREEs) από λανθάνιο έως ευρώπιο και τις βαριές σπάνιες γαίες (HREEs) από γαδολίνιο έως λουτέσιο. Συνήθως βρίσκονται σε τρισθενή κατάσταση εκτός από το Ce^{+4} και το Eu^{+2} , ανάλογα με τις αναγωγικές/οξειδωτικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Στο Διάγραμμα 10-4 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα ανά είδος τσαγιού ορισμένων σπάνιων γαιών. Είναι φανερό ότι σε όλα τα δείγματα η παρουσία δημητρίου (Ce) υπερिशύει των υπολοίπων, ενώ το σκάνδιο (Sc), το σαμάριο (Sm) και το ευρώπιο (Eu) εντοπίζονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση ή ακόμα και καθόλου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή συγκέντρωση που προσδιορίζεται στο είδος *Sideritis syriaca*, για όλα τα προς εξέταση στοιχεία καθώς και το αρκετά χαμηλό περιεχόμενο σε σπάνιες γαίες του είδους *Sideritis euboica*.



Διάγραμμα 10-4 Περιεκτικότητα σε Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm και Eu ανά είδος τσαγιού

Στο Διάγραμμα 10-5 δίνεται ο λόγος LREE/HREE. Παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα η περιεκτικότητα των ελαφριών σπάνιων γαιών υπερिशύει. Ενδιαφέρων παρουσιάζει η μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο δειγμάτων *Sideritis*

scardica. Η υψηλότερη τιμή του λόγου στο δείγμα *Sideritis scardica* 2 οφείλεται στην χαμηλότερη περιεκτικότητα σε βαριές σπάνιες γαίες που εντοπίστηκε κατά τη συγκεκριμένη ανάλυση. Όμοια η υψηλή τιμή του λόγου για το είδος *Sideritis Euboea* οφείλεται στην πολύ χαμηλή συγκέντρωση HREE's που εντοπίστηκε στο δείγμα.



Διάγραμμα 10-5 Λόγος LREEs/HREEs για τα είδη *Sideritis*

Συμπερασματικά παρατηρείται ότι για τα είδη *Sideritis scardica*, *Sideritis raeseri* και *Sideritis clandestina* δεν εντοπίζονται διαφορές μεταξύ του περιεχομένου τους σε μέταλλα και σπάνιες γαίες. Τα δύο δείγματα *Sideritis scardica* παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα και οι μικρές διακυμάνσεις που παρατηρούνται θεωρούνται αμελητέες και πιθανώς οφείλονται στην περίοδο συγκομιδής του κάθε δείγματος ή στο ακριβές σημείο βλάστησης του. Στο είδος *Sideritis euboea* εντοπίστηκαν όλα τα στοιχεία σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Αντιθέτως το είδος *Sideritis syriaca*, βρέθηκε να είναι αυτό με το πιο πλούσιο περιεχόμενο σε μέταλλα και σπάνιες γαίες. Οι διαφορές που παρουσιάζει συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη είναι πολύ υψηλές και εκτιμώνται ως χαρακτηριστικές του είδους.

Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και αποτελούν μια πρώτη ένδειξη σχετικά με τη χρήση της περιεκτικότητας σε μέταλλα και σπάνιες γαίες ως δείκτη της γεωγραφικής προέλευσης των ειδών του γένους *Sideritis*. Παρόλα αυτά, για επιβεβαίωση και γενίκευση των αποτελεσμάτων σε κάθε είδος, απαιτείται χημειομετρική μελέτη του γένους *Sideritis*, η έκταση της οποίας δεν μπορεί να συμπεριληφθεί στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Συμπεράσματα

Βάση των αποτελεσμάτων αλλά και της υγρής χρωματογραφίας με φασματομέτρο μάζας (LC-MS) και της φασματομετρίας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS και ICP-OES) εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

Από τον προσδιορισμό του λιγνοκυτταρινούχου περιεχομένου αλλά και της υγρασίας σε δείγματα τσαγιού *Sideritis scardica* προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα. Το ποσοστό υγρασίας είναι ίσο με $6,68\% \pm 0,07$ του βάρους του, το ποσοστό κυτταρίνης βρέθηκε ίσο με $14,53\% \pm 0,55$ επί του ξηρού βάρους, ενώ το ποσοστό ημικυτταρίνης ισούται με $45,21\% \pm 0,13$ επί του ξηρού βάρους. Το σύνολο της λιγνίνης του δείγματος αποτελεί το $25,89\% \pm 2,5$ επί του ξηρού βάρους και το ανόργανο υπόλειμμα τέφρας υπολογίστηκε ίσο με $4,6\%$.

Από το σύνολο των παραγόντων της συμβατικής εκχύλισης που μελετήθηκαν, προέκυψε ότι η περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη έχει βέλτιστη επίδραση σε ποσοστό 60% ο/ο. Μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης προσφέρει καλύτερα αποτελέσματά ως προς το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά, αλλά επιδρά αρνητικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Αυτό, πιθανώς οφείλεται στην καταστροφή των αντιοξειδωτικών συστατικών του τσαγιού σε μεγαλύτερους χρόνους κατεργασίας. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του στερεού στο εκχυλιζόμενο δείγμα, δεν εντοπίζεται σημαντική επίδραση στα ανακτώμενα συστατικά.

Ο συνδυασμός της ενζυμικά υποβοηθούμενης με τη συμβατική εκχύλιση, αποδείχθηκε ότι οδηγεί σε καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με τη χρήση της απλής συμβατικής μεθόδου. Από τον σχεδιασμό Taguchi προκύπτει ότι, κατά την EYE με ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec2 ή Viscozyme, ισχυρότερη επίδραση έχει ο παράγοντας του χρόνου. Επιπλέον με χρήση $2,5$ Units/g DM του σκευάσματος Cellic CTec2 για EYE διάρκειας δύο ωρών, προκύπτουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Οι προβλεπόμενες μέγιστες τιμές από τον σχεδιασμό Taguchi σε ολικά φαινολικά συστατικά είναι $TPC=2488,21$ mg/ 100 g τσαγιού, σε φλαβονοειδή $TFC= 105,33$ mg/ 100 g τσαγιού, και η αντιοξειδωτική ικανότητα με $IC_{50}=3.5$ g/L. Από την άλλη, από τη συνεργιστική δράση μεταξύ Cellic CTec2 και HTec2, βασικός παράγοντας σχεδιασμού αποδείχθηκε το ενζυμικό φορτίο του Cellic CTec2, και προέκυψαν καλύτερα αποτελέσματα απ ότι με την EYE με Viscozyme. Με χρήση του συνδυασμού μεθόδων επιτυγχάνεται ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών όμοια με αυτή της συμβατικής εκχύλισης 72 ωρών. Από την τελευταία λαμβάνονται τα εξής αποτελέσματα ως προς τα ολικά φαινολικά συστατικά $TPC= 3642,4 \pm 111,8$ mg/ 100 g τσαγιού, τα φλαβονοειδή $TFC= 110,98 \pm 10,13$ mg/ 100 g τσαγιού, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα βελτιώνεται καθώς από τη συμβατική εκχύλιση 72 ωρών προκύπτει $IC_{50}= 23,4$ g/L.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά τη συμβατική εκχύλιση αλλά και τον συνδυασμό της με ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, στα διαφορετικά είδη τσαγιού του γένους *Sideritis*, συγκρίνονται μεταξύ τους. Το είδος *Sideritis syriaca*

παρουσιάζει το υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά TPC= 2312,8 ± 107,6 mg/ 100 g τσαγιού για τη συμβατική εκχύλιση και 3796.3 ± 75.1 mg/ 100 g τσαγιού στην περίπτωση της ΕΥΕ. Ακολουθεί το είδος *Sideritis clandestina* με TPC= 1570,5 ± 103,1 mg/ 100 g τσαγιού για τη συμβατική εκχύλιση και 3095,1 ± 61,4 mg/ 100 g τσαγιού στην ΕΥΕ. Τα είδη *Sideritis scardica* και *Sideritis euboica* παρουσιάζουν περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών, στην περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης, ίσο με 1480,4 ± 43,4 mg/ 100 g τσαγιού και 1251,9 ± 80,0 mg/ 100 g τσαγιού αντίστοιχα. Ενώ μετά την προκατεργασία με ένζυμο το περιεχόμενο τους αυξάνεται σε 2254,1 ± 66,8 mg/ 100 g τσαγιού και 2253,2 ± 55,7 mg/ 100 g τσαγιού αντίστοιχα. Το είδος *Sideritis raeseri* εμφανίζει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, 1135,7 ± 40,8 mg/ 100 g τσαγιού μετά από συμβατική εκχύλιση και 2154,8 ± 100,2 mg/ 100 g τσαγιού μετά το συνδυασμό μεθόδων. Επιπλέον, στο τελευταίο εντοπίζεται το χαμηλότερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή συστατικά και η μικρότερη ικανότητα δέσμησης των ελεύθερων ριζών συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη.

Αναφορικά με την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (LC-MS), τονίζεται ότι η εξαγωγή συμπερασμάτων γίνεται βάση των φασμάτων μάζας των ουσιών, χωρίς τον αντίστοιχο χρόνο ανάλυσης. Με χρήση των χρωματογραφημάτων των πρότυπων ουσιών, που δημιουργήθηκαν, επιτεύχθηκε ταυτοποίηση κινικού και φερουλικού οξέος σε όλα τα δείγματα *Sideritis*. Επίσης επιτυγχάνεται αναγνώριση φαινυλο-αιθανοϊκών γλυκοζιτών και φλαβονοειδών ακέτυλο-γλυκοζιτών. Μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Sideritis* εντοπίζονται διαφορές στην ένταση των κορυφών αλλά και στο χρόνο ανάλυσης ορισμένων ιόντων. Οι διαφορές αυτές είναι ενδεικτικές της διαφορετικής σύστασης του κάθε είδους.

Επιπλέον με χρήση φασματομετρίας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με φασματομετρία μάζας (ICP-MS) & (ICP-OES)) γίνεται ανάλυση του περιεχομένου όλων των ειδών σε μέταλλα και σπάνιες γαίες, με σκοπό τη χρήση τους ως δείκτες γεωγραφικής προέλευσης. Μεταξύ των ειδών *Sideritis scardica*, *Sideritis raeseri* και *Sideritis clandestina* δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο τους. Το είδος *Sideritis syriaca*, είναι αυτό με το πιο πλούσιο περιεχόμενο σε μέταλλα και σπάνιες γαίες. Για επιβεβαίωση και γενίκευση των αποτελεσμάτων σε κάθε είδος, απαιτείται χημειομετρική μελέτη του γένους *Sideritis*, η έκταση της οποίας δεν μπορεί να συμπεριληφθεί στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Σε κάθε περίπτωση, για το σχηματισμό πληρέστερης εικόνας σχετικά με το προφίλ των εκχυλισμάτων του φυτού *Sideritis* καθώς και των διαφοροποιήσεων που παρουσιάζονται μεταξύ των ειδών, υπάρχουν πολλές προοπτικές έρευνας.

Βιβλιογραφία

Ainsworth E.A., Gillespie K.M., (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nature protocols*.

Ak T and Gulcin I. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.*, 174 pp. 27–37.

Akar Z., Küçük M., Doğan H., (2017). A new colorimetric DPPH[·] scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32, 640-647.

Amarowicz R., (2007). Tannins: the new natural antioxidants?, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (6), pp.549-551

Aruoma O.I., Cuppett S.L., (1997). Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts, *The American Oil Chemists Society*.

Aslan İ., Kiliç T., Gören A.C. & Topçu G., (2006). Toxicity of acetone extract of *Sideritis trojana* and 7-epicandicandiol, 7-epicandicandiol diacetate and 18-acetylsideroxol against stored pests *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitophilus granarius* (L.) and *Ephestia kuehniella* (Zell.). *Industrial crops and products*, 23(2), 171-176.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F. & Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Azwanida N. N., (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.

Baden C., & Sideritis, L. (1991). *Mountain Flora of Greece*, Vol. 2

Barber J.C., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Turner K.G. & Jansen, R. K. (2002). Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. *Molecular Phylogenetics and*

Baby K.C. & Ranganathan V. (2013). Enzyme -Assisted extraction of Bioingredients. *Chemical weekly*. VOL.LIX/OCTOBER 1, 213 - 224.

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, 191-203.

Belitz D., Grosch W., Schieberle P., (2015). «Χημεία Τροφίμων», Εκδόσεις Τζιόλα ISBN 978960-418-367-8, ch. 3,6,18

Benucci I., Segade S. R., Cerreti M., Giacosa S., Paisonni M. A., Liburdi K., et al. (2017). Application of enzyme preparations for extraction of berry skin phenolics in withered winegrapes. *Food Chemistry*, 237, 756–765

Bozin Biljana, Mimica-Dukic Neda, Simin Natasa and Anackov Goran, (2006). Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils, *J. Agric. Food Chem.*, , 54 (5), pp 1822–1828

Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.

Bruno, M., Rosselli, S., Pibiri, I., Kilgore, N., & Lee, K. H. (2002). Anti-HIV Agents Derived from the ent-Kaurane Diterpenoid Linearol. *Journal of natural products*, 65(11), 1594-1597.

Butnariu M. and I. Samfira, (2012). "Free radicals and oxidative stress." *J Bioequiv Availab*: 4-6.

Carocho M., Ferreira I.C., (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.

Chamorro S., Viveros A., Alvarez I., Vega E., & Brenes A., (2012). Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, 133, 308–314

Chandini S.K., Rao L.J., Gowthaman M.K., Haware D.J., & Subramanian R. (2011). Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chemistry*, 127(3), 1039–1045.

Cheng X., L. Bi, Z. Zhao, Y. Chen, *Advances in enzyme assisted extraction of natural products*, AER-Advances in Engineering Research, 3rd ed.; Yarlagadda, P., Ed, (2015) 371-375.

Dantas Fernandes A.J, Assunção Ferreira M.R., Perrelli Randau K., Pereira de Souza T. and Lira Soares L.A. (2012). Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). *Scientific World Journal*. Published online 2012 Jun 4. doi: 10.1100/2012/923462

D' Auria J.C. & Gershenzon J., (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current opinion in plant biology*, 8(3), 308-316.

Dai J., & Mumper R. J., (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

Davis P. H., Mill R. R., & Tan K. (1982). *Flora of Turkey and the east Aegean islands*. Edinburg Univesty Press, 7, 394-395.

Devgun M., Nanda A. , Ansari S.H., (2012). Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb, *Acta Pol, Pharma. Drug. Research*, 475-485.

Erdman J.W. Jr, Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C. L., Mazza G., (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC, *The Journal of nutrition*, 137, 718S-737S.

Fadda A., Serra M., Molinu M.G., Azara E., Barberis A., Sanna D., (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical, *Journal of Food composition and analysis*, 35, 112-119.

Fernández K., Vega M., & Aspé E., (2015). An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, 168, 7–13.

Folin O. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol Chem.*, 73 pp. 649–673

Gligor O., Mocan A., Moldovan C., Locatelli M., Crişan G., & Ferreira I. C., (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols—a comprehensive review. *Trends in food science & technology*.

González-Burgos E., Carretero M. E., Gómez-Serranillos M. P., (2011). *Sideritis* spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities—a review. *Journal of ethnopharmacology*, 135(2), 209-225.

Güvenç A., Houghton P.J., Duman, H., Coşkun M., Şahin P., (2005). Antioxidant Activity Studies on Selected *Sideritis*. Species Native to Turkey. *Pharmaceutical biology*, 43(2), 173-177.

Han T.C., Nam N.D., Hing Anh L.T., Vu T.A., & Man P.V. (2016). Enzyme assisted extraction of polyphenols from the old tea leaves. *J Nutr Health Sci*, 3(4), 404.

Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D., (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants). *International Centre for Science and High Technology-United Nations Industrial Development Organization, area Science Park Padriciano, 99*, 34012.

Harborne J. B., (1984). *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Springer Netherlands, ch. 2

Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., & Dallali S., (2013). Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield , chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 47, 291–299

Hudson B.J., (2012). *Food antioxidants*, Springer Science & Business Media.

Nimse S.B., Pal D., (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.

Nunez D.R., de Castro C.O., (1990). Hybridization between *Sideritis serrata* Lag. and *Sideritis bourgaeana* Boiss.(Lamiaceae) in their hybrid zone in Spain. *Annals of botany*, 66(2), 147-154.

Kacker P.N., (1989). Off-line quality control parameter design. *Journal of quality technology*, 17

Kapasakalidis P.G., Rastall R.A., Gordon M.H., (2009). Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4342-4351.

Khan M.I.R., Khan N.A.,(2017). *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation Under Abiotic Stress*, Springer.

Kim J.H., Pan J.H., Heo W., Lee H., Kwon E.G., Lee H.G., ... & Kim Y. J. (2010). Effects of cellulase from *Aspergillus niger* and solvent pretreatments on the extractability of organic green tea waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10747-10751.

Kim S.T., Park M.S., Kim H.M., (2004). Systematic approach for the evaluation of the optimal fabrication conditions of a H₂S gas sensor with Taguchi method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(2), 253-260.

- Kirimer N., Baser K.H.C., Demirci B., Duman H. (2004). Essential oils of *Sideritis* species of Turkey belonging to the section *Empedoclia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(1), 19-23.
- Koedam A. (1986). Volatile oil composition of Greek mountain tea (*Sideritis* spp.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(7), 681-684.)
- Lallianrawna S., Muthukumaran R., Ralte V., Gurusubramanian G. and Senthil Kumar N. (2013). Determination of total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity of *Ageratina adenophora*. *Science Vision*, 13 (4), pp.149-156
- Lehmberg G.L., Balentine D.A., Hang R.S., & Gobbo S.A. (1999). *U.S. Patent No. 5,952,023*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Linardaki Z., Papandreou M.A., Iatrou G., Lamari F.N., Margariti M., (2008). Antioxidant response of brain regions in adult mice after daily consumption of herbal tea from *Sideritis clandestina*. *Planta Medica*, 74(09), PA240.
- Loizzo M. R., Tundis R., Menichini F., Saab A. M., Statti G. A., Menichini F. (2007) Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models *Anticancer Research*, 27 , (5A) 3293-3300
- Lü J.M., Lin P.H., Yao Q., Chen C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *Journal of cellular and molecular medicine*, 14, 840-860.
- Maimoona Alya et al., (2011). "Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*." *Journal of Medicinal Plants Research* 5.13: 2724-2728. and phenolic acids," *Free Rad. Biol. Med*, 1996, 20, 933-956
- Martinez, T. (2000). Diet selection by Spanish ibex in early summer in Sierra Nevada. *Acta Theriologica*, 45(3), 335-346
- Nagendra K. L., Manasa D., Srinivas P., & Sowbhagya H. B. (2013). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chemistry*, 139(1-4), 509-514
- Nijveldt J.Robert, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, Paul AM van Leeuwen, (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr* vol. 74 no. 4 418-425.
- Panche A., Diwan A., Chandra S., (2016). Flavonoids: an overview, *Journal of nutritional science*, 5.

Pękal A., Pyrzynska K., (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782.

Petreska J., Stefova M., Ferreres F., Moreno D.A., Tomás-Barberán F. A., Stefkov G., ... & Gil-Izquierdo A., (2011). Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal "Mountain Tea". *Food Chemistry*, 125(1), 13-20.

Pietta P-G., (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7), pp. 10351042

Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S., (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579-590.

Pinelo M., Zornoza B., Meyer A.S., Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction, *Separation and Purification Technology*, 63 (2008) 620-627.

Piozzi F., Bruno, M., Rosselli, S., & Maggio, A. (2006). The diterpenoids from the genus *Sideritis*. In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 33, pp. 493-540). Elsevier.

Pisoschi A.M., Pop A., Cimpeanu C., G. Predoi, (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review, *Oxidative medicine and cellular longevity*.

Porter L. J. (1989). Tannins. In J. B. Harborne (Ed.), *Methods in plant biochemistry: Vol. 1. plant phenolics* (pp. 389–419). London: Academic Press

Prior R, Wu X and Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53 pp. 4290–4302.

Puri M. Sharma, D., & Barrow C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30(1), 37-44.

Renouard S., Hano C., Corbin C., Fliniaux O., Lopez T., Montguillon J., et al., (2010). Cellulase-assisted release of secoisolariciresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds. *Food Chemistry*, 122(3), 679–687.

Robbins R.J., (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 2866-2887.

Routray W., Orsat V., (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424.

Sagdic O., Aksoy A., Ozkan G., Ekici L., Albayrak S. (2008) Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9 (1), 80–84.

Sahin F.P., Ezer N., & Calis İ., (2006). Terpenic and phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Turkish Journal of Chemistry*, 30(4), 495-504.

Sarac N., Ugur, A. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4, 28-37.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., (2007). Αρχές ενόργανης ανάλυσης. *Εκδόσεις Κωσταράκη*, 334-347.

Stalikas D. Constantine, (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.*, 30, 3268 – 3295.0

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. & Crocker D., (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617, 1-16.

Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, Dev Dutt Rakesh, (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology, Trieste.

Sowbhagya H. B., Chitra, V. N. (2010). Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(2), 146-161.

Swier T. L., Chauhan K., Paul P. K. & Mukhim C., (2016). Evaluation of enzyme treatment conditions on extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 867–871

Teixeira, C. B., Macedo, G. A., Macedo, J. A., Helena, L., Silva, M., Manoel, A., et al. (2013). Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. *Bioresource Technology*, 129, 575–581.

Tsui K.L., (1992). An overview of Taguchi method and newly developed statistical methods for robust design. *Iie Transactions*, 24(5), 44-57.

Uzun B. B., Apaydin-Varol E., Ateş F., Özbay N., & Pütün A.E., (2010). Synthetic fuel production from tea waste: characterisation of bio-oil and bio-char. *Fuel*, 89(1), 176-184.

Wang S.M., Giang Y.S., Ling Y.C., 2002. Taguchi's method in optimizing the experimental conditions of simultaneous supercritical fluid extraction and chemical derivatization for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of amphetamine and methamphetamine in aqueous matrix, *For. Sci. Journ.* Vol. 1 pp. 47-53.

W.J.V.Young I.S., (2006). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176 –186.

Yagmur E., Ozmak M., & Aktas Z., (2008). A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. *Fuel*, 87(15-16), 3278-3285

Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή Κ.- Σπυροπούλου Γ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη Κ.Α. -Αγγελάκη. (2003), *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1η έκδοση.

Ζερβόπουλος Δ. Σωτήρης, (2010). Επίδραση των φαινολικών ουσιών στην αύξηση και στη φυσιολογική συμπεριφορά του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* X5, καλλιεργούμενου σε συνθετικά γλεύκη. Αθήνα.

Θανασούλια Β., Σιατής Ν., (2008). *Περί βοτάνων: πλήρης οδηγός βοτάνων, μορφολογία, ιδιότητες, τρόποι χρήσης*. Αθήνα.

Λυμπεράτος, Γ., and Σ.Παύλου. (2010). "Εισαγωγή στη βιοχημική μηχανική". Εκδόσεις Τζιολα, Αθήνα.

Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., Λάζαρη, Δ., & Κρίγκας, Ν. (2013). Καλλιέργεια, μεταποίηση και διασφάλιση ποιότητας των ελληνικών αρωματικών φαρμακευτικών φυτών. Καβάλα

Τσιμογιάννης Δημήτριος, (2008). Διδακτορική Διατριβή, Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, Αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων, Αθήνα.