



ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ
Sideritis Scardica (ΤΣΑΙ ΤΟΥ ΒΟΥΝΟΥ) ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ
ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΦΡΑΓΚΟΣ ΟΡΦΕΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΕΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν ως προς τη βιοδραστικότητα και το προφίλ τους εκχυλίσματα από τσάι του βουνού του γένους *Sideritis* και ιδιαίτερα του είδους *Scardica* γνωστό και ως τσάι του Ολύμπου. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της μεθόδου συμβατικής εκχύλισης και του συνδυασμού της με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ως προς την απόδοση των ανακτώμενων βιοδραστικών συστατικών. Συγκεκριμένα, κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση μελετήθηκε η δράση των ενζύμων *Celluclast*, *Liquozyme*, *Alcalase* και *Lipolase* ως προς το χρόνο και το ενζυμικό φορτίο ενώ στα συμπεράσματα συμπεριλήφθηκαν και τα αποτελέσματα από προηγούμενη ερευνητική εργασία για τα ένζυμα *Cellic CTec2*, *Viscozyme L* και το συνεργιστικό *Cellic CTec2/ Cellic HTec2*.

Η απόδοση της εκάστοτε εκχύλισης 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 δράσης (μέθοδος του αντιδραστηρίου *DPPH*) των εκχυλισμάτων. Συμπληρωματικά εκτιμήθηκε το περιεχόμενο τους σε γλυκόζη και ολικά αναγωγικά σάκχαρα με την χρήση των μεθόδων *Glucotest* και *DNS* αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός της *EYE* με τη συμβατική εκχύλιση αποδείχθηκε ότι έχει αυξημένη απόδοση τόσο στην ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών όσο και στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα το ένζυμο *Celluclast* φάνηκε να έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα με τις τιμές του *IC50* να κυμαίνονται μεταξύ 2,2 και 3,6. Όσον αφορά τα ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή ο συνεργισμός των ενζύμων *Cellic CTec2/HTec2* φάνηκε να έχει την υψηλότερη απόδοση με *2574,47 mg total phenolics/100g tea* για συνδυασμό 4,5 Units/g DM *CTec2* με 0,25 Units/g DM *HTec2* και το ένζυμο *Alcalase* με *108,38 mg flavonoids/100g tea* αντίστοιχα για χρόνο εκχύλισης 8h και ενζυμικό φορτίο 2,5 Units. Τέλος, σημαντικότερος παράγοντας για την ανάκτηση των ολικών φλαβονοειδών αποδείχτηκε ο χρόνος, ενώ όσον αφορά τα ολικά φαινολικά για τα ένζυμα *Celluclast* και *Liquozyme* σημαντικότερος παράγοντας αποδείχτηκε το ενζυμικό φορτίο και για τα ένζυμα *Alcalase*, *Lipolase*, *Cellic CTec2* και *Viscozyme* ο χρόνος. Όσον αφορά το συνεργιστικό *Cellic Ctec2/Htec2* σημαντικότερος παράγοντας για την ανάκτηση των ολικών φαινολικών αποδείχτηκε το ενζυμικό φορτίο του *CTec2* ενώ για τα φλαβονοειδή το ενζυμικό φορτίο του *HTec2*.

ABSTRACT

Greek mountain tea Sideritis is widely known for its medical action and its extract is being consumed as a drink since the ancient times. Nowadays, lots of studies are focused on bioactive compounds such as phenolic acid, flavonoids, tannins and antioxidants that can be found on Sideritis.

Regarding the current thesis, a study was carried out concerning the bioactive profiles of Sideritis extracts and especially Sideritis Scardica from mountain Olympus. We realized a comparison between the effect on bioactive compounds of the conventional extraction and its combination with enzyme assisted extraction. In the framework of the enzyme assisted extraction there has been a study of the enzyme products Celluclast, Liquozyme, Alcalase, Lipolase, Cellic CTec2, Viscozyme in reference to the time of the extraction and the concentration of the enzyme, and a complementary study of the synergy of the enzymes Cellic CTec2 and Cellic HTec2, using factors of study the concentrations of both enzymes. The Taguchi method was chosen as the experimental design method.

The output of each extraction was assessed with the determination of the total phenolic contents (Folin-Ciocalteu method), of the flavonoid contents (AlCl₃ method), as well as the analysis of the antioxidant rendition (DPPH method) of the extracts. In addition to these studies, we also analyzed the content of the extracts in glucose and total reducing sugars (Glucotest method and DNS method).

The combination of conventional extraction and enzyme assisted extraction was proved to be beneficial not only for the antioxidant efficiency, but also for the total bioactive contents. Celluclast was proved to be the most efficient enzyme in regards to the maximum antioxidant efficiency according to IC₅₀ values that vary between 2,2 and 3,6. Regarding the total phenolic acid values the synergy of the enzymes Cellic CTec2/HTec2 was proved to be the most efficient with a maximum value of 2574,47 mg total phenolics/ 100g tea for a combination of 4,5 Units/g DM CTec2 and 0,25 Units/g DM HTec2. Regarding the total flavonoid values Alcalase was proved to be the most efficient with a maximum value of 108,38 mg flavonoids/ 100g tea with the sample processed for 8 hours and enzyme load of 2.5 Units/g DM. To end with, time was the determinant factor for the total flavonoid content. On the other hand, regarding the total phenolic content time was the determinant factor for the enzymes Alcalase, Lipolase, Cellic CTec2, Viscozyme and enzyme load for the enzymes Celluclast and Liquozyme. As far as the synergy Cellic CTec2/HTec2 is concerned, the enzyme load of CTec2 was the determinant

factor for the total phenolic content in comparison with the total flavonoid content where the enzyme load of HTec2 was proved to be the one.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
Θεωρητικό μέρος	12
1. Sideritis spp.	12
1.1 Χαρακτηριστικά	12
1.2 Μορφολογία.....	14
1.3 Παραδοσιακές χρήσεις.....	15
1.4 Χημική Σύσταση	17
1.4.1 Τερπένια	17
1.4.2 Φαινολικές ενώσεις.....	18
1.4.2.1 Φλαβονοειδή.....	19
1.4.3 Αιθέρια έλαια	22
1.4.4 Άλλα Συστατικά	23
1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	24
1.5.1 Αντιφλεγμονώδης δράση	24
1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση	24
1.5.3 Αντιμικροβιακή δράση	28
1.5.4 Αντιελκώδης δράση.....	29
1.5.5 Αναλγητική δράση.....	29
1.5.6 Άλλες δράσεις.....	29
2. Εκχύλιση δραστικών συστατικών.....	30
2.1 Τεχνικές εκχύλισης	30
2.1.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	31
2.1.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.....	32
2.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης.....	40
3. Υλικά	42

3.1 Πρώτες ύλες	42
3.2 Όργανα και Συσκευές.....	42
3.2 Αντιδραστήρια και Ένζυμα	43
3.2.1 Αντιδραστήρια και τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα (kits).....	43
3.2.2 Ενζυμα	43
3.2.3 Μέθοδοι	44
3.2.4 Μέθοδοι εκχύλισης.....	47
3.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	49
3.3.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών - Μέθοδος Folin-Ciocalteu	49
3.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών – Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου	51
3.3.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – δοκιμή DPPH	53
3.3.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων	55
3.3.5 Προσδιορισμός γλυκόζης.....	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
4. Συμβατική εκχύλιση	56
5. EYE εκχύλιση.....	57
5.1 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1.5L	57
5.4 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Lipolase	109
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	127
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	136

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Sideritis Athoa, Sideritis Clandestina, Sideritis Euboea, Sideritis Scardica.....	12
Εικόνα 2 Sideritis Raeseri, Sideritis Syriaca L. , Sideritis Sipylea.....	14
Εικόνα 3: Μορφολογία Sideritis.....	15
Εικόνα 4: Διοσκουρίδης ο Πεδάνιος.....	16
Εικόνα 5: Κατηγορίες πολυφαινολών και οι βασικότερες απεικονίσεις των δομών τους.....	19
Εικόνα 6: Η γενική μορφή ενός μορίου φλαβονοειδούς.....	20
Εικόνα 7: Προανθοκυανιδίνη με σύνδεση του C4 και C8 (αριστερά) και προανθοκυανιδίνη με σύνδεση του άνθρακα C4 και C6 (δεξιά)	21
Εικόνα 8: Δομή κυτταρίνης.....	34
Εικόνα 9: Δομή ημικυτταρίνης.....	35
Εικόνα 10: Δομή α-Αμυλάσης.....	38
Εικόνα 11: Υδρόλυση Τριγλυκερίδιου από λιπάση.....	39
Εικόνα 12: Δομές συντονισμού της ρίζας DPPH.....	53
Εικόνα 13: Αντίδραση DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών.....	53
Εικόνα 14: Αναγωγή του DPPH από αντιοξειδωτικό AH ή άλλη ρίζα R.....	54

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής γενικής μορφής ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. (Gligor O. et al.,2019).	42
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς Γαλλικού οξέος.....	51
Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς Κατεχίνης.....	52
Διάγραμμα 4: Καμπύλη αναφοράς DPPH.....	55
Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού.....	57
Διάγραμμα 6: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	59
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους.....	60
Διάγραμμα 8: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσε των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	61
Διάγραμμα 9: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	62
Διάγραμμα 10: διάγραμμα μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη.....	63
Διάγραμμα 11: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσε των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	64
Διάγραμμα 12: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	65
Διάγραμμα 13: διάγραμμα μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.....	66
Διάγραμμα 14: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσε των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	67
Διάγραμμα 15 : Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	68
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις.....	69

Διάγραμμα 17: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	70
Διάγραμμα 18 : Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	71
Διάγραμμα 19: S/N διάγραμμα για τα φλαβονοειδή	72
Διάγραμμα 20: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	73
Διάγραμμα 21: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού	74
Διάγραμμα 22: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	76
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους	77
Διάγραμμα 24: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	78
Διάγραμμα 25: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	79
Διάγραμμα 26: Διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη.....	80
Διάγραμμα 27: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	81
Διάγραμμα 28: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	82
Διάγραμμα 29: διάγραμμα μέσω τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα	83
Διάγραμμα 30: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	84
Διάγραμμα 31: Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	85
Διάγραμμα 32: διάγραμμα μέσω τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις	86
Διάγραμμα 33: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	87
Διάγραμμα 34: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	88
Διάγραμμα 35: διάγραμμα μέσω τιμών για τα φλαβονοειδή	89
Διάγραμμα 36: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	90
Διάγραμμα 37: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού	91
Διάγραμμα 38: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	93
Διάγραμμα 39: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους	94
Διάγραμμα 40: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	95
Διάγραμμα 41: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	96
Διάγραμμα 42: διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη	97
Διάγραμμα 43 : Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	98
Διάγραμμα 44: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	99

Διάγραμμα 45: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	101
Διάγραμμα 46: Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	102
Διάγραμμα 47: διάγραμμα μέσω τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις	103
Διάγραμμα 48: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	104
Διάγραμμα 49: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	105
Διάγραμμα 50: διάγραμμα μέσω τιμών για τα φλαβονοειδή	106
Διάγραμμα 51: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	107
Διάγραμμα 52: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	110
Διάγραμμα 53: διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους	111
Διάγραμμα 54: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	112
Διάγραμμα 55: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	113
Διάγραμμα 56: διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη	114
Διάγραμμα 57: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	115
Διάγραμμα 58: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση ..	116
Διάγραμμα 59: διάγραμμα μέσω τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα	117
Διάγραμμα 60: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	118
Διάγραμμα 61: Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση.....	119
Διάγραμμα 62: διάγραμμα μέσω τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις	120
Διάγραμμα 63: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	121
Διάγραμμα 64: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση	122
Διάγραμμα 65: διάγραμμα μέσω τιμών για τα φλαβονοειδή	123
Διάγραμμα 66: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi.....	124
Διάγραμμα 67: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού	125
Διάγραμμα 68: S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά	136
Διάγραμμα 69: S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους	136
Διάγραμμα 70: S/N διάγραμμα για την γλυκόζη	137
Διάγραμμα 71: S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα	137
Διάγραμμα 72: S/N διάγραμμα για τα ολικά φλαβονοειδή	138
Διάγραμμα 73: S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους	138
Διάγραμμα 74: S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά	139
Διάγραμμα 75: S/N διάγραμμα για τη γλυκόζη	139

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ορθογώνιος πίνακας L8 (Kim S.T. et al., 2004)	45
Πίνακας 2: Παράμετροι πειράματος.....	47
Πίνακας 3: Παράγοντες και τα επίπεδά του που μελετήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο Taguchi.	47
Πίνακας 4: Πειράματα βάσει του σχεδιασμού Taguchi.....	48
Πίνακας 5: Στοιχεία χρησιμοποιούμενων ενζύμων	48
Πίνακας 6: Πειραματικά αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης.....	56
Πίνακας 7: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Celluclast 1.5L	58
Πίνακας 8: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου	59
Πίνακας 9: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L	60
Πίνακας 10: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους.....	61
Πίνακας 11: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου	62
Πίνακας 12: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L.....	63
Πίνακας 13: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη	64
Πίνακας 14: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.	65
Πίνακας 15: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L.....	66
Πίνακας 16: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.....	67
Πίνακας 17: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου	68
Πίνακας 18: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L.....	69
Πίνακας 19: Πίνακας μέσων τιμών S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις	70
Πίνακας 20: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου.....	71
Πίνακας 21: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L	72
Πίνακας 22: Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα φλαβονοειδή	73
Πίνακας 23: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων	75
Πίνακας 24: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Liquezyme.....	75
Πίνακας 25: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου	76
Πίνακας 26: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Liquezyme	77
Πίνακας 27: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους.....	78
Πίνακας 28: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου	79

Πίνακας 29: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Ligozyme.....	80
Πίνακας 30: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη.....	81
Πίνακας 31: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.....	82
Πίνακας 32: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Ligozyme.....	83
Πίνακας 33: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.....	84
Πίνακας 34: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου.....	85
Πίνακας 35: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Ligozyme.....	86
Πίνακας 36: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις.....	87
Πίνακας 37: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου.....	88
Πίνακας 38: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Ligozyme.....	89
Πίνακας 39: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή.....	89
Πίνακας 40: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων.....	92
Πίνακας 41: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Alcalase.....	92
Πίνακας 42: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου.....	93
Πίνακας 43: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Alcalase.....	94
Πίνακας 44: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους.....	95
Πίνακας 45: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου.....	96
Πίνακας 46: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Alcalase.....	97
Πίνακας 47: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη.....	98
Πίνακας 48: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.....	99
Πίνακας 49: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Alcalase.....	100
Πίνακας 50: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.....	100
Πίνακας 51: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου.....	102
Πίνακας 52: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Alcalase.....	103
Πίνακας 53: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις.....	103
Πίνακας 54: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου.....	105
Πίνακας 55: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Alcalase.....	106
Πίνακας 56: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή.....	107
Πίνακας 57: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων.....	109
Πίνακας 58: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Lipolase.....	109

Πίνακας 59: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου	110
Πίνακας 60: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Lipolase	111
Πίνακας 61: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους.....	112
Πίνακας 62: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου	113
Πίνακας 63: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Lipolase.....	114
Πίνακας 64: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη.....	115
Πίνακας 65: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου	116
Πίνακας 66: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Lipolase.....	117
Πίνακας 67: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.....	118
Πίνακας 68: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου	119
Πίνακας 69: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Lipolase.....	120
Πίνακας 70: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις	121
Πίνακας 71: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου.....	122
Πίνακας 72: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Lipolase	123
Πίνακας 73: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή.....	124
Πίνακας 74: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων	126
Πίνακας 75: Πειραματικές μέγιστες αποδόσεις ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών...	127

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 *Sideriti* (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 *Sideritis Athoa*, *Sideritis Clandestina*, *Sideritis Euboea*, *Sideritis Scardica*

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

Τα κυριότερα είδη στην Ελλάδα είναι :

1. ***Sideritis Athoa***. 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 Ταϋγету. Αυτοφύεται πάνω στους βράχους στις υποαλπικές και αλπικές περιοχές του Μαλεβού, του Ταϋγету 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 Euboea***. 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.



Εικόνα 2 *Sideritis Raeseri*, *Sideritis Syriaca L.* , *Sideritis Sípylea*

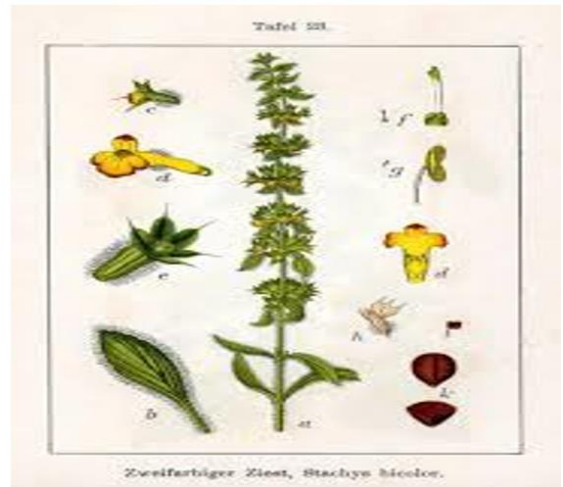
Τη σύγχρονη εποχή πολλές έρευνες πραγματοποιούνται με σκοπό τη μελέτη των βοτανικών, φυσικοχημικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων του γένους *Sideritis* (Baden et al., 1991).

1.2 Μορφολογία

Τα είδη του *Sideriti* φύονται είτε ως βότανα είτε ως μικροί θάμνοι , ετήσια ή για περισσότερα χρόνια και είναι αρωματικά, λόγω της περιεκτικότητάς 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 3: Μορφολογία Sideritis

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 ὕλης ἰατρικῆς» (De Materia Medica), όπου το γένος Sideritis ταξινομείται σε τρία είδη, «Περί Σιδηρίτιδος, Περί ετέρας Σιδηρίτιδος (Andere Sideritis) και Περί απόμακρης Σιδηρίτιδος (Weitere Sideritis)» .



Εικόνα 4: Διοσκουρίδης ο Πεδάνιος

Από την αρχαιότητα τα είδη του σιδεριτή χρησιμοποιούνται ως τσάι, ως αρωματικές ουσίες, για θεραπευτική χρήση ακόμα ως καλλωπιστικό φυτό σε 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 Σιδεριτή 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 Σιδερίτη 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 Σιδερίτη 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 (lupenol) (D'Auria et al., 2005), (González-Burgos et al., 2011).

Τα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και τριτερπένια δεν απαντώνται συχνά στον Σιδερίτη, 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 ευδοκούν στην Ιβηρική χερσόνησο και τις Κανάριες νήσους.

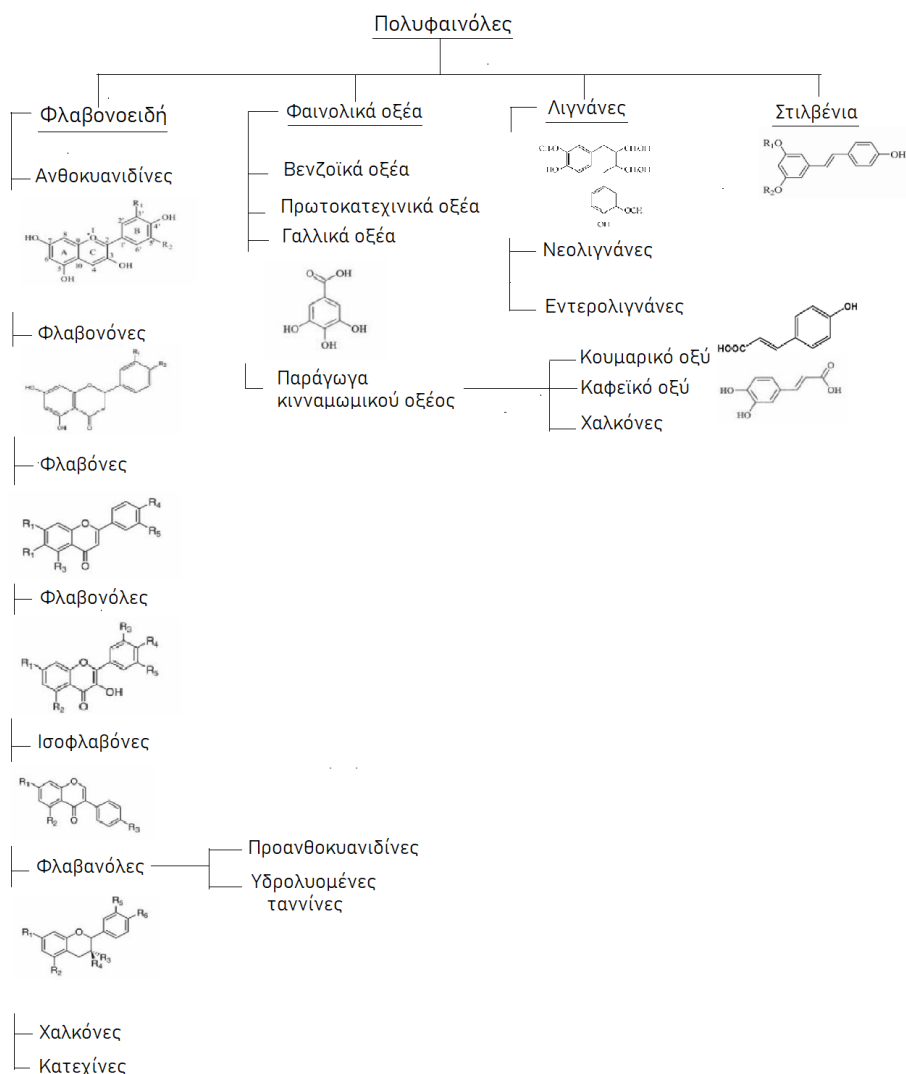
Τα είδη Σιδερίτη που συναντώνται στην ανατολική και κεντρική Μεσογειακή περιοχή (Ελλάδα, Τουρκία, Ιταλία) περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά καουρένια, δηλαδή τετράκυκλα διτερπένια. Αντιθέτως τα είδη της δυτικής Μεσογειακής περιοχής παρουσιάζουν διτερπένια διαφορετικής μορφολογίας όπως labdane (δίκυκλα διτερπένια),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

1.4.2 Φαινολικές ενώσεις

Αποτελούνται από βενζολικούς δακτυλίους που περιέχουν ένα ή περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίου, και σχηματίζουν από απλά φαινολικά μόρια έως περίπλοκα πολυμερισμένες ενώσεις. Παράγονται από το σικιμικό οξύ και τις φωσφορικές πεντόζες του φυτού μέσω του μονοπατιού του φαινυλοπροπανοειδούς. Αυτές οι ενώσεις, που είναι γνωστές και ως πολυφαινόλες, είναι οι ενώσεις που συναντούνται πιο συχνά στα φυτά και διακρίνονται σε υποκατηγορίες ενώσεων όπως:

απλά φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, σύνθετα φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες.

Οι πιο συχνά απαντώμενες μορφές φαινολικών ενώσεων είναι αυτές που προέρχονται από την σύζευξη φαινολικών μονοσακχαριτών και πολυσακχαριτών. Αυτή η σύζευξη έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει ποικιλία στις δομές των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες χωρίζονται σε τάξεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, με τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τις τανίνες να θεωρούνται τα κυριότερα (Balasundram et al., 2006).



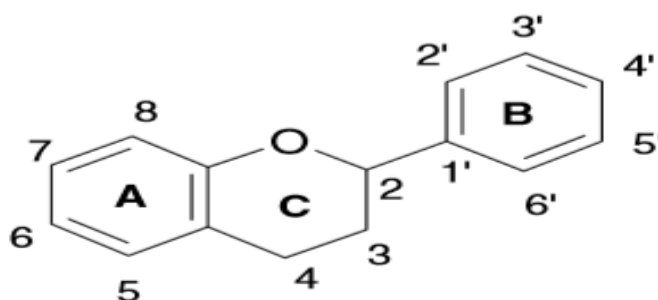
Εικόνα 5: Κατηγορίες πολυφαινολών και οι βασικότερες απεικονίσεις των δομών τους

1.4.2.1 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 Β. Et al.,2003), (J.W. 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 σιδεριτή. 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 (N. Balasundram et al., 2006).



Εικόνα 6: Η γενική μορφή ενός μορίου φλαβονοειδούς

1.4.2.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες:

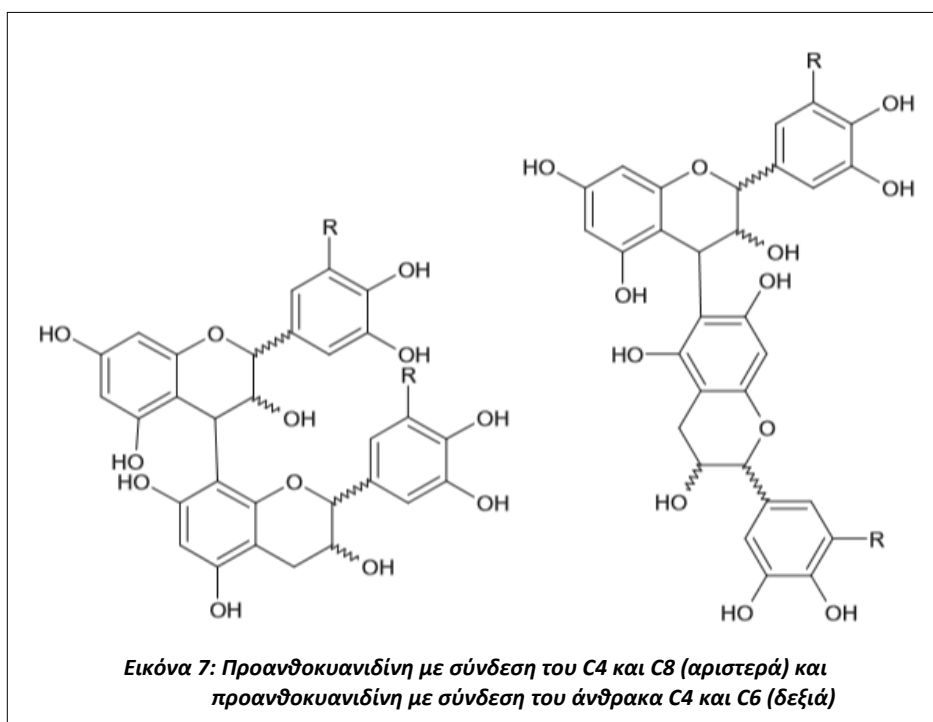
1. Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (benzoic acid) , όπως το γαλλικό οξύ (gallic acid), και
2. Παράγωγα του σιναμικού οξέος (cinnamic acid), όπως το κουμαρικό οξύ (coumaric acid) το φερουλικό οξύ (ferulic acid) και το καφεϊκό οξύ (caffeic acid).

Το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε αφθονία σε πολλά φρούτα και λαχανικά, τις περισσότερες φορές με την συνοδεία κινικού οξέος (quinic acid) και χλωρογενικού οξέος (chlorogenic acid). Το τελευταίο μάλιστα, αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο φαινολικό στοιχείο στον καφέ. Άλλο ένα ιδιαίτερα κοινό φαινολικό οξύ είναι το φερουλικό οξύ (ferulic acid), που συναντάται στα δημητριακά. (D'Archivio M. et al, 2007)

Η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών οξέων στον *Sideritis* αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες εμφάνισης των ευεργετικών ιδιοτήτων του.

1.4.2.3 Τανίνες

Οι τανίνες, αποτελούν σχετικά υψηλού μοριακού βάρους (MB: 300-3000) ενώσεις και διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με την ικανότητά τους να υδρολύονται ή όχι υπό την παρουσία ζεστού νερού ή του ενζύμου τανάση, τις υδρολύόμενες και τις συμπυκνωμένες. (J.Dai, R.J Mumper, 2010) Οι πρώτες είναι εστέρες του γαλλικού οξέος (γαλλο- και ελλαγι- τανίνες), ενώ οι τελευταίες (γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες) είναι πολυμερή φλαβαν-3-όλης συνδεδεμένα με δεσμούς άνθρακα. (Balasundram, et al., 2006) Πιο αναλυτικά, η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις που περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή μία πολυόλη εστεροποιημένη με γαλλικό οξύ, ενώ οι συμπυκνωμένες τανίνες σχηματίζονται από το δεσμό μεταξύ του άνθρακα 4 της κατεχίνης με τον άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 8 ή 6 του επόμενου μορίου κατεχίνης. Η ποικιλία της δομής των τανινών είναι αποτέλεσμα της μεταβολής του πρότυπου υδροξυλίωσης, της στερεοχημείας στα τρία χειρόμορφα κέντρα, της θέσης και του τύπου του δεσμού που αναπτύσσουν, καθώς και του τρόπου μεθοξυλίωσης και γλυκοζυλίωσης. (J.Dai, R.J Mumper, 2010)



Οι τανίνες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε πολλά μέρη των φυτών, ενώ συχνά, η αυξημένη παραγωγή τους μπορεί να είναι ένδειξη ασθένειας του φυτού. Ως εκ τούτου, ο ρόλος των τανινών στα φυτά σχετίζεται με την προστασία τους εναντίων επικείμενης μικροβιακής μόλυνσης αλλά και εντόμων και ζώων (Sieniawska et al., 2017). Οι τανίνες στον άνθρωπο όμως είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση μολύνσεων και τραυματισμών του δέρματος, αλλά και για την πρόληψη από την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών.

Είναι βιοδραστικές είτε ως απορροφήσιμες, είτε ως μη απορροφήσιμες. Οι απορροφήσιμες τανίνες έχουν συνήθως χαμηλό μοριακό βάρος και έχουν ευεργετική επίδραση σε διάφορα όργανα του σώματος. Οι μη απορροφήσιμες τανίνες είναι πιο πολύπλοκες δομές και έχουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιϊκή, και αντιμεταλλαξιγόνο επίδραση στη γαστρεντερική οδό. Οι τανίνες παρουσιάζουν επίσης καρδιοπροστατευτικές, κυτταροτοξικές, αντιδιαβητικές, αντιπαχυσαρκικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Serrano et al., 2009).

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, αντιϊκή – αντιερπητική και είναι αναστολείς 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. et al., 2013).

Αρκετές έρευνες έχουν γίνει 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 ίδιων 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 Σιδερίτη 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 Σιδερίτη 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 A., 1986).

1.4.4 Άλλα Συστατικά

Κάποια ακόμα συστατικά η παρουσία των οποίων έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα είδη του Σιδερίτη 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 ευδοκούν στη Μακαρονησία είναι μια κουμαρίνη που ονομάζεται σιδερίνη και μια λιγνάνη, η σεσαμίνη (González-Burgos et al., 2011).

1.5 Φαρμακευτικές ιδιότητες

Μέχρι σήμερα τα συστατικά του *Sideritis* έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, γαστροπροστατευτική, νευροπροστατευτική, αντιμικροβιακή, αναλγητική, καρδιοπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιϊκή και αντισπασμολυτική δράση (Fotini A Trikka et al. January 2019)

1.5.1 Αντιφλεγμονώδης δράση

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

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες με σκοπό να εξεταστούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του Σιδερίτη. 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 χρόνια στάδιο της φλεγμονής. Καμία δράση δεν παρατηρήθηκε στο οξύ στάδιο της φλεγμονής (González-Burgos et al., 2011).

1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση

1.5.2.1 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 (ελλειπής 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), (J.M. 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 (M. 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.

1.5.2.1 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. (W. J. V. Young I.S., 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. (J.M. 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 (O.I. Aguoma 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 υπεροξείδιο 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)

1.5.2.2 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 (A.M. 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 δράση επηρεάζεται επίσης από:

- Τις συνθήκες εκχύλισης
- Την πολικότητα του διαλύτη

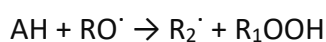
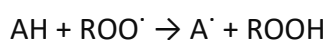
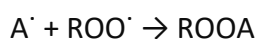
Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα αρωματικά φυτά, αποτελούν τις κυριότερες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών (Biljana Bozin, 2006).

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 φυσικώς 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), (M. Carocho et al., 2013)

1.5.2.3 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 προοξειδωτικά. Οι γενικές αντιδράσεις, με τις υπεροξειδικές και τις αλκοξυ-ρίζες, στις οποίες συμμετέχουν τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά είναι οι εξής:



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 (D. Belitz, 2015), (B.J. Hudson, 2012), (A.M. Pisoschi et al., 2016).

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης 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 Σιδερίτη 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 δράσης 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 δράσης 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 δράση $41,68 \pm 1,96\%$ 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 O. 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).

1.5.4 Αντιελκώδης δράση

Η αντιελκώδης δράση του γένους *Sideritis* είναι γνωστή από παλιά, καθώς αφεψήματα 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.

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 αρουαίου) 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 M. R. 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

Η εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων από φυτικά υλικά είναι το πρώτο βήμα για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμακευτικών ή καλλυντικών προϊόντων. Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να εξαχθούν από φρέσκα, κατεψυγμένα ή αποξηραμένα δείγματα φυτών.

Τα αρχικά βήματα για τη παραλαβή και τη χρήση μίας βιοδραστικής ένωσης σε τέτοια προϊόντα είναι τα εξής (Tradit et al., 2007):

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

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 του εκχυλίσματος. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται πολλές διεργασίες, όπως η έγχυση, η διαβροχή, η έκπλυση, η

εκχύλιση υγρού-υγρού ή υγρού-στερεού και η μέθοδος Soxhlet. (M. Devgun, A. Nanda, S.H. Ansari, 2012) Οι μη συμβατικές μέθοδοι, οι οποίες είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης χρήσης οργανικών χημικών ουσιών, του μειωμένου χρόνου λειτουργίας και της καλύτερης απόδοσης και ποιότητας του εκχυλίσματος, αναπτύχθηκαν τα τελευταία πενήντα χρόνια. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι υπέρηχοι, τα μικροκύματα, το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα, η ωμική θέρμανση, η χρήση υπερκρίσιμων φθοριούχων διαλυμάτων και οι επιταχυνόμενοι διαλύτες. (J. Azmir et al., 2013)

2.1.1 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 οσμωτικές 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 O. et al., 2019).

2.1.2 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.

2.1.2.1 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 O. 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 M. 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 ασκεί 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 βιοενεργές 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 K. C. et al., 2013)

2.1.2.2 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 (Nadar et al., 2018):

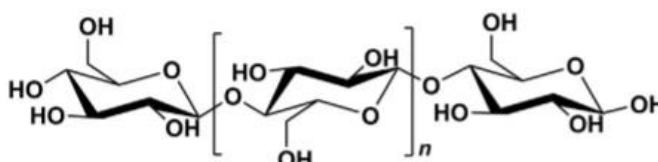
- είδος ενζύμου
- συγκέντρωση ενζύμου
- χρόνος επώασης
- θερμοκρασία επώασης
- pH συστήματος
- αναλογία ενζύμου – υποστρώματος
- το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος

Είδος ενζύμου

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

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 στο συνεργιστικό 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 διαχωρίζουν την κελοβιόζη σε γλυκόζη (Gligor O. et al., 2019). Είναι ευρέως διαδεδομένες και παράγονται από μία ευρεία κατηγορία βακτηρίων ή μυκήτων, αερόβια ή αναερόβια. Χρησιμοποιούνται είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα όπως οι πηκτινάσες και οι β-γλυκανάσες.

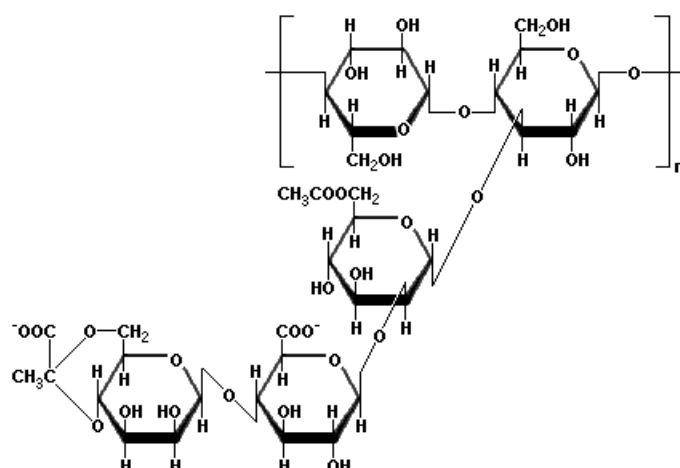


Εικόνα 8: Δομή κυτταρίνης

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 O. et al.,2019).



Εικόνα 9: Δομή ημικυτταρίνης

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.

Λιγνίνη και λιγνινάσες

Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό πολυμερές που αποτελείται από απλές φαινολικές αλκοόλες όπως η μονολιγνόλη, η σιναπλική αλκοόλη και p-κουμαρική 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 οξειδωτικής 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 O. et al.,2019).

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 O. 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 O. 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 παρεμποδίζεται η πρόσβαση του ενζύμου σε θέσεις που καταλύουν την υδρόλυση, λόγω της μη αποδοτικής προσρόφησης. Το γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη διάσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. (Karasaki P. G. 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.

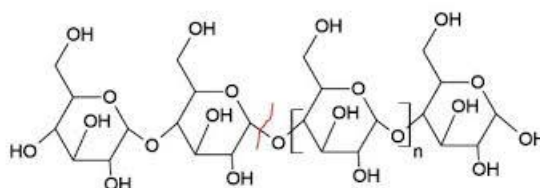
Η θερμοκρασία της εκχύλισης είναι μια ακόμα παράμετρος που επηρεάζει την ΕΑΕ, λόγω της επίδρασης της στην ενεργότητα του ενζύμου και στη ρεολογική συμπεριφορά των διαλυτοποιημένων βιοδραστικών συστατικών. Η ενζυμική ενεργότητα αυξάνεται αναλογικά ενώ το ιξώδες μειώνεται, με άνοδο της θερμοκρασίας και 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 O. et al.,2019), (Sowbhagya, H. B. 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. Ο συνεργισμός 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 O. et al.,2019), (Γεράσιμος Λυμπεράτος et al.,2010).

α-Αμυλάσες:

Καταλύουν την υδρόλυση των εσωτερικών α-1,4-γλυκοζιδικών δεσμών του αμύλου, μετατρέποντάς το σε προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους, όπως γλυκόζη και μαλτόζη. Αυτά τα ένζυμα αποτελούν κομμάτι των πιο σημαντικών για τη βιομηχανία

ενζύμων, καταλαμβάνοντας περίπου το 25% του παγκοσμίου εμπορίου ενζύμων. Μπορούν να παραχθούν από μύκητες, ζύμες και βακτήρια.



Εικόνα 10: Δομή α-Αμυλάσης

Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Προωθούν, τη διάσπαση των δομικών πρωτεϊνών που ενισχύουν τη δομή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και παράλληλα συμβάλλουν στην απελευθέρωση των φαινολών από τα κενοτόπια των κυττάρων, διασπώντας τη μεμβράνη που τις περιβάλλει. Οι πρωτεάσες, ακόμη, μπορούν να αποικοδομούν συστατικά πλούσια σε υδροξυπρολίνη, τα οποία βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα, συμβάλλοντας έτσι στην αποδυνάμωσή του. Κατά συνέπεια, τα συγκεκριμένα ένζυμα μεταβάλλουν με διαφορετικό τρόπο το κυτταρικό τοίχωμα, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση διαφορετικών συστατικών του φυτικού δείγματος. (M.Pinelo,2008)

Ταξινομούνται ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους σε:

- φυτικές,
- ζωικές και
- μικροβιακές,

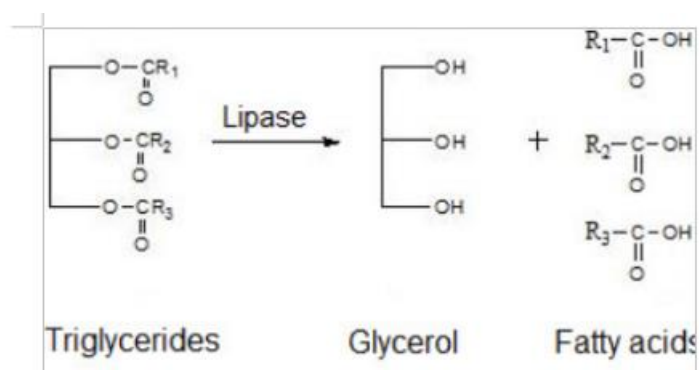
και ανάλογα με την καταλυτική τους δράση σε:

- ενδοπεπτιδάσες (ευρύτερα χρησιμοποιούμενες στην βιομηχανία τροφίμων),
- εξωπεπτιδάσες και
- πρωτεϊνάσες.

Λιπάσες

Οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών σε λιπιδικά υποστρώματα. Καταλύουν την βιοχημική αντίδραση της εστεροποίησης, και μετεστεροποίησης σε μη υδατικά διαλύματα, υδρολύοντας τριγλυκερίδια σε

διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, λιπαρά οξέα και γλυκερόλη (Svendsen, 2000). Προέρχονται κυρίως από βακτήρια. Χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της φαρμακευτικής, της χημείας και της βιομηχανίας τροφίμων. Οι εμπορικές τους εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων έχουν να κάνουν κυρίως με την υδρόλυση λιπαρών του γάλακτος, καθώς και την ρύθμιση της γεύσης των τυριών και την εξασφάλιση προϊόντων ελεύθερων από συστατικά που προσδίδουν πικρή γεύση και τάγγιση (οξείδωση των λιπιδίων ή δημιουργία ελευθέρων οργανικών οξέων, τα οποία προσδίδουν δυσάρεστη γεύση) (Wilkinson, 1995).



Εικόνα 11: Υδρόλυση Τριγλυκερίδιου από λιπάση

Συγκέντρωση ενζύμου

Η συγκέντρωση του ενζύμου και η απόδοση της εκχύλισης παρουσιάζουν αναλογική σχέση. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή να μην υπερβεί η συγκέντρωση του ενζύμου ένα συγκεκριμένο όριο, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνιστική προσρόφηση στον πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των ανταγωνιστικών θέσεων των ενζύμων. Με αυτόν τον τρόπο, επηρεάζει αρνητικά τη διάσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος.

Χρόνος επώασης

Ο χρόνος της επώασης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα και θα πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά, καθώς παρατεταμένοι χρόνοι επώασης μπορεί να οδηγήσουν σε αποσύνθεση των βιοδραστικών ουσιών λόγω παρατεταμένης από το προβλεπόμενο έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες είτε σε διαδικασίες οξείδωσης (έκθεση στο οξυγόνο της ατμόσφαιρας)

Θερμοκρασία επώασης

Γενικά, η αύξηση στο pH και στη θερμοκρασία προκαλεί αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης. Πάντοτε ωστόσο λαμβάνουμε υπόψιν μας τις βέλτιστες θερμοκρασίες

(Tort) και pH (pHort) στις οποίες δρά ένα ένζυμο. Παρόλο που τα ένζυμα έχουν μία βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας, μπορούν να δράσουν και σε ένα εύρος θερμοκρασιών, παρέχοντας έτσι ευελιξία στο συνολικό κόστος της διεργασίας αλλά και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Το pH του συστήματος

Το pH του μέσου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενζυμική δραστηριότητα, καθώς επηρεάζει το σχήμα και το φορτίο των ενζύμων κι επομένως τη δραστηριότητά τους. Γενικά, η αύξηση στο pH και στη θερμοκρασία προκαλεί αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης. Πάντοτε ωστόσο λαμβάνουμε υπόψιν μας τις βέλτιστες θερμοκρασίες (Tort) και pH (pHort) στις οποίες δρά ένα ένζυμο.

Αναλογία ενζύμου-υποστρώματος

Βάση της ιδιότητας των ενζύμων να καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις, κάθε ένζυμο δρα σε συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος

Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος έχει θετική επίδραση στην ανάκτηση των φαινολών, καθώς επιτρέπει την καλύτερη διείσδυση του ενζύμου στις δραστικές θέσεις και συνεπώς αυξάνει την υδρόλυση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Υπερβολική μείωση του μεγέθους των σωματιδίων μπορεί να εμποδίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύτη και του υποστρώματος. (M. Pinelo, A.S. Meyer, 2008)

2.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης

Πλεονεκτήματα

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.

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 (X. Cheng, L et al., 2015).

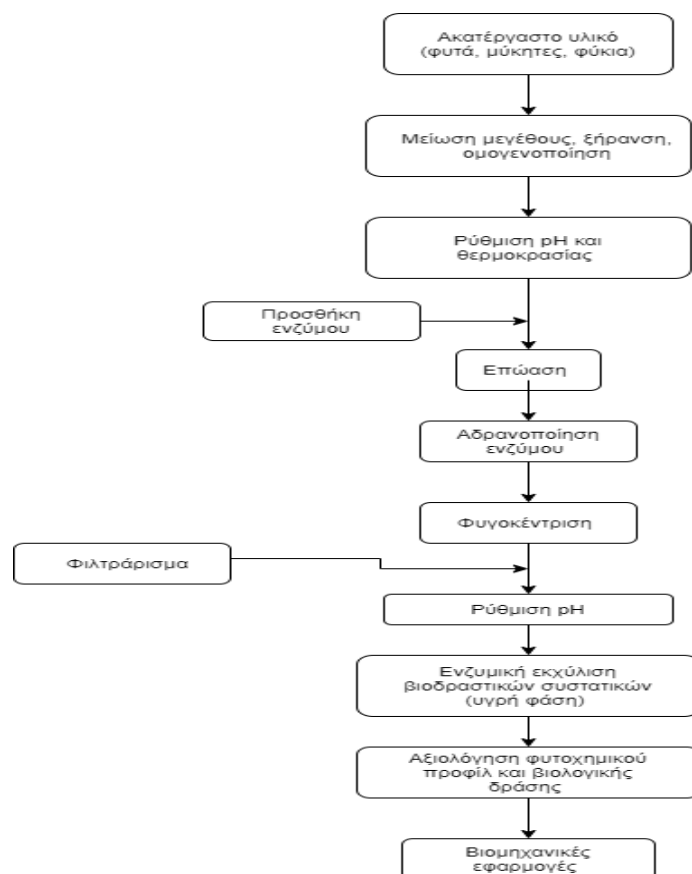
Παρόλο που η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βρίσκει όλο ένα και περισσότερες εφαρμογές, θα πρέπει να αυξηθεί και η χρήση της σε βιομηχανική κλίμακα. Κάτι τέτοιο είναι επιθυμητό λόγω των αυξημένων αποδόσεων των βιοδραστικών συστατικών και της αποτελεσματικότερης διεργασίας εκχύλισης με λιγότερα παραπροϊόντα (Gligor O. et al., 2019).

Περιορισμοί

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 M. et al., 2012).

Το ακόλουθο διάγραμμα ροής ενδείκνυται για ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών (Gligor O. et al., 2019).



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής γενικής μορφής ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. (Glígor O. et al.,2019).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. Υλικά

3.1 Πρώτες ύλες

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διεργασία ήταν αποξηραμένο τσάι του είδους *Sideritis Scardica*.

3.2 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)
- ✓ Microwave Digestion System της MILESTONE

3.2 Αντιδραστήρια και Ένζυμα

3.2.1 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

3.2.2 Ένζυμα

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

- ◆ Ένζυμο Celluclast 1.5L
- ◆ Ένζυμο Liquozyme
- ◆ Ένζυμο Lipolase

◆ Ένζυμο Alcalase

3.2.3 Μέθοδοι

3.2.3.1 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 του 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.

	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

Πίνακας 1: Ορθογώνιος πίνακας L8 (Kim S.T. et al., 2004)

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 S.T. et al., 2004), (Tsui K.L., 1992), (Kacker P.N., 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 S.T. et al., 2004). Αναλόγως της φύσης της απόκρισης, ο λόγος S/N μπορεί να πάρει τρεις μορφές:

1. Λιγότερο είναι καλύτερο (Lower is better) $\frac{S}{N} = -10 * \log$
2. Βέλτιστο είναι καλύτερο (Nominal is best) $\frac{S}{N} = -10 * \log V_e$
3. Μέγιστο είναι καλύτερο (Higher is better) $\frac{S}{N} = -10 * \log$

Όπου r: ο αριθμός δοκιμών και γ_i: το αποτέλεσμα της δοκιμής

Για να προκύψει αυτός ο λόγος είναι απαραίτητες 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 μια ανάλυση Taguchi μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη συνέχεια να μελετηθούν κάποιες αλληλεπιδράσεις αν τα αποτελέσματα δεν ικανοποιούν (Kim S.T. et al., 2004), (Tsui K.L., 1992), (Kacker P.N., 1989).

3.2.4 Μέθοδοι εκχύλισης

3.2.4.1 Συμβατική εκχύλιση

Βάση πειραματικών μετρήσεων που εστίασαν στην πολικότητα του διαλύτη, στη συγκέντρωση του *Sideritis Scardica*, στο χρόνο εκχύλισης όσο και στις συνθήκες εκχύλισης (θερμοκρασία και ταχύτητα ανάδευσης), επιλέχθηκαν τα παρακάτω:

Διαλύτης	60% EtOH
Συγκέντρωση <i>Sideritis Scardica</i>	5% (50 g/L)
Χρόνος εκχύλισης	24h
Συνθήκες εκχύλισης	T=30 °C , R=180rpm

Πίνακας 2: Παράμετροι πειράματος

Αρχικά ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό 1g φυτικού υλικού *Sideritis Scardica* και σε αυτό προστέθηκαν 20 ml διαλύτη αναλογίας 60% EtOH και 40% ρυθμιστικού διαλύματος. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε ήπιες συνθήκες για 24h. Μετά το πέρα της ανάδευσης ακολούθησε διήθηση υπό κενό του διαλύματος σε προζυγισμένο ηθμό. 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 αφού φυγοκεντρήθηκαν πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονται στο υπερκείμενο.

3.2.4.2 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης

Βάση πειραματικών μετρήσεων που εστίασαν στον χρονικό σχεδιασμό και στην ποσότητα του ενζυμικού φορτίου επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί ο παρακάτω σχεδιασμός 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 3: Παράγοντες και τα επίπεδά του που μελετήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο Taguchi.

Πείραμα	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

Πίνακας 4: Πειράματα βάσει του σχεδιασμού Taguchi.

Όνομα	Είδος ενζύμου	Περιεχόμενο	Βέλτιστες συνθήκες
Celluclast 1.5L	Κυτταρινολυτικό	Κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάσες	T=50-55 °C, pH=5.0-5.5
Liquozyme	Αμυλολυτικό	A-Αμυλάση	T=45-50 °C, pH=5.0
Alcalase	Πρωτεολυτικό	Πρωτεάση (σουμπτιλίσίνη)	T=50-55 °C, pH=7.0
Lipolase	Λιπολυτικό	Λιπάση	T=50-55 °C, pH=7.0-8.0

Πίνακας 5: Στοιχεία χρησιμοποιούμενων ενζύμων

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 $125 \frac{g}{L}$. Υπολογίστηκε και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε ενζύμου (μL) έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη ενεργότητα ενζύμου 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.

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

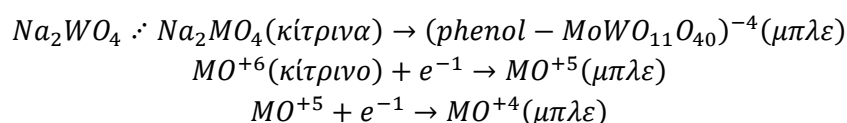
Τέλος τα δείγματα συλλέχθηκαν και διηθήθηκαν υπό κενό σε προζυγισμένους ηθμούς. Το στερεό υπόλειμμα, όπως και στη συμβατική εκχύλιση, οδηγήθηκε προς ξήρανση στους 60°C μέχρι σταθερού βάρους και έπειτα ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό. Τα διηθήματα τοποθετήθηκαν σε περιέκτες δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε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

3.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

3.3.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) έχει προταθεί εδώ και πολλά χρόνια ως μία τυποποιημένη μέθοδος για τον ποιοτικό έλεγχο και τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Προτάθηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών και συγκεκριμένα τη χρωματομετρική εκτίμηση της τυροσίνης, το 1927 από τους O. Folin και V. Ciocalteu, καθώς η εισαγωγή του αντιδραστήριου F-C έδινε λύση στα προβλήματα καθίζησης και θολότητας που εμφανίζονταν. (O.Folin, V.Ciocalteu, 1927)

Το αντιδραστήριο αυτό είναι πολύ σταθερό αν δεν αναχθεί, ακόμα κι όταν αραιωθεί, υπό την προϋπόθεση ότι προστατεύεται από το φως, καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Το Folin-Ciocalteu (F-C) αποτελεί διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα, όπου το μολυβδαίνιο και το βολφράμιο βρίσκονται στην κατάσταση οξειδωσης 6+. Κατά την αντίδραση του (F-C) με ένα αναγωγικό, σχηματίζονται το μπλε μολυβδαίνιο και το μπλε βολφράμιο με μέση οξειδωτική κατάσταση 5 έως 6.



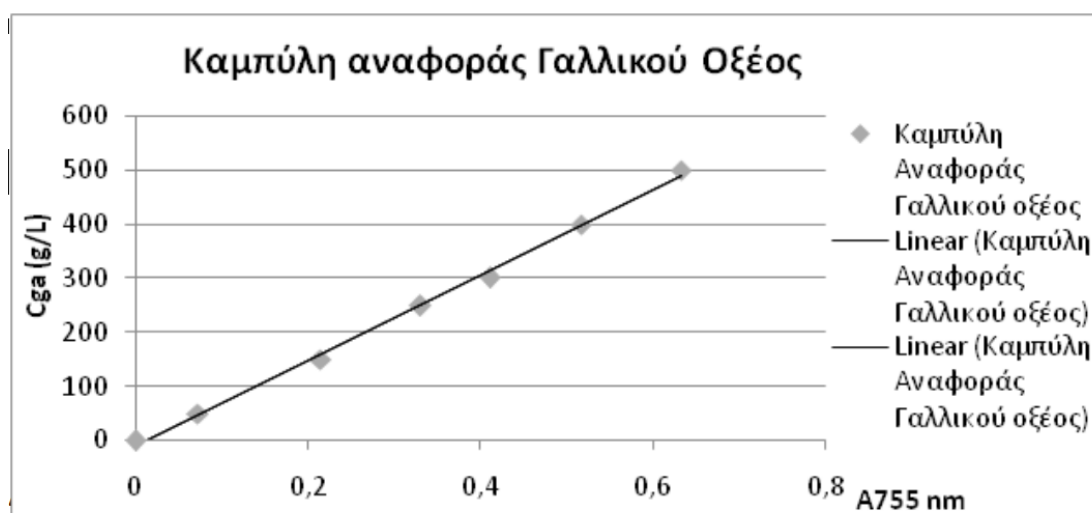
Η αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH και γρηγορότερη σε βασικό, ενώ χαρακτηρίζεται από ακρίβεια και ευαισθησία, αλλά έλλειψη εξειδίκευσης. Το σχηματιζόμενο μπλέ χρώμα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Η οξείδωση λόγω αέρα, μετά την προσθήκη αλκαλίων, είναι πιθανό να μειώσει την περιεκτικότητα σε φαινόλες. Για αυτό τον λόγο η προσθήκη του αντιδραστηρίου F-C πραγματοποιείται πριν την προσθήκη του αλκαλικού διαλύματος.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, για κάθε δείγμα αναμειγνύονται τα παρακάτω αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες και με την αναγραφόμενη σειρά (A Agbor et al., 2014):

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

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

Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση την καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, η οποία παρασκευάστηκε με πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος:



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς Γαλλικού οξέος

3.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών – Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου

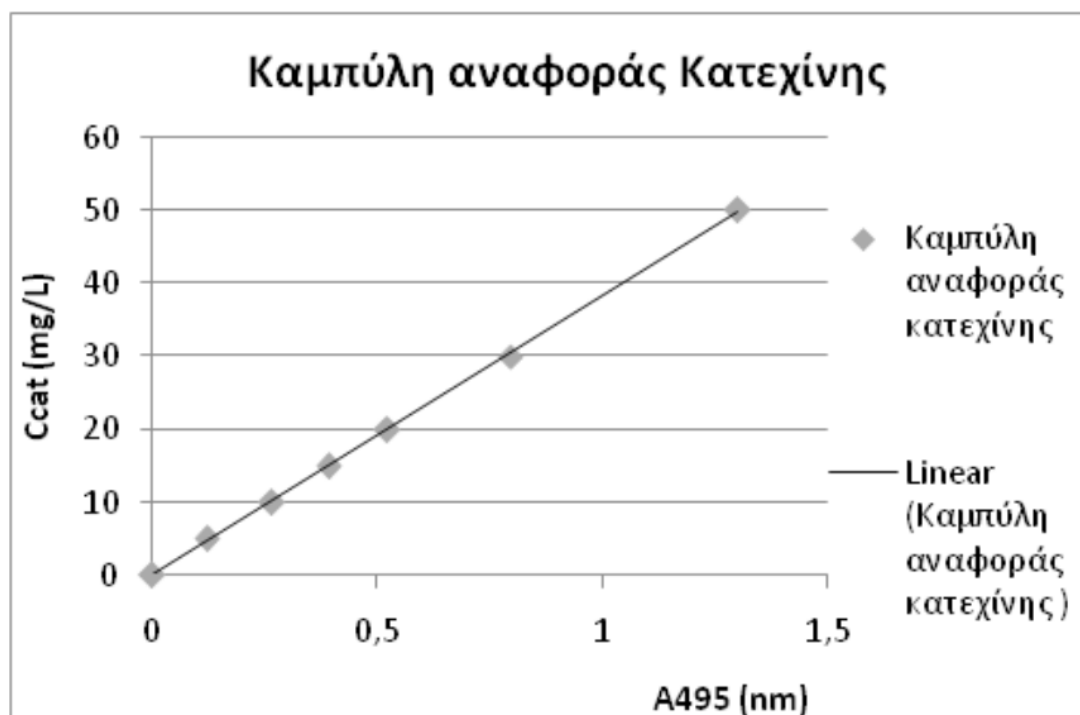
Ο προσδιορισμός των φλαβονοειδών στα δείγματα έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου. Αυτή η αντίδραση συμπλοκοποίησης λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό περιβάλλον υπό την παρουσία νιτρώδους νατρίου NaNO_2 και βασίζεται στη νίτρωση οποιουδήποτε αρωματικού δακτυλίου που φέρει μια ομάδα κατεχόλης, τις οποίες οι τρεις ή τέσσερις θέσεις δεν είναι υποκατεστημένες ή παρεμποδισμένες από εστέρες. Μετά την προσθήκη του Al^{+3} , σχηματίζεται ένα κίτρινο σύμπλοκο το οποίο γίνεται κόκκινο αμέσως μετά την προσθήκη του NaNO_2 .

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, για κάθε δείγμα αναμειγνύονται τα παρακάτω αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες και με την αναγραφόμενη σειρά (Anokwuru et al., 2011):

- 125 μL δείγματος
- 75 μL υδατικού διαλύματος NaNO_2 5% (w/v)
(επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για $t=6\text{min}$)
- 150 μL υδατικού διαλύματος AlCl_3 10% (w/v)
(επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για $t=5\text{min}$)
- 750 μL υδατικού διαλύματος NaOH 1M
- 1400 μL απιονισμένου H_2O (ώστε ο συνολικός όγκος του δείγματος να είναι 2,5 mL)

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

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε φλαβονοειδή, έγινε κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτό των ολικών φαινολικών, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς των φλαβονοειδών η οποία έγινε με χρήση πρότυπου διαλύματος κατεχίνης:



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς Κατεχίνης

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,

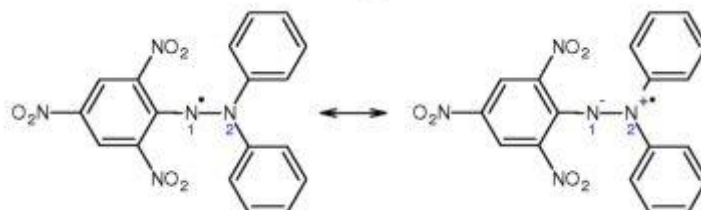
Ccat: η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς,

Vext: ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα,

mext: η μάζα του δείγματος.

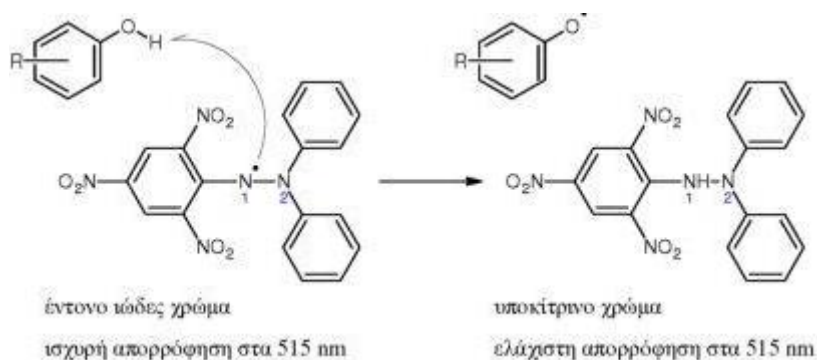
3.3.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης – δοκιμή DPPH

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορισμένων ενώσεων ή εκχυλισμάτων, γίνεται μέσω της αντίδρασης αυτών με τη ρίζα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH \cdot) σε μεθανολικό διάλυμα. Η ρίζα αυτή φέρει έντονο ιώδες χρώμα και είναι πολύ σταθερή λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού (Τσιμογιάννης, 2008).



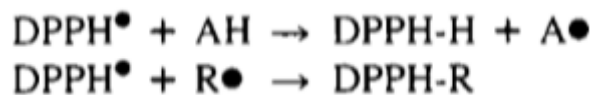
Εικόνα 12: Δομές συντονισμού της ρίζας DPPH

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



Εικόνα 13: Αντίδραση DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών

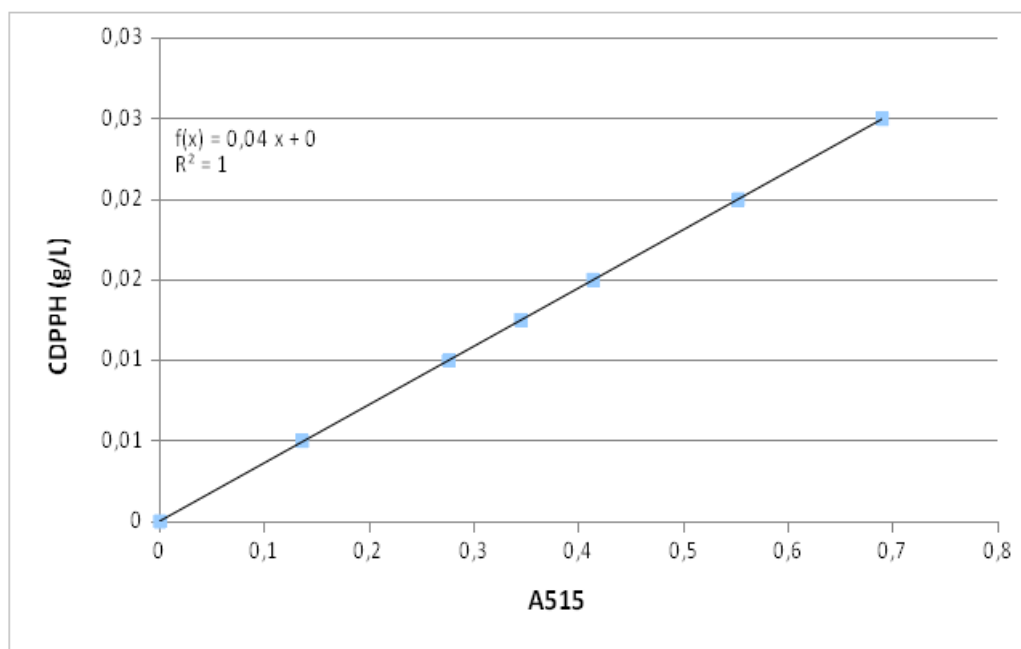
Η DPPH \cdot είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα αζώτου, εμπορικά διαθέσιμη, που εμφανίζει βαθύ πορφυρό χρώμα και ισχυρή απορρόφηση στα 515nm. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που εμφανίζονται στο μέσο μετατρέπουν τη ρίζα DPPH \cdot σε ένα πιο σταθερό μόριο DPPH, δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Συνεπώς, παρατηρείται αλλαγή χρώματος από πορφυρό σε ανοιχτό κίτρινο, το οποίο επιτρέπει τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. (Z. Akar, M. Küçük, H. Doğan, 2017)



Εικόνα 14: Αναγωγή του DPPH από αντιοξειδωτικό AH ή άλλη ρίζα R

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων εκφράζεται μέσω του δείκτη IC₅₀, 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. (Τσιμογιάννης, 2008)

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος των (Brand-Williams et al., 1995). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, παρασκευάζεται ένα stock μεθανολικό διάλυμα DPPH. Ζυγίζονται 2,5mg DPPH και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία εν συνεχεία προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Η προσθήκη της μεθανόλης γίνεται σιγά σιγά και ακολουθεί έντονη ανακίνηση της φιάλης (καθώς το DPPH διαλύεται δύσκολα), μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως το DPPH, το οποίο προσδίδει ένα σκούρο μωβ χρώμα στο διάλυμα. Το μεθανολικό διάλυμα DPPH είναι φωτοευαίσθητο, επομένως το διάλυμα αυτό φτιαχνόταν κάθε φορά που ακολουθούνταν η συγκεκριμένη μέθοδος (ώστε να είναι φρέσκο), ενώ τα δείγματα φυλάσσονταν στο σκοτάδι. Τα εκχυλίσματα του φλοιού του καρπού, αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρις ότου να δημιουργηθούν οι συγκεντρώσεις 0,025C0, 0,05C0, 0.1C0 και 0.2C0. Μετά την παρασκευή των εκάστοτε συγκεντρώσεων, αναμίχθηκαν 3,9 mL διαλύματος DPPH και 0,1 mL του εκάστοτε εκχυλίσματος και ακολούθησε ανάδευση σε μηχανήμα τύπου Vortex. Παράλληλα παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα από την ανάμειξη 3,9 mL διαλύματος DPPH και 0,1 mL απιονισμένου νερού, το τυφλό διάλυμα. Τα δείγματα στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για t=30min. Ο χρόνος αυτός ήταν αρκετός για να ολοκληρωθεί η αντίδραση της οξειδωσης. Τέλος μετά το πέρας της μισής ώρας, ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος λ=515nm.



Διάγραμμα 4: Καμπύλη αναφοράς DPPH

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του εκάστοτε εκχυλίσματος έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς:

Αυτή κατασκευάστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trolox ως πρότυπο διάλυμα. Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς για την αντιοξειδωτική δράση, και είναι ανάλογο της βιταμίνης D.

Με βάση την καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH και του μη ανηγμένου DPPH, μετά το πέρας της εκάστοτε αντίδρασης οξείδωσης. Για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αντιοξειδωτικού-DPPH, έγινε αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε συγκέντρωση DPPH, και στη συνέχεια κατασκευάστηκε το γράφημα Cant- Δ CDPDH. Τέλος, έγινε προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας, από την οποία υπολογίστηκε το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο (μέσω της κλίσης), αλλά και ο δείκτης IC₅₀.

3.3.4 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

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

Σύμφωνα με τη μέθοδο DNS, σε 250μL δείγματος προσθέτονται 250μL αντιδραστηρίου DNS. Το δείγμα αφήνεται να βράσει για 5 λεπτά, στη συνέχεια προστίθενται 2 mL απιονισμένου νερού και το δείγμα φωτομετρείται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος $\lambda=540$ nm. Ο προσδιορισμός των

αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο αυτή έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι η εξής:

$$C_{gl} = 1,4838 * A_{540} \text{ (3) με } R^2=0,995$$

3.3.5 Προσδιορισμός γλυκόζης

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

$$C_{gl} = 1,0344 * A_{510} \text{ (4) με } R^2=0,991$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συμβατική εκχύλιση

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα για το δείγμα της συμβατικής εκχύλισης.

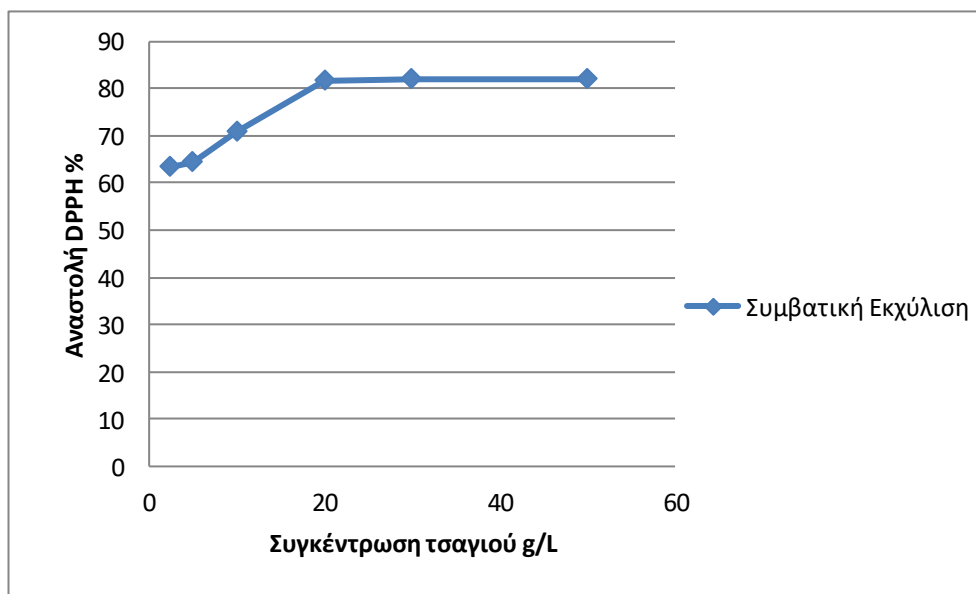
#	Απώλεια βάρους (%)	Γλυκόζη (mg/100g τσαγιού)	Αναγωγικά σάκχαρα (mg/100g τσαγιού)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
Συμβατική	23,44	0,91 ± 0,03	6,37 ± 0,59	2531,90 ± 98,97	102,62 ± 5,31

Πίνακας 6: Πειραματικά αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση το αποτέλεσμα εκφράστηκε, 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 5: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

5. ΕΥΕ εκχύλιση

Με βάση πειραματικά αποτελέσματα που προηγήθηκαν της παρούσας ερευνητικής εργασίας επιλέχθηκαν σαν χρόνοι εκχύλισης οι 2.5 και 8 ώρες, ενώ σαν ενζυμικό φορτίο τα 2.5, 5 και 7.5 units.

5.1 ΕΥΕ με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Celluclast 1.5L

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα Celluclast 1.5 L παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

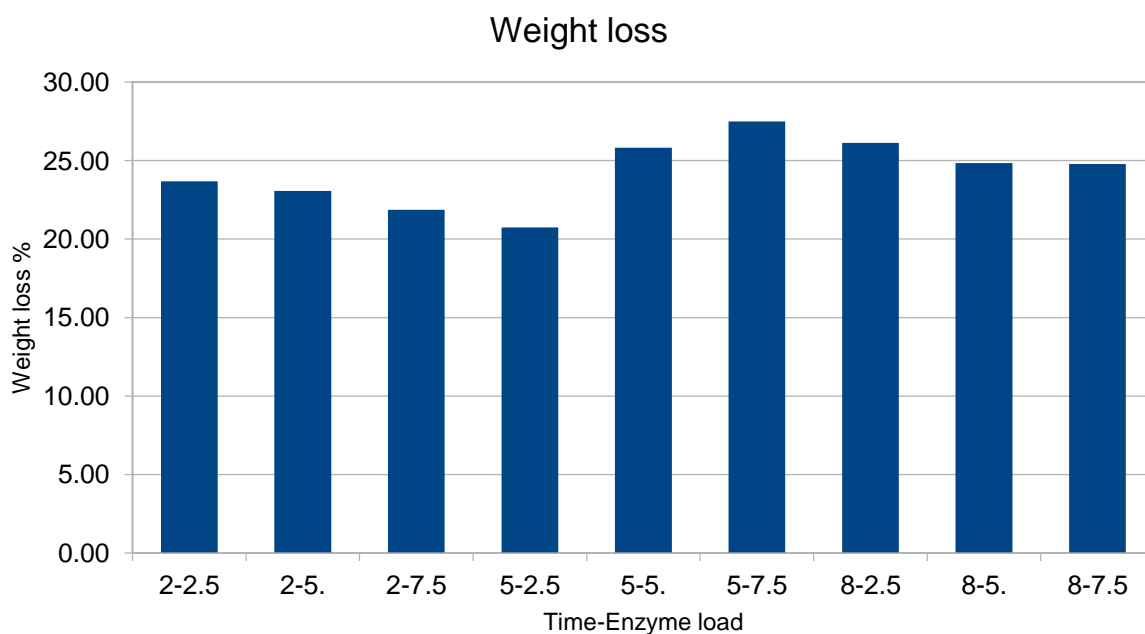
Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5
7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Πίνακας 7: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Celluclast 1.5L

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 6, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.



Διάγραμμα 6: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	15,80
5	-	22,89
8	-	19,72

Πίνακας 8: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

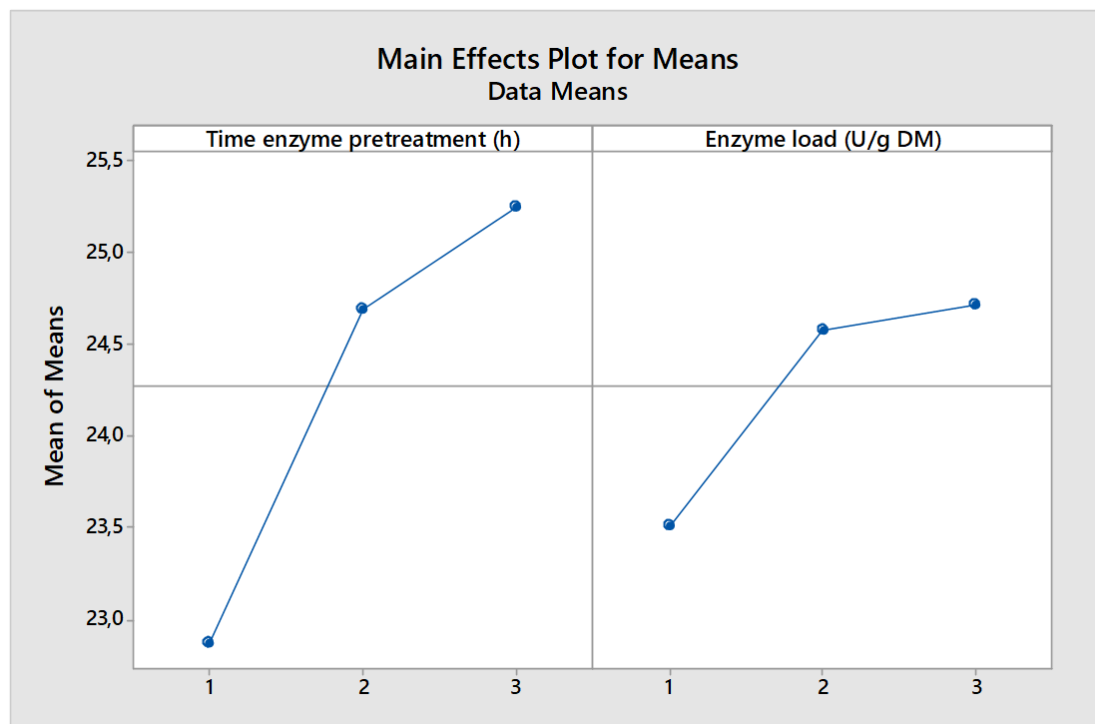
Στον Πίνακα Πίνακας 9 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	23,68	27,49
1	2	23,08	27,26
1	3	21,88	26,8
2	1	20,75	26,34
2	2	25,82	28,24
2	3	27,50	28,79

3	1	26,12	28,34
3	2	24,85	27,91
3	3	24,78	27,88

Πίνακας 9: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L

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) . Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών ,ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 10 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους

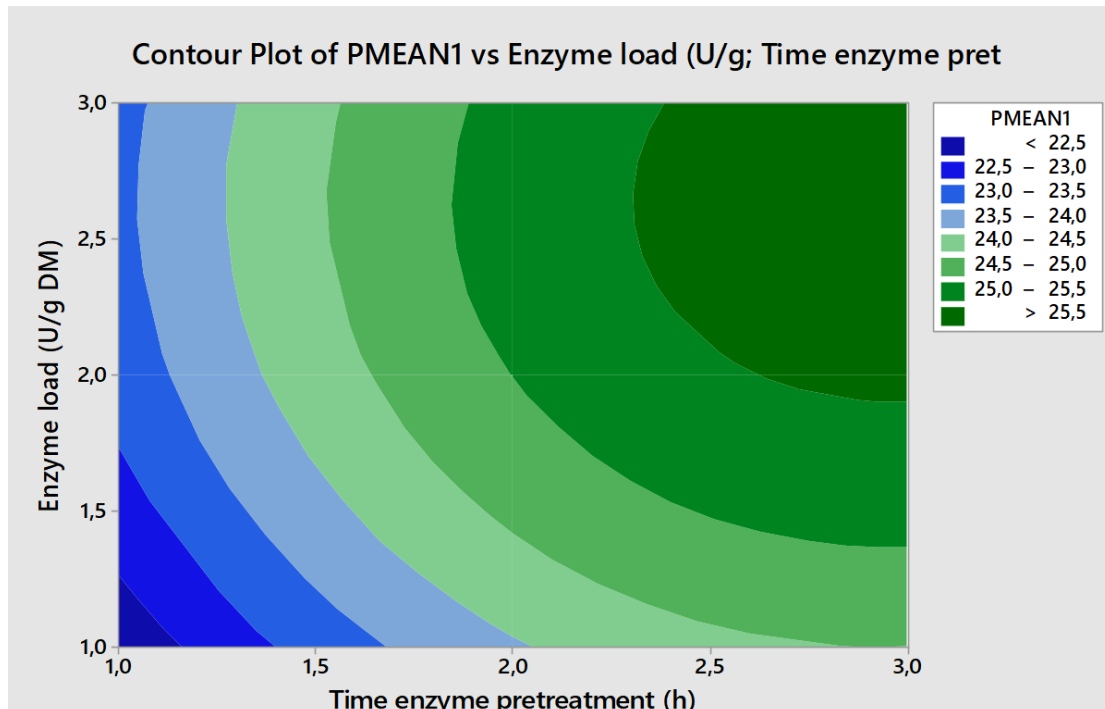
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	22,88	23,52
2	24,69	24,58
3	25,25 ^α	24,72 ^α
(max-min)	2,37	1,20
Ranking	1	2

Πίνακας 10: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους

^αΒέλτιστη τιμή

Σύμφωνα με τους Hascalik & Caydas (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N το οποίο συμπίπτει με τη μεγαλύτερη μέση τιμή. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 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 25,70%. 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).

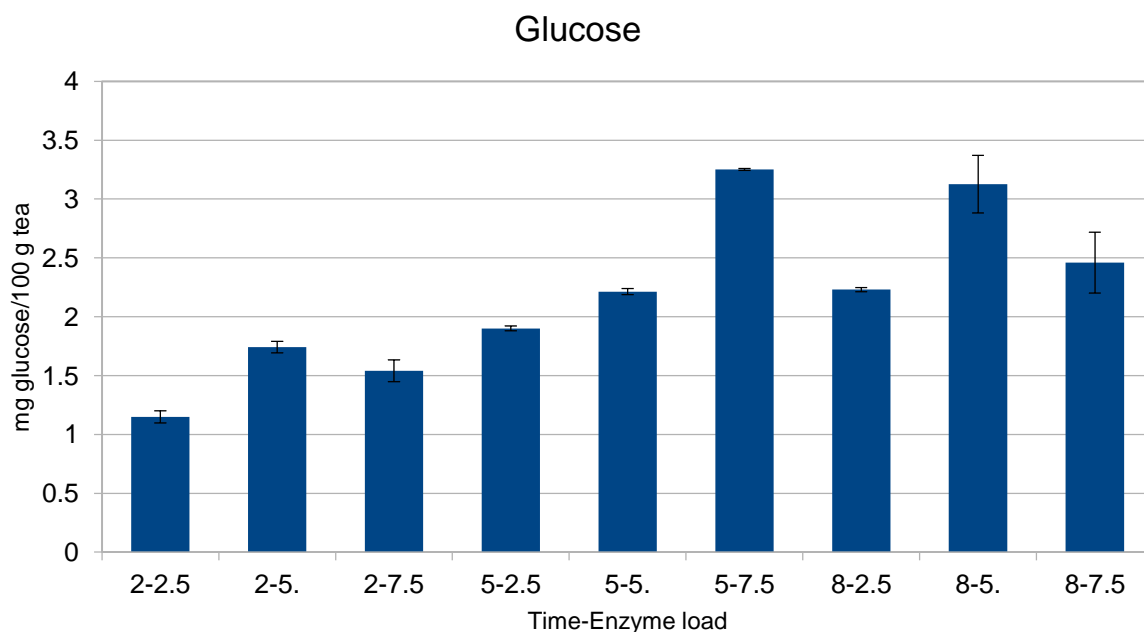


Διάγραμμα 8: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

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 9, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.



Διάγραμμα 9: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,98 ± 0,03
5	-	1,60 ± 0,01
8	-	1,99 ± 0,01

Πίνακας 11: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

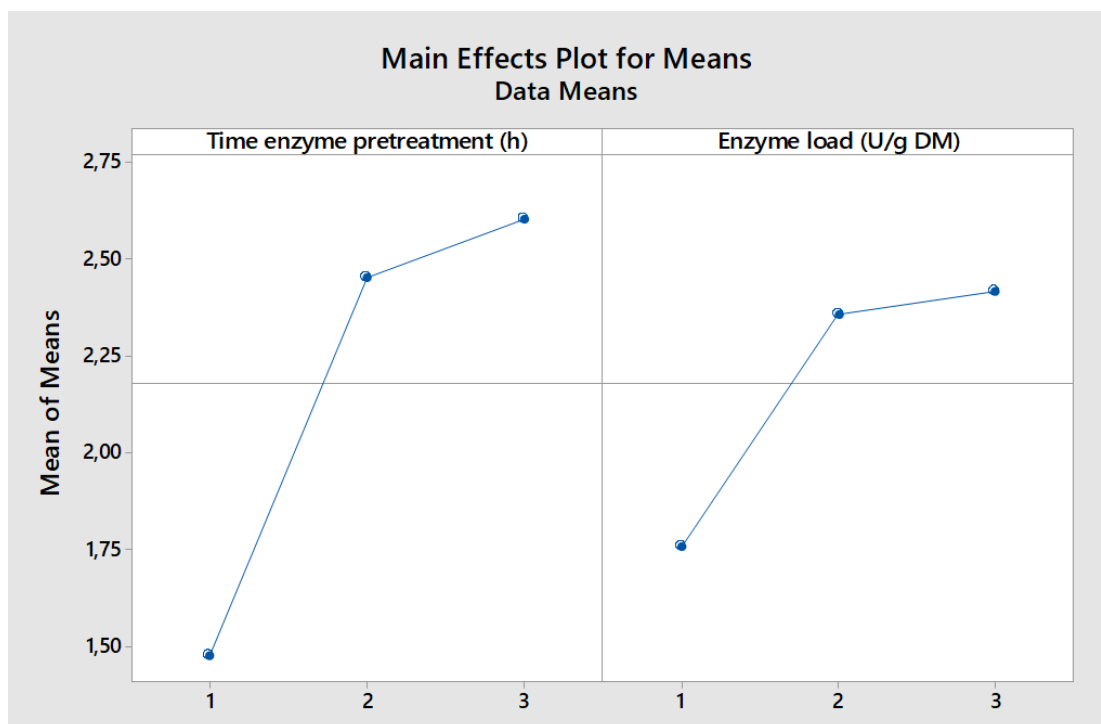
Στον Πίνακα Πίνακας 12 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	1,15	1,18
1	2	1,74	4,82

1	3	1,54	3,74
2	1	1,90	5,58
2	2	2,21	6,90
2	3	3,25	10,24
3	1	2,23	6,97
3	2	3,13	9,86
3	3	2,46	7,75

Πίνακας 12: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 12 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 10: διάγραμμα μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	1,477	1,760
2	2,455	2,361

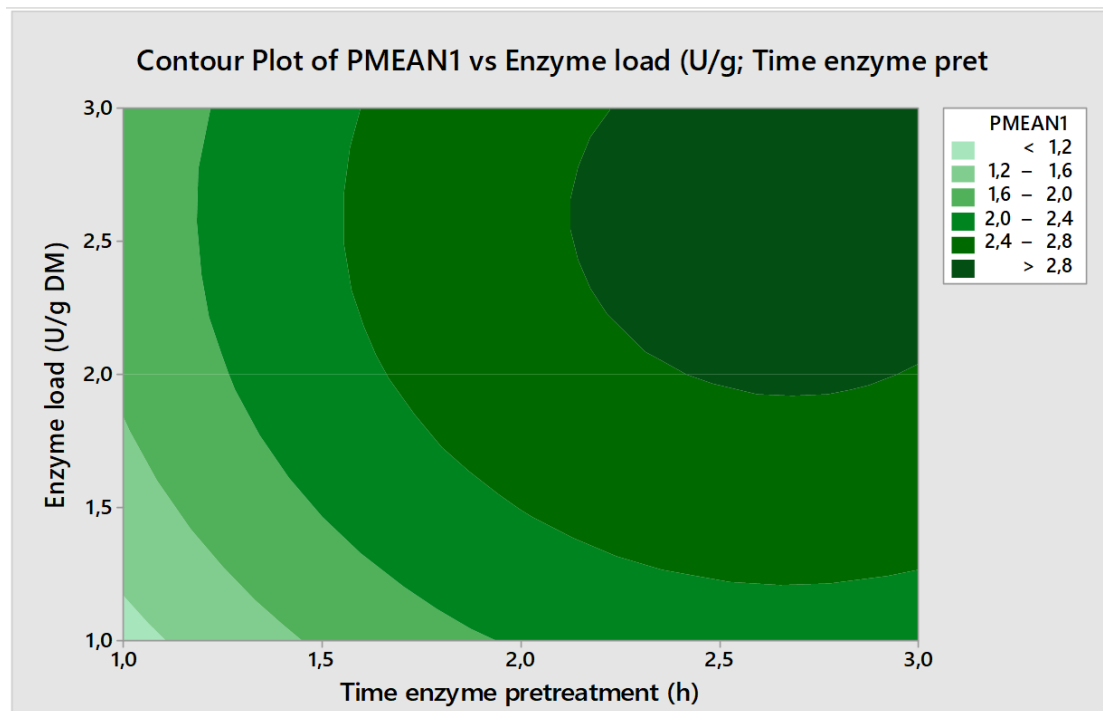
3	2,606 ^α	2,418 ^α
(max-min)	1,128	0,658
Ranking	1	2

Πίνακας 13: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

^αΒέλτιστη τιμή

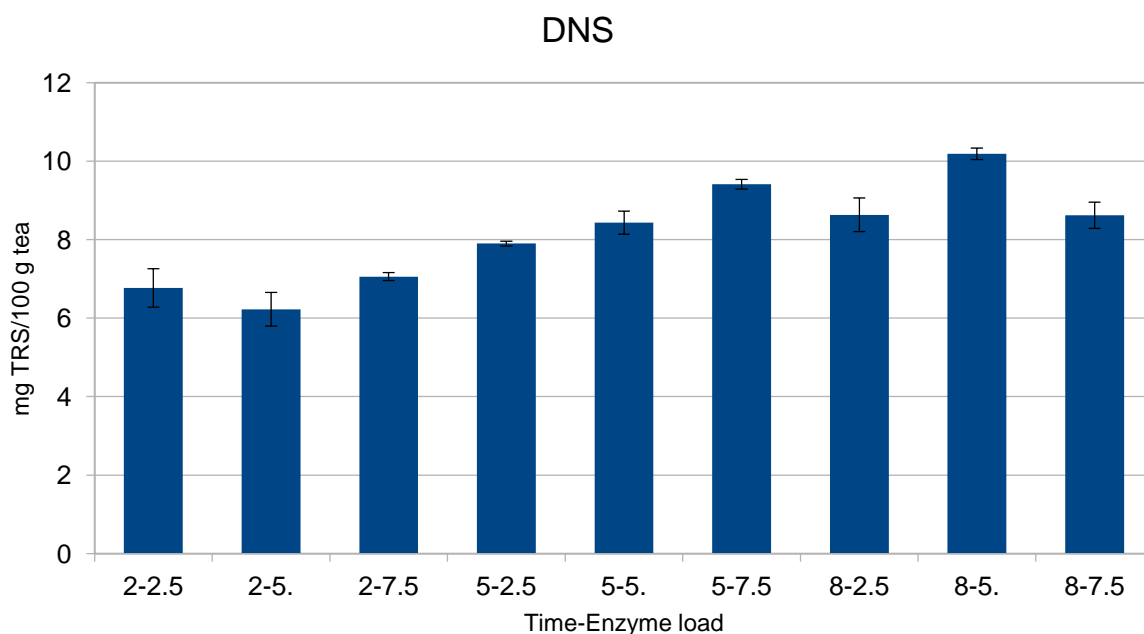
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 12 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 7.5 Units/g DM (επίπεδα 3,3) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 2.85 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 7-26).



Διάγραμμα 11: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 12, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.



Διάγραμμα 12: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	6,91 ± 0,17
5	-	6,88 ± 0,25
8	-	7,17 ± 0,00

Πίνακας 14: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

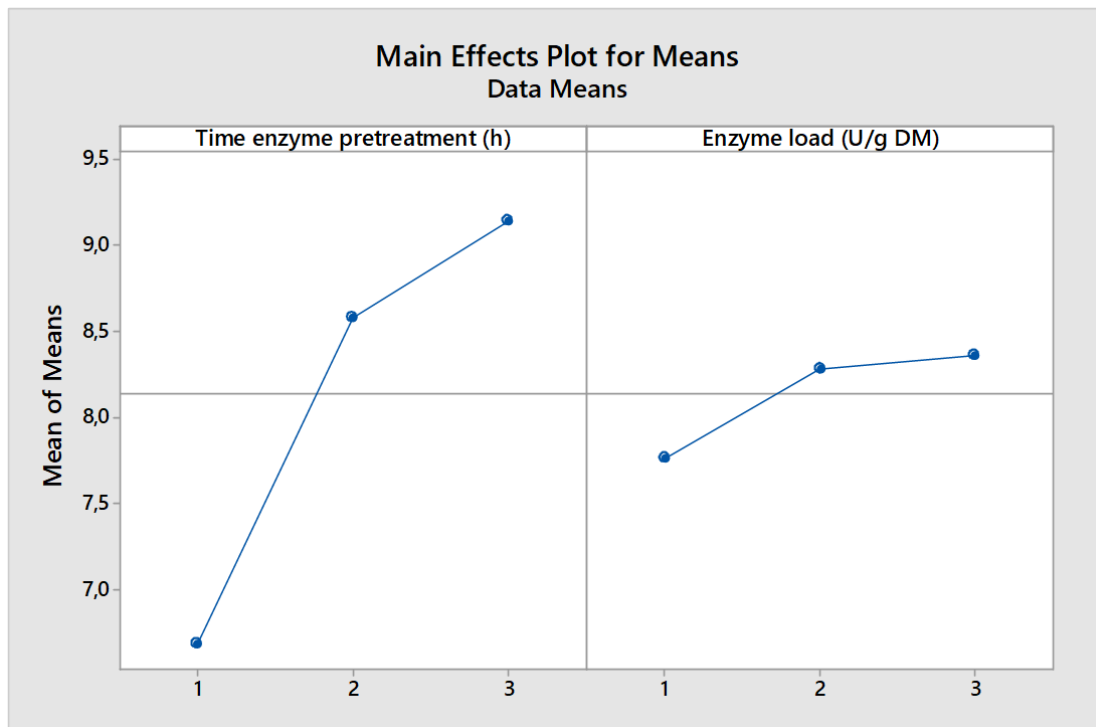
Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N

1	1	6,77	16,58
1	2	6,23	15,86
1	3	7,06	16,97
2	1	7,90	17,99
2	2	8,43	18,51
2	3	9,42	19,48
3	1	8,63	18,71
3	2	10,19	20,16
3	3	8,62	18,70

Πίνακας 15: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Cellulast 1.5L

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 15 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 13: διάγραμμα μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	6,684	7,768

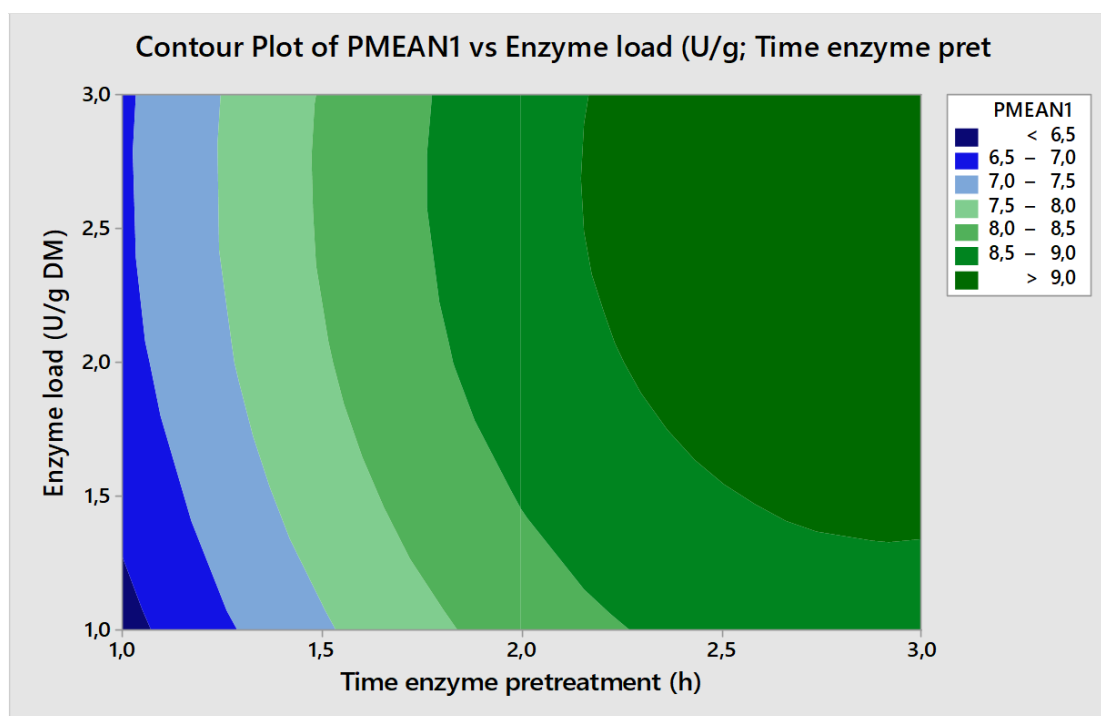
2	8,584	8,283
3	9,148 ^α	8,365 ^α
(max-min)	2,464	0,597
Ranking	1	2

Πίνακας 16: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 15 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 9.38 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

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

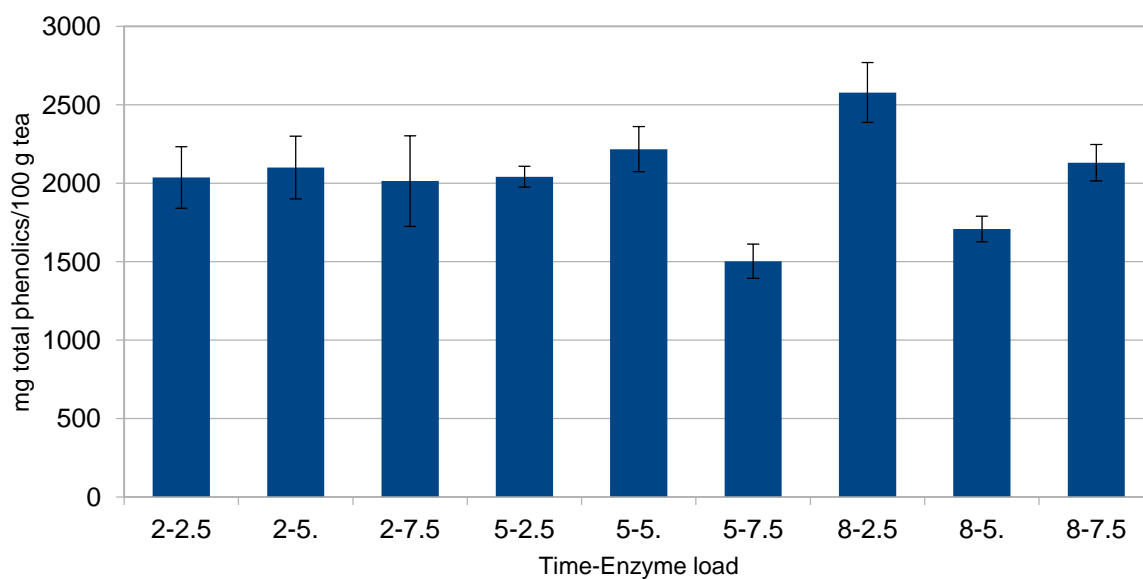


Διάγραμμα 14: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Οι ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία

Total phenolics



Διάγραμμα 15 : Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	2475,53 ± 22,9
5	-	1635,80 ± 127,55
8	-	2138,20 ± 76,95

Πίνακας 17: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

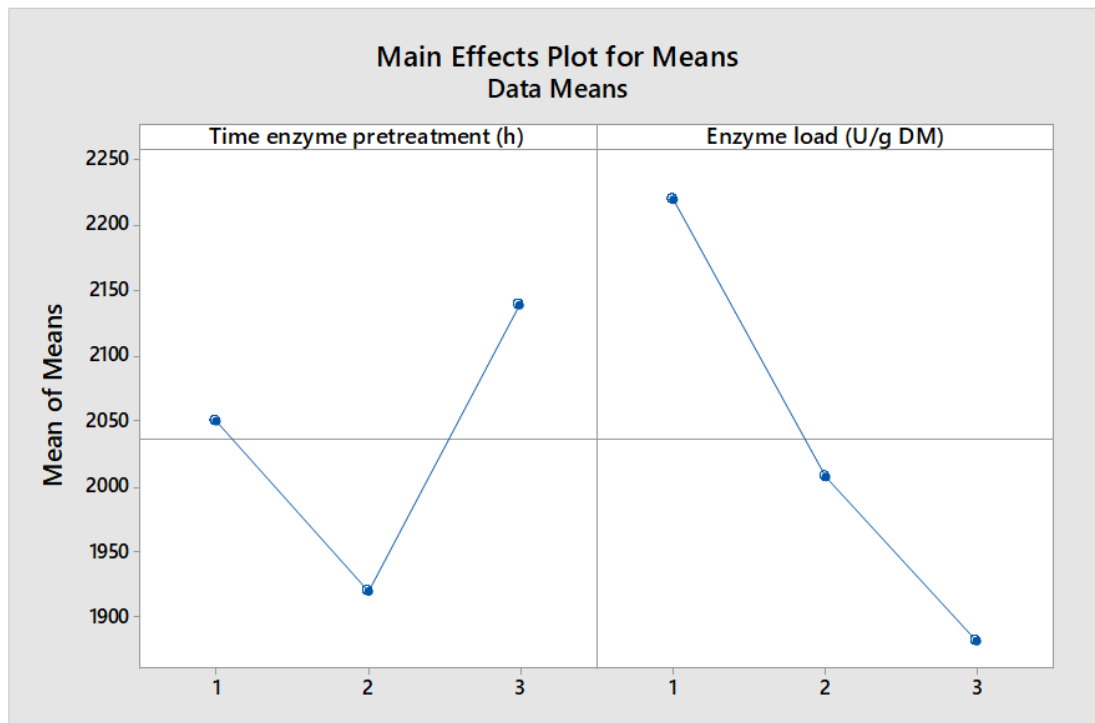
Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	2036,37	66,12
1	2	2099,62	66,38
1	3	2013,41	65,94
2	1	2041,17	66,19
2	2	2216,66	66,89
2	3	1502,64	63,50

3	1	2577,97	68,19
3	2	1707,82	64,63
3	3	2129,90	66,55

Πίνακας 18: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 18 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 16: Διάγραμμα μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

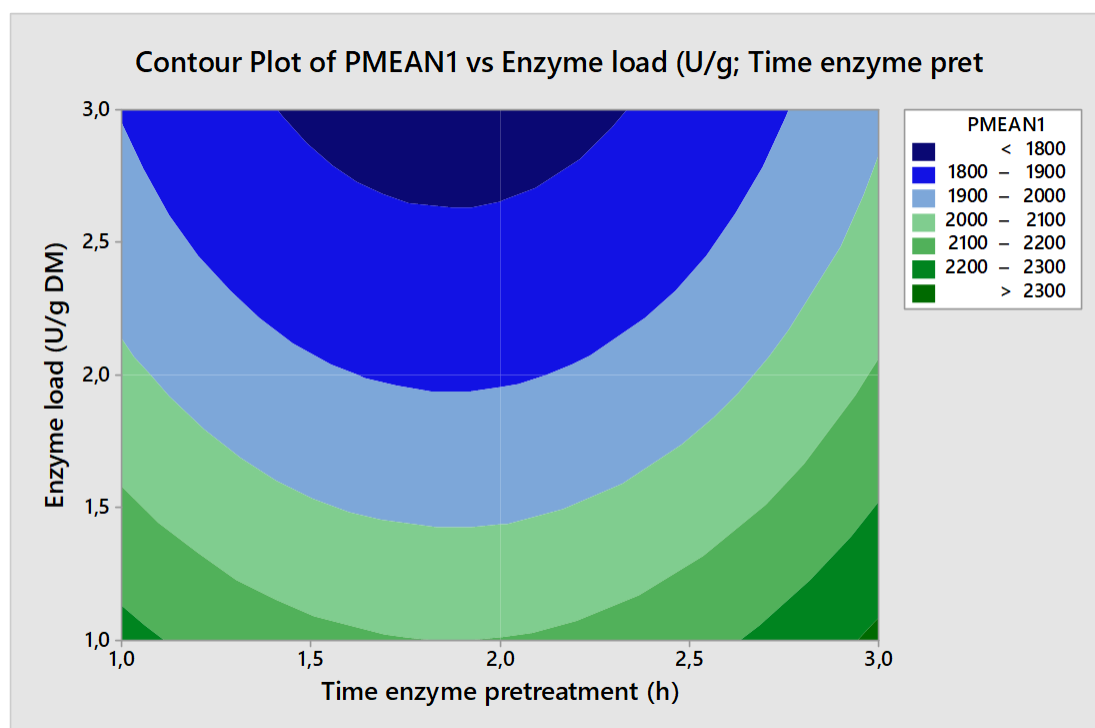
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	2050	2219 ^α
2	1920	2008
3	2139 ^α	1882
(max-min)	218	337
Ranking	2	1

Πίνακας 19: Πίνακας μέσων τιμών S/N για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 19 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM (επίπεδα 3,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2320,89 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

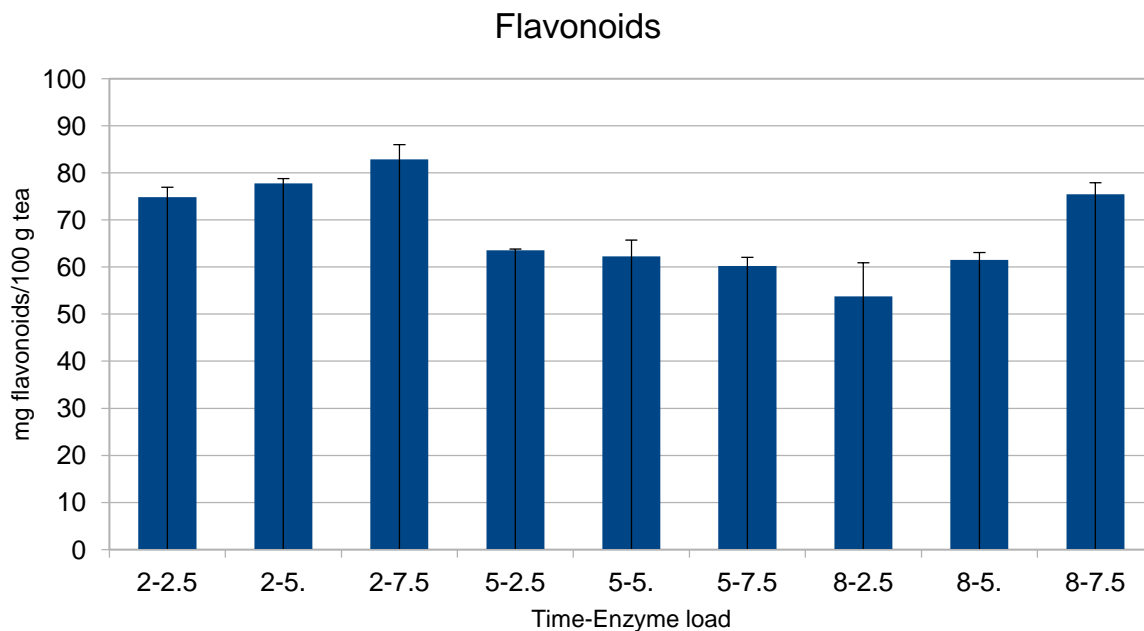
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 17).



Διάγραμμα 17: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 18, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.



Διάγραμμα 18 : Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	97,66 ± 3,52
5	-	64,98 ± 3,77
8	-	40,62 ± 0,53

Πίνακας 20: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

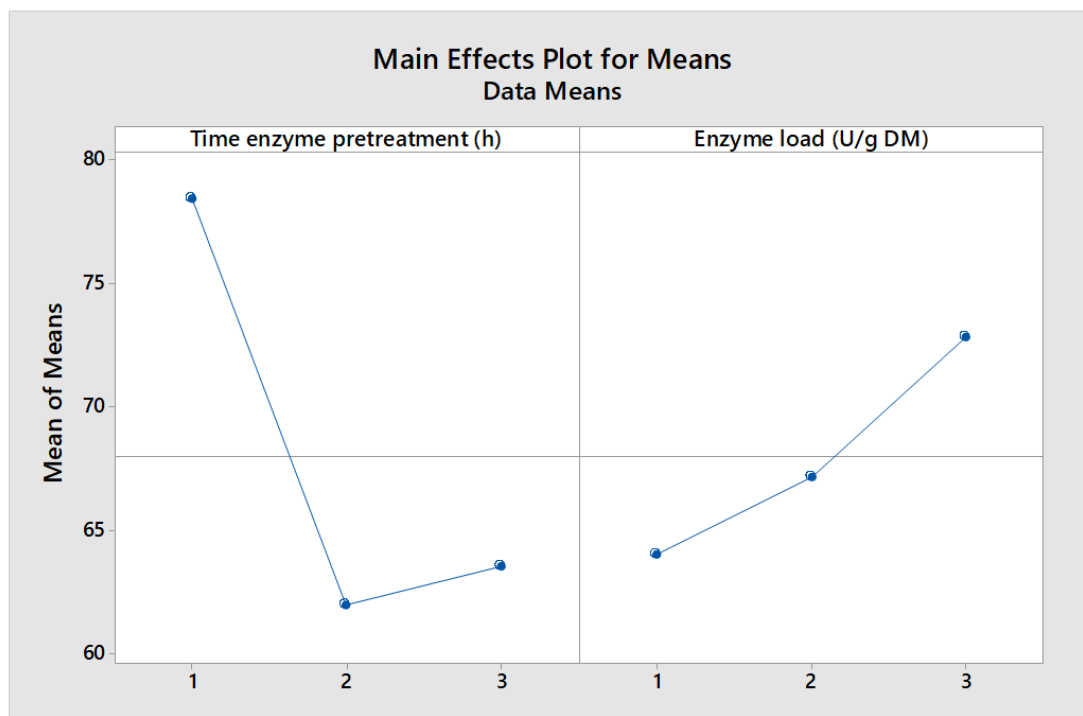
Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	74,85	37,48
1	2	77,76	37,81

1	3	82,85	38,36
2	1	63,59	36,07
2	2	62,25	35,86
2	3	60,20	35,59
3	1	53,76	34,50
3	2	61,52	35,78
3	3	75,46	37,55

Πίνακας 21: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Celluclast 1.5L

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



Διάγραμμα 19: S/N διάγραμμα για τα φλαβονοειδή

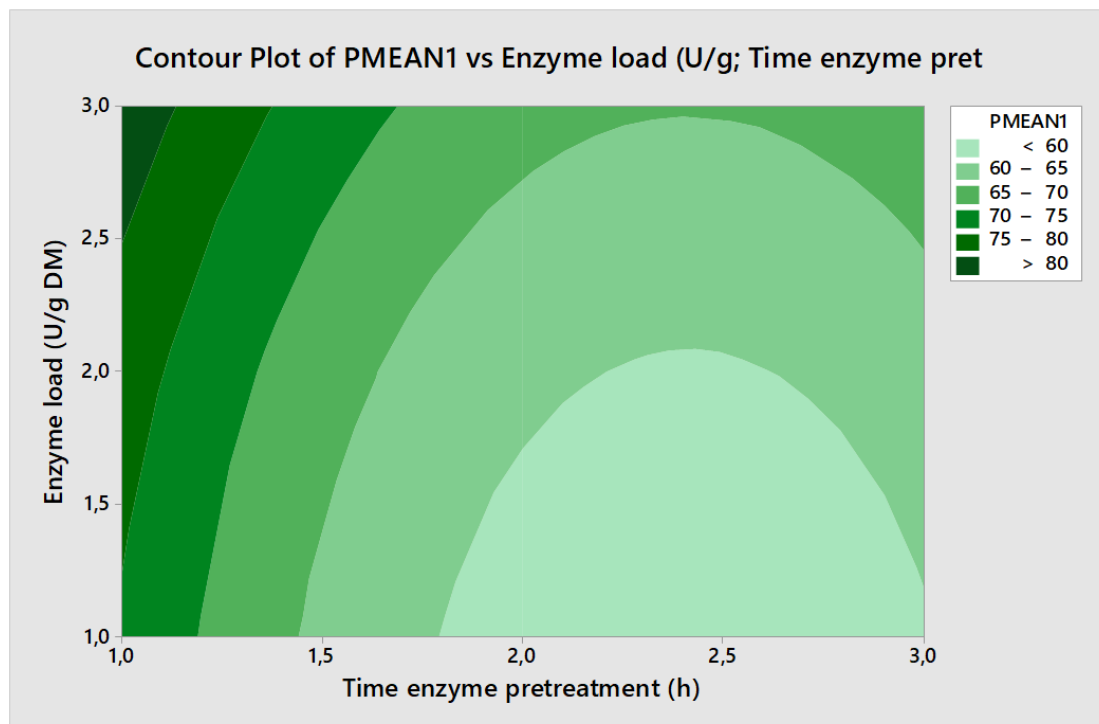
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	78,48 ^α	64,07
2	62,01	67,18
3	63,58	72,84 ^α
(max-min)	16,47	8,77
Ranking	1	2

Πίνακας 22: Πίνακας μέσων τιμών S/N για τα φλαβονοειδή

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των φλαβονοειδών 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 φλαβονοειδών είναι 83,29 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 20).



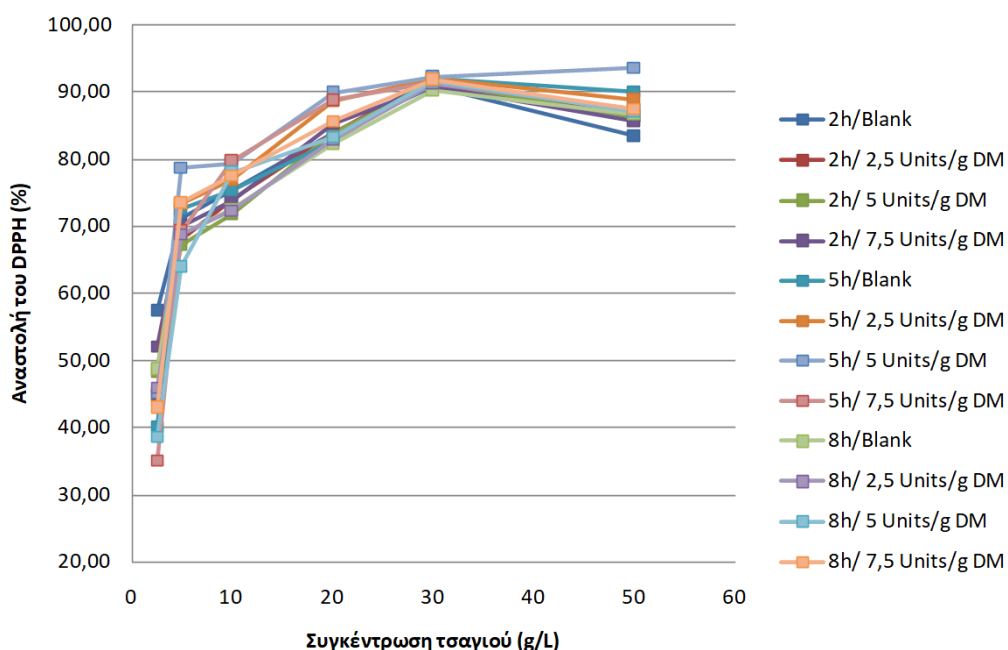
Διάγραμμα 20: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Αντιοξειδωτική δράση

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 21: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα 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 δράση.

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC ₅₀ (g/L)
2	2,5	3,0
2	5	2,6
2	7,5	2,2
5	2,5	2,6
5	5	3,0
5	7,5	3,6
8	2,5	2,8
8	5	3,6
8	7,5	3,1
2	-	2,2
5	-	3,2
8	-	2,6

Πίνακας 23: Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

5.2 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος *Liquozyme*

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα *Liquozyme* παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 5,0 για 2, 5 και 8 h (control).

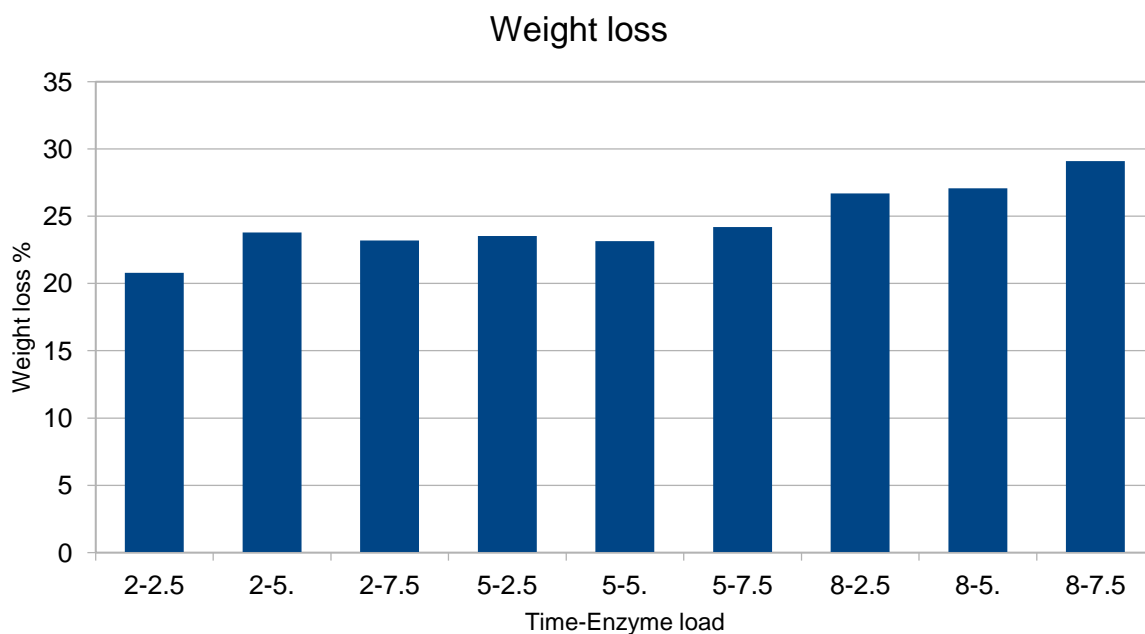
Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5
7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Πίνακας 24: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος *Liquozyme*

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 22, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 24 .



Διάγραμμα 22: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	26,26
5	-	24,22
8	-	23,09

Πίνακας 25: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

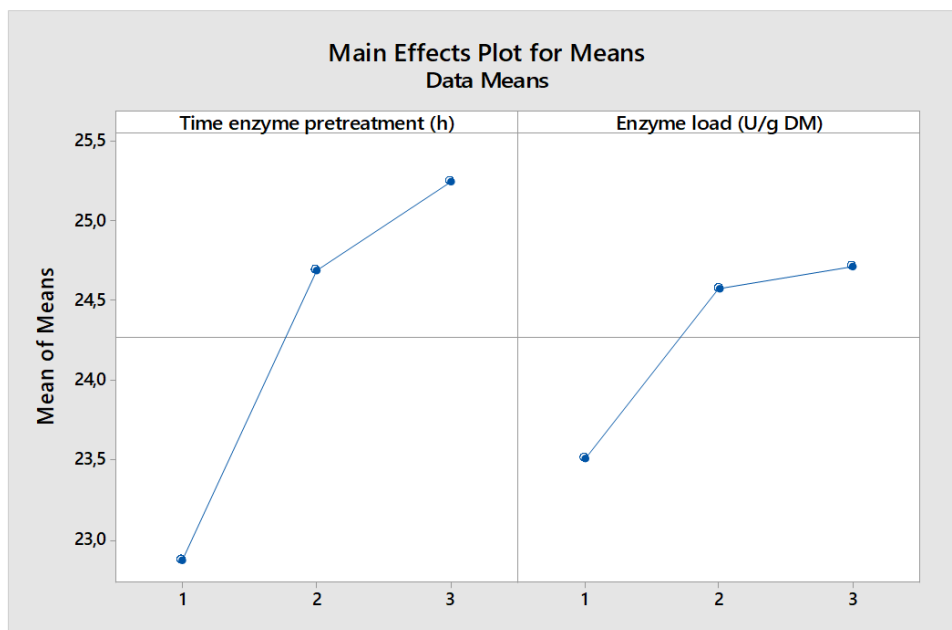
Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	20,80	26,36
1	2	23,79	27,53

1	3	23,20	27,31
2	1	23,54	27,43
2	2	23,16	27,31
2	3	24,20	27,68
3	1	26,70	28,53
3	2	27,08	28,65
3	3	29,11	29,28

Πίνακας 26: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με *Liquozyme*

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) . Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 23 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών ,ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 27 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 23: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους

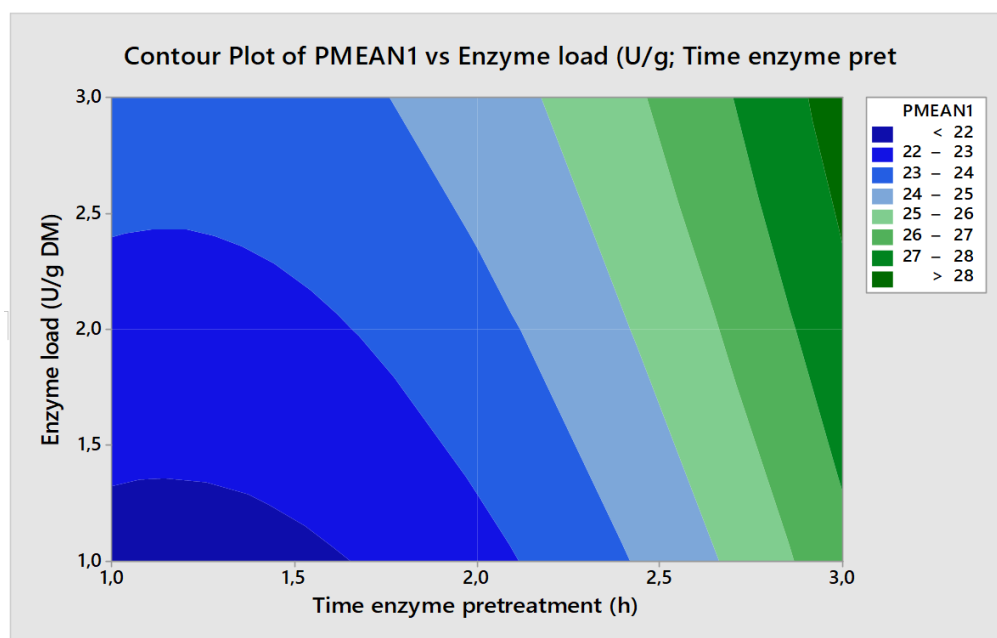
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	22,60	23,68
2	23,63	24,68
3	27,63 ^α	25,50 ^α
(max-min)	5,03	1,82
Ranking	1	2

Πίνακας 27: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους

^αΒέλτιστη τιμή

Σύμφωνα με τους Ηασχαλίκ & Ξαγδαξ (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N το οποίο συμπίπτει με τη μεγαλύτερη μέση τιμή. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 26 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 28,51%. 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 24).

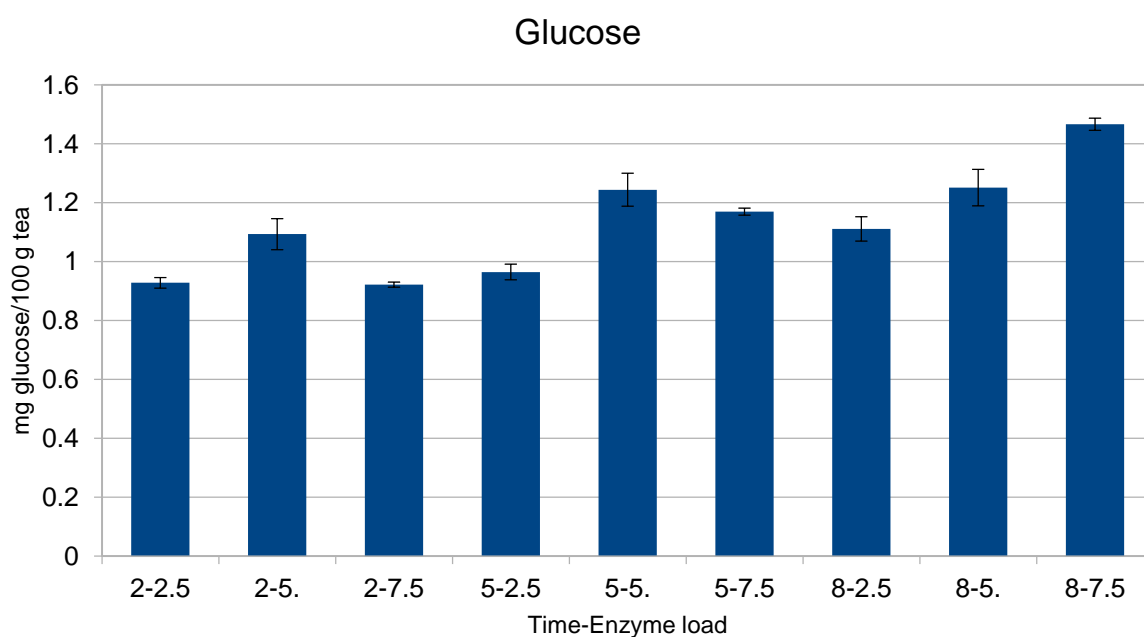


Διάγραμμα 24: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

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 25, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 28.



Διάγραμμα 25: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,63 ± 0,01
5	-	0,78 ± 0,01
8	-	0,96 ± 0,01

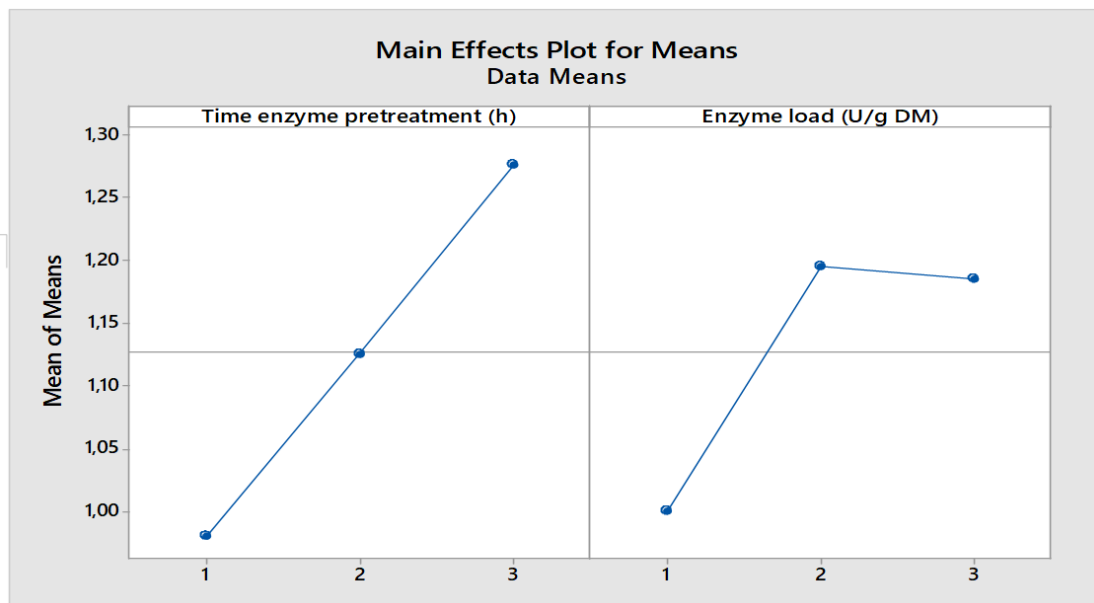
Πίνακας 28: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	0,93	-0,65
1	2	1,09	0,75
1	3	0,92	-0,71
2	1	0,96	-0,32
2	2	1,24	1,88
2	3	1,17	1,35
3	1	1,11	0,90
3	2	1,25	1,92
3	3	1,47	3,3

Πίνακας 29: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με *Liquozyme*

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 29 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 26: Διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

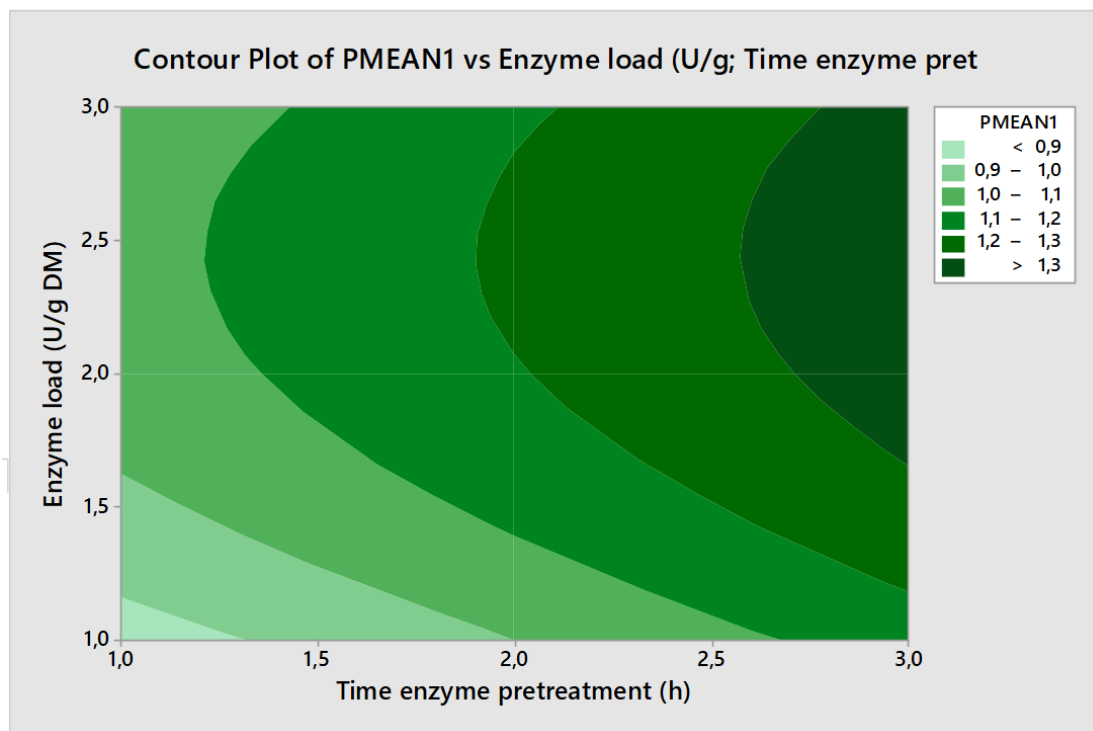
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	0,981	1,001
2	1,126	1,196 ^α
3	1,276 ^α	1,185
(max-min)	0,295	0,195
Ranking	1	2

Πίνακας 30: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

^αΒέλτιστη τιμή

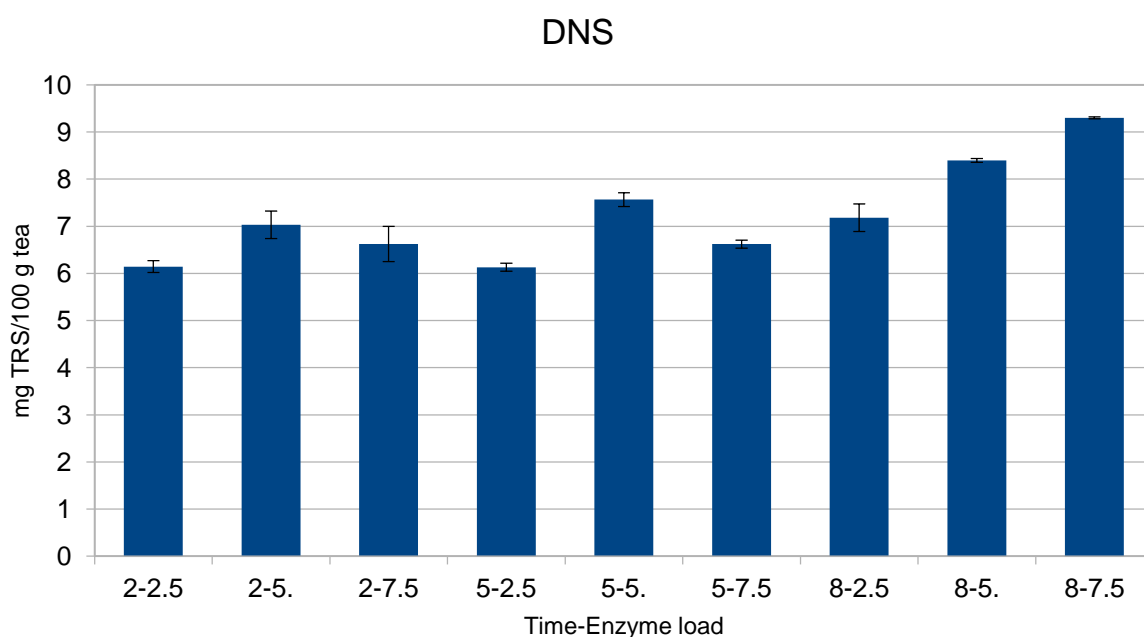
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 30 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 3,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 1.34 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 27).



Διάγραμμα 27: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 28, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 31.



Διάγραμμα 28: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	4,22 ± 0,33
5	-	5,87 ± 0,19
8	-	6,09 ± 0,19

Πίνακας 31: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

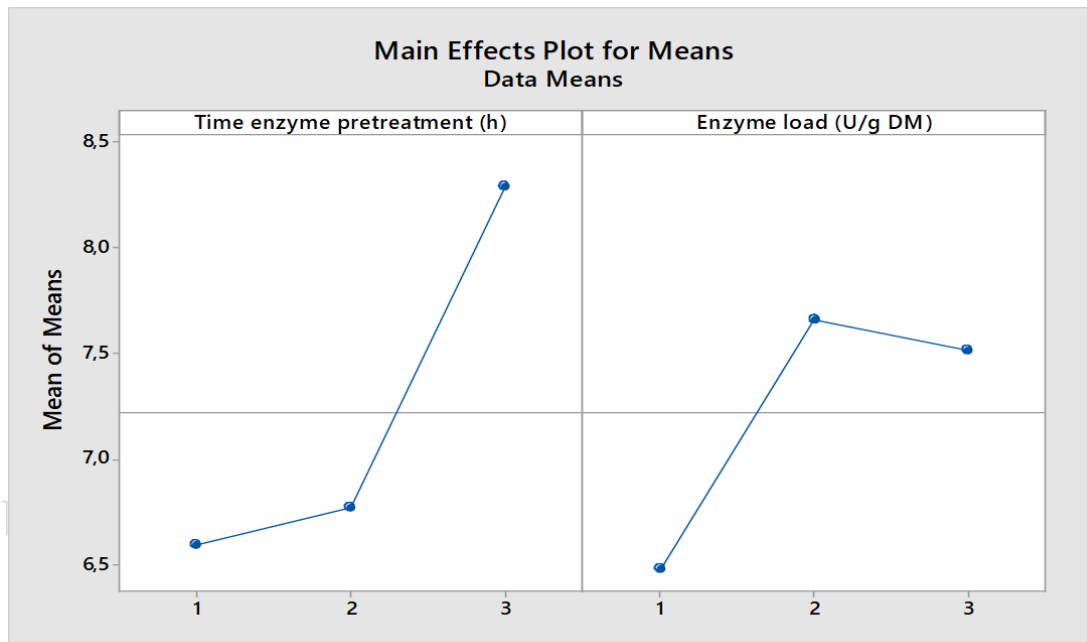
Στον Πίνακα 32 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	6,14	15,77
1	2	7,03	16,93
1	3	6,62	16,40

2	1	6,13	15,75
2	2	7,57	17,57
2	3	6,62	16,42
3	1	7,18	17,11
3	2	8,39	18,48
3	3	9,30	19,37

Πίνακας 32: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με *Liqozyme*

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 29 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 33 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 29: διάγραμμα μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

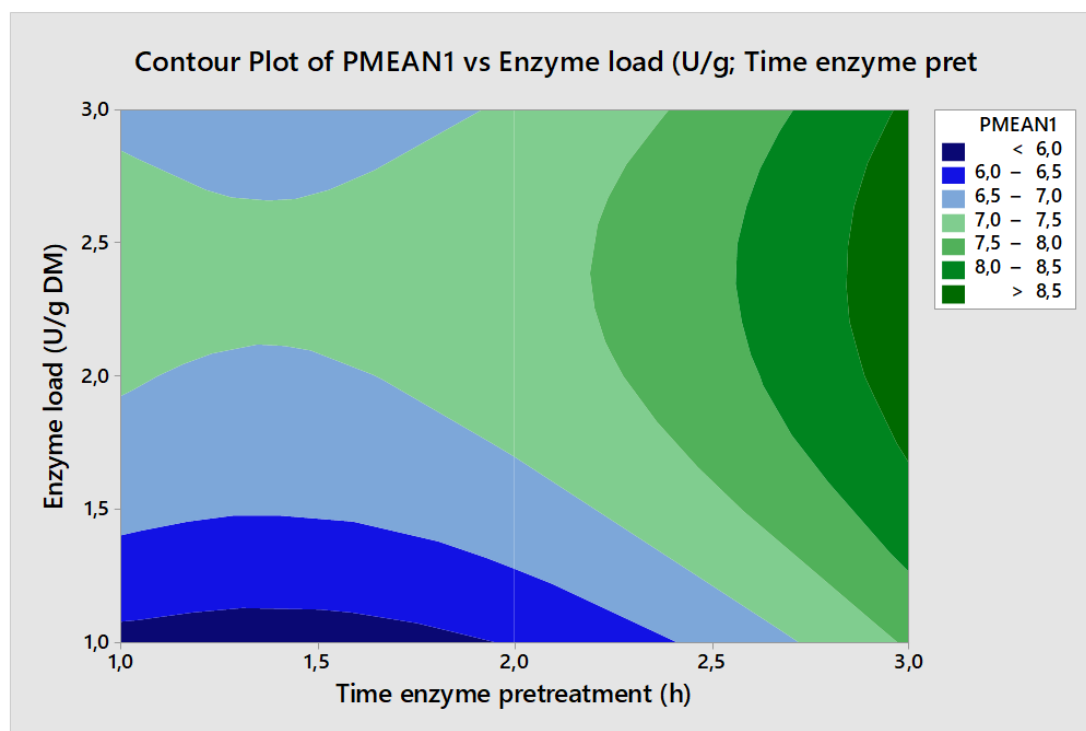
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	6,598	6,485
2	6,772	7,663 ^α
3	8,292 ^α	7,514
(max-min)	1,694	1,178
Ranking	1	2

Πίνακας 33: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 32 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 3,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 8,73 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

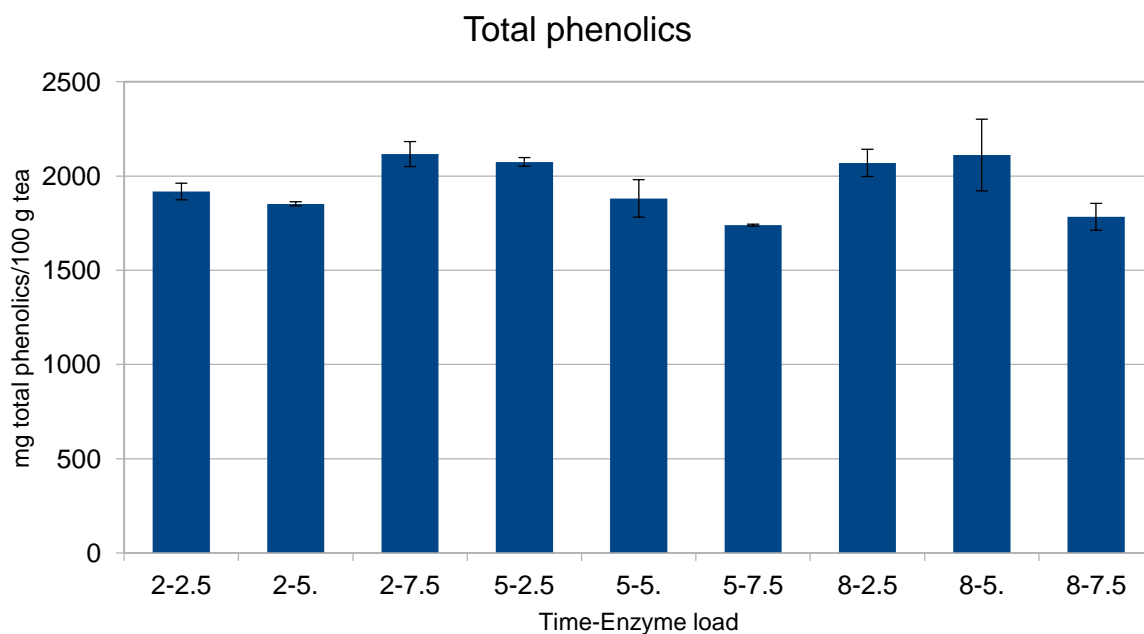
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 30).



Διάγραμμα 30: 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 31, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 34.



Διάγραμμα 31: Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	1747,38 ± 5,50
5	-	2276,82 ± 94,84
8	-	2058,14 ± 33,57

Πίνακας 34: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

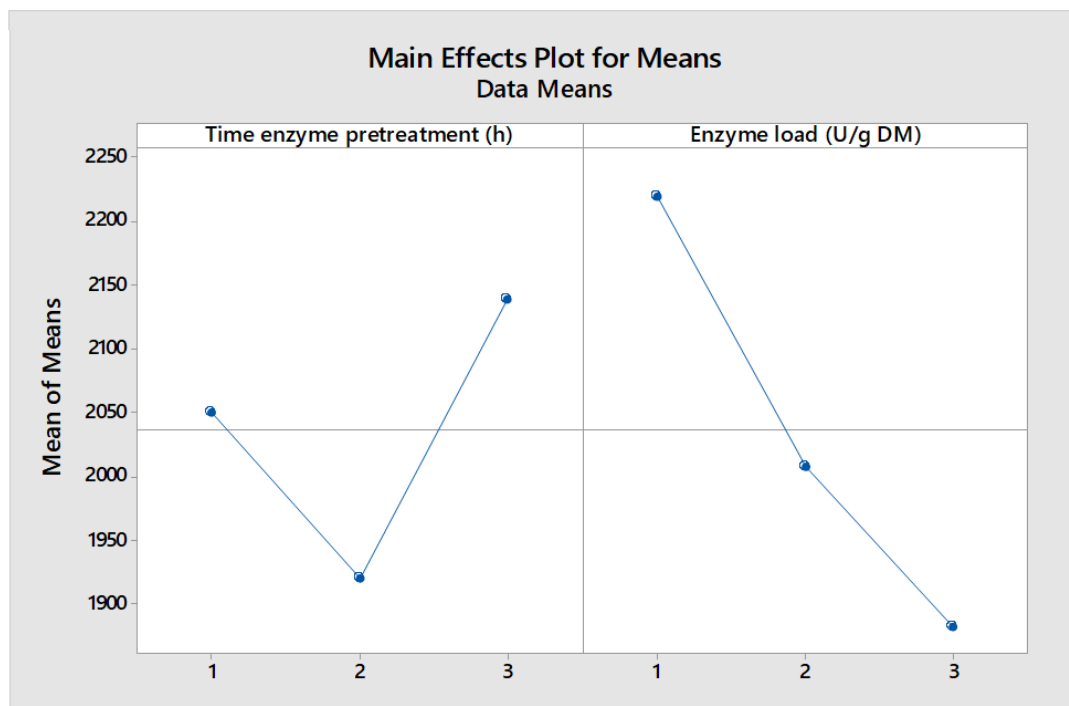
Στον Πίνακα 35 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	1917,62	65,65

1	2	1851,95	65,35
1	3	2116,97	66,51
2	1	2074,79	66,34
2	2	1880,98	65,47
2	3	1739,49	64,81
3	1	2069,61	66,31
3	2	2111,41	66,44
3	3	1783,78	65,02

Πίνακας 35: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με *Liquozyme*

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 32 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 35 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 32: διάγραμμα μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

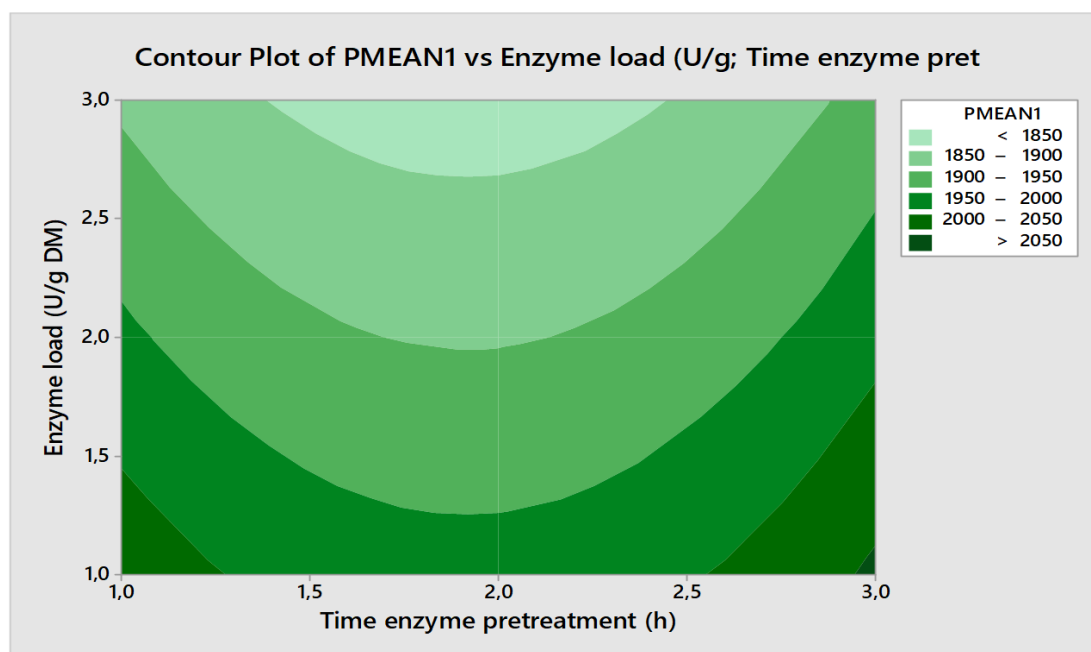
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	1962	2021 ^α
2	1898	1948
3	1988 ^α	1880
(max-min)	90	141
Ranking	2	1

Πίνακας 36: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 36 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM (επίπεδα 3,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2059,32 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

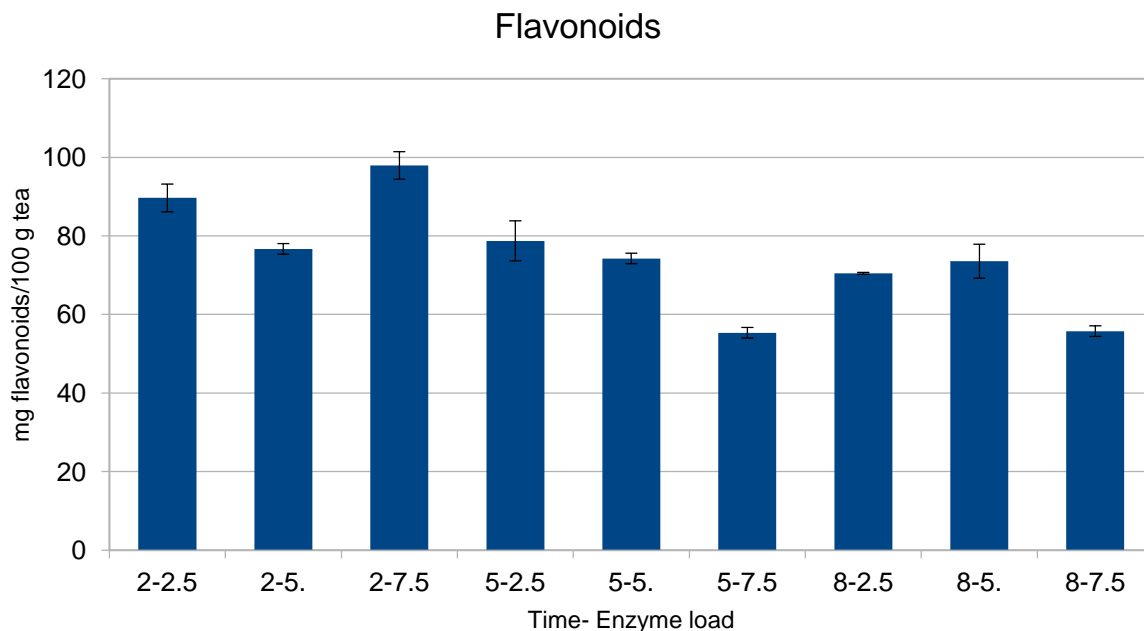
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 33).



Διάγραμμα 33: Ισοψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 34, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 36.



Διάγραμμα 34: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	73,35 ± 4,54
5	-	86,64 ± 1,90
8	-	71,14 ± 0,27

Πίνακας 37: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

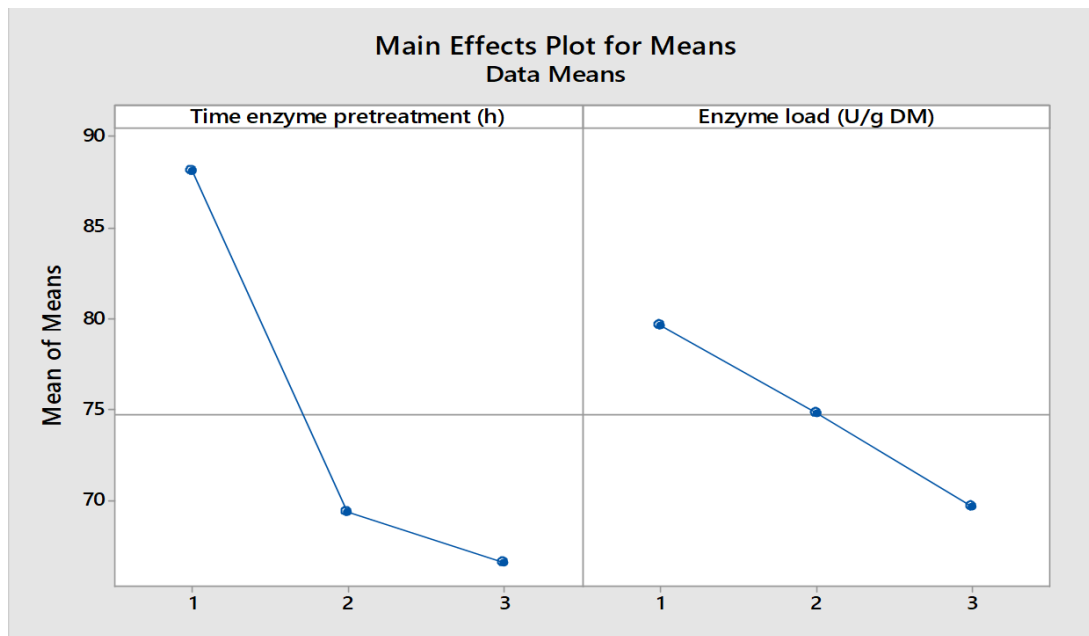
Στον Πίνακα 38 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	89,68	39,04
1	2	76,68	37,69
1	3	97,92	39,81

2	1	78,73	37,90
2	2	74,24	37,41
2	3	55,32	34,85
3	1	70,48	36,96
3	2	73,57	37,31
3	3	55,75	34,92

Πίνακας 38: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με *Liquozyme*

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 35 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα φλαβονοειδή και στον Πίνακα 37 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 35: διάγραμμα μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

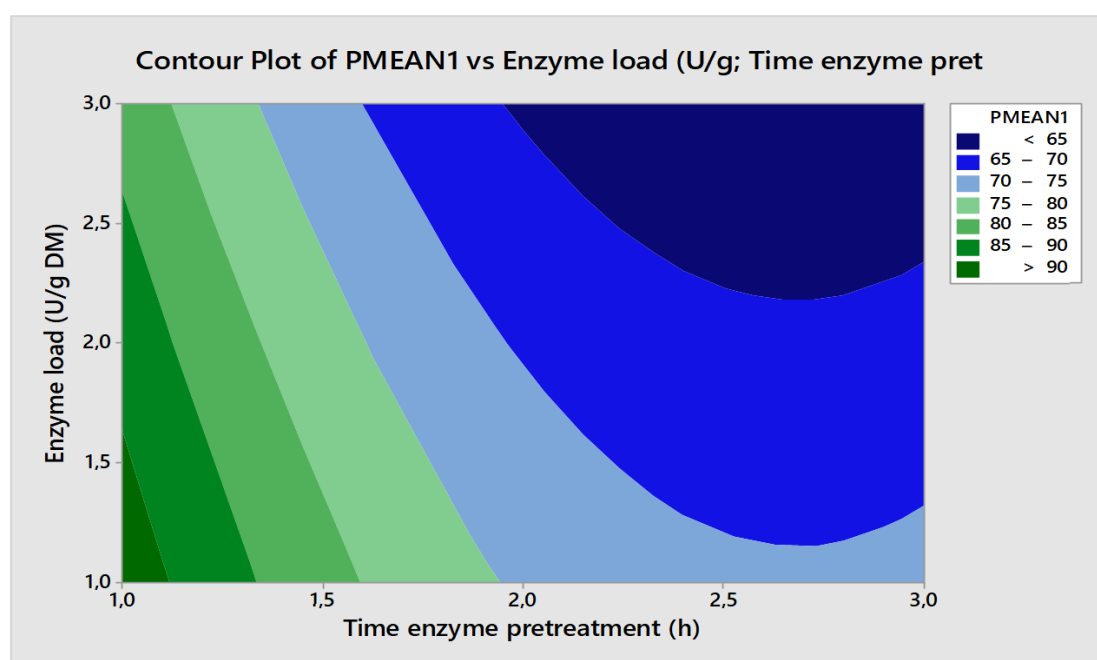
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	88,09 ^α	79,63 ^α
2	69,43	74,83
3	66,60	69,67
(max-min)	21,49	9,97
Ranking	1	2

Πίνακας 39: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 36 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 93,02 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 36).



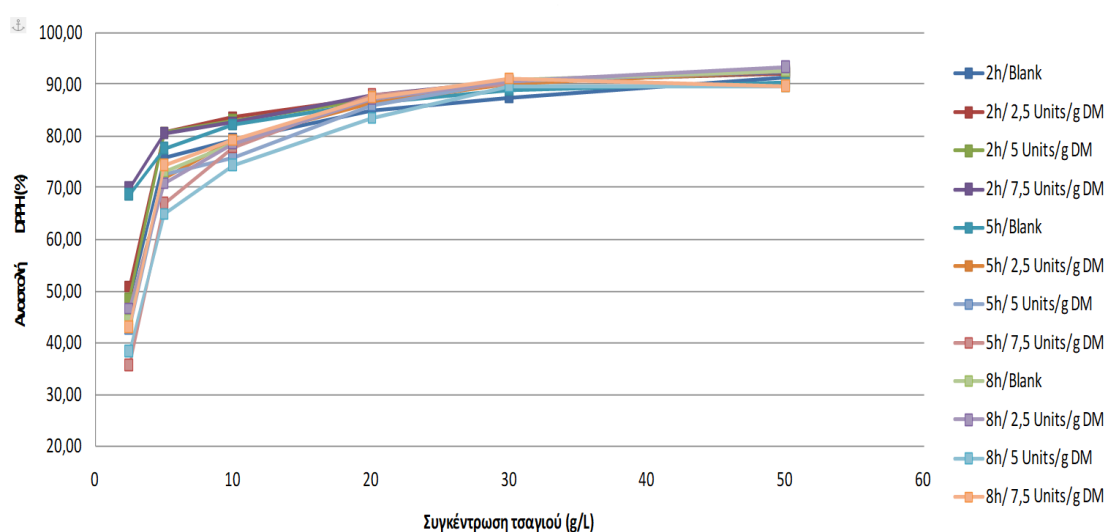
Διάγραμμα 36: Ισοϋψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Αντιοξειδωτική δράση

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 37: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα 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 δράση.

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC_{50} (g/L)
2	2,5	2,5
2	5	2,6
2	7,5	2,5

5	2,5	3,0
5	5	3,2
5	7,5	3,7
8	2,5	3,0
8	5	3,6
8	7,5	3,2
2	-	2,6
5	-	2,5
8	-	3,1

Πίνακας 40: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων

5.3 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Alcalase

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα Alcalase παρουσιάζονται στον Πίνακα 41 . Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 7,0 για 2, 5 και 8 h (control).

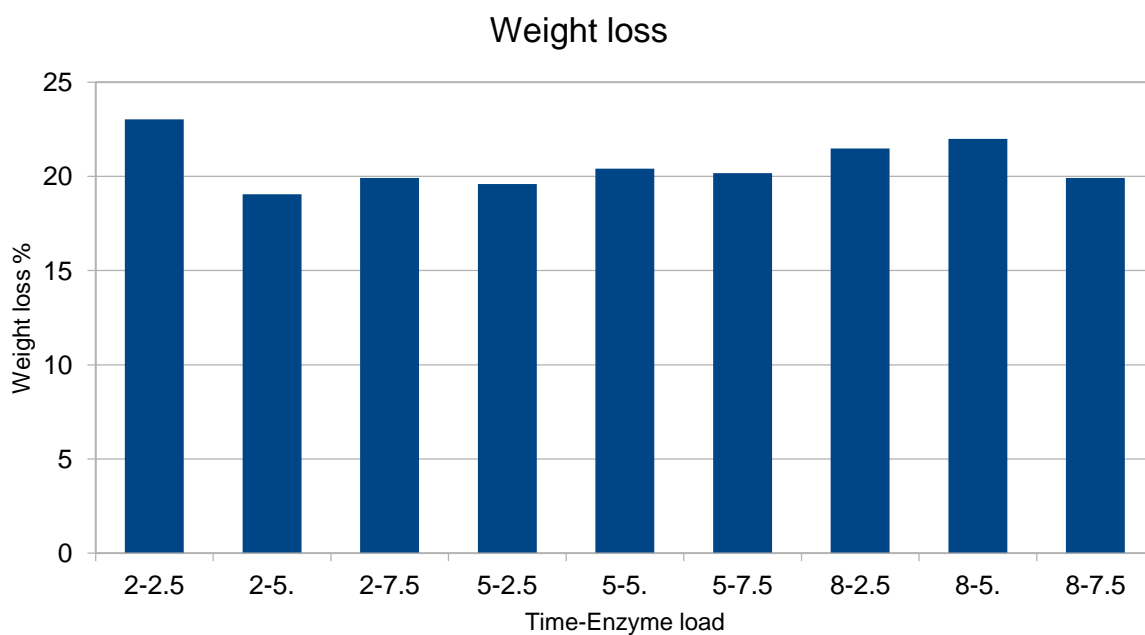
Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5
7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Πίνακας 41: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Alcalase

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 38, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 39.



Διάγραμμα 38: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	22,99
5	-	22,75
8	-	20,28

Πίνακας 42: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

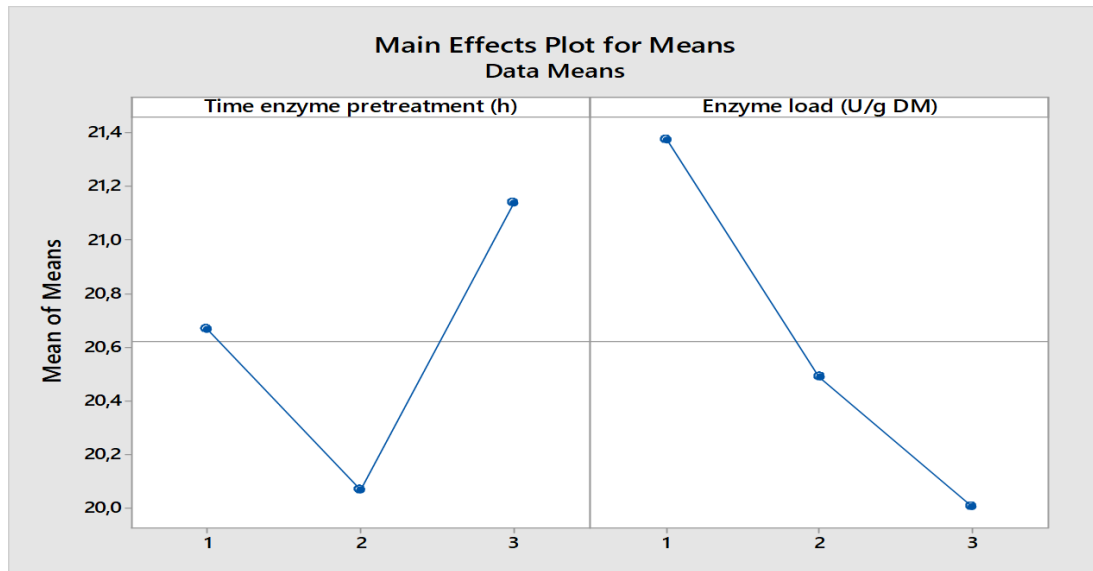
Στον Πίνακα 43 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	23,04	27,25
1	2	19,05	25,60
1	3	19,92	25,99
2	1	19,60	25,85
2	2	20,42	26,20
2	3	20,18	26,10

3	1	21,49	26,64
3	2	22,00	26,85
3	3	19,92	25,99

Πίνακας 43: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Alcalase

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) . Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 39 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών ,ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 44 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 39: Διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους

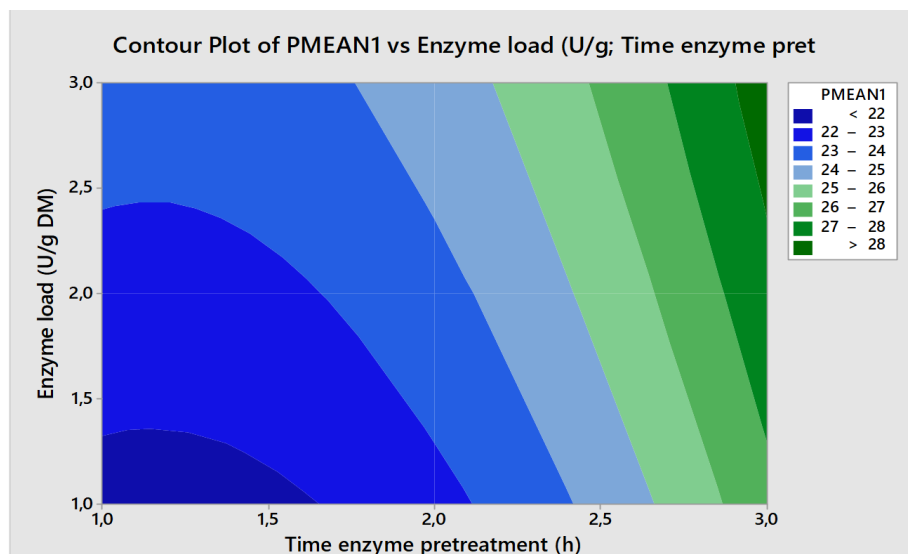
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	20,67	21,38 ^α
2	20,07	20,49
3	21,14 ^α	20,01
(max-min)	1,07	1,37
Ranking	2	1

Πίνακας 44: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους

^αΒέλτιστη τιμή

Σύμφωνα με τους Hasçalik & Çaydaş (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N το οποίο συμπίπτει με τη μεγαλύτερη μέση τιμή. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 44 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2,5 Units/g DM (επίπεδα 3,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απώλειας βάρους είναι 21,89%. 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 40).

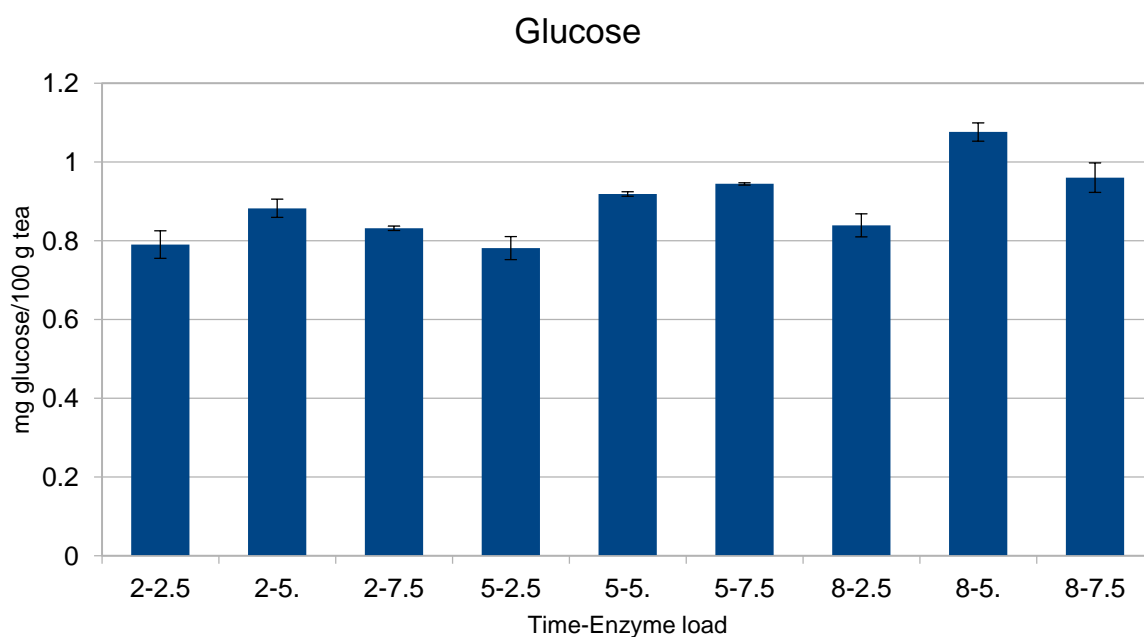


Διάγραμμα 40: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσεως των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί χαμηλά ενζυμικά φορτία αλλά υψηλούς χρόνους κατεργασίας.

Γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 41, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 45.



Διάγραμμα 41: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,88 ± 0,04
5	-	0,96 ± 0,02
8	-	0,88 ± 0,01

Πίνακας 45: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

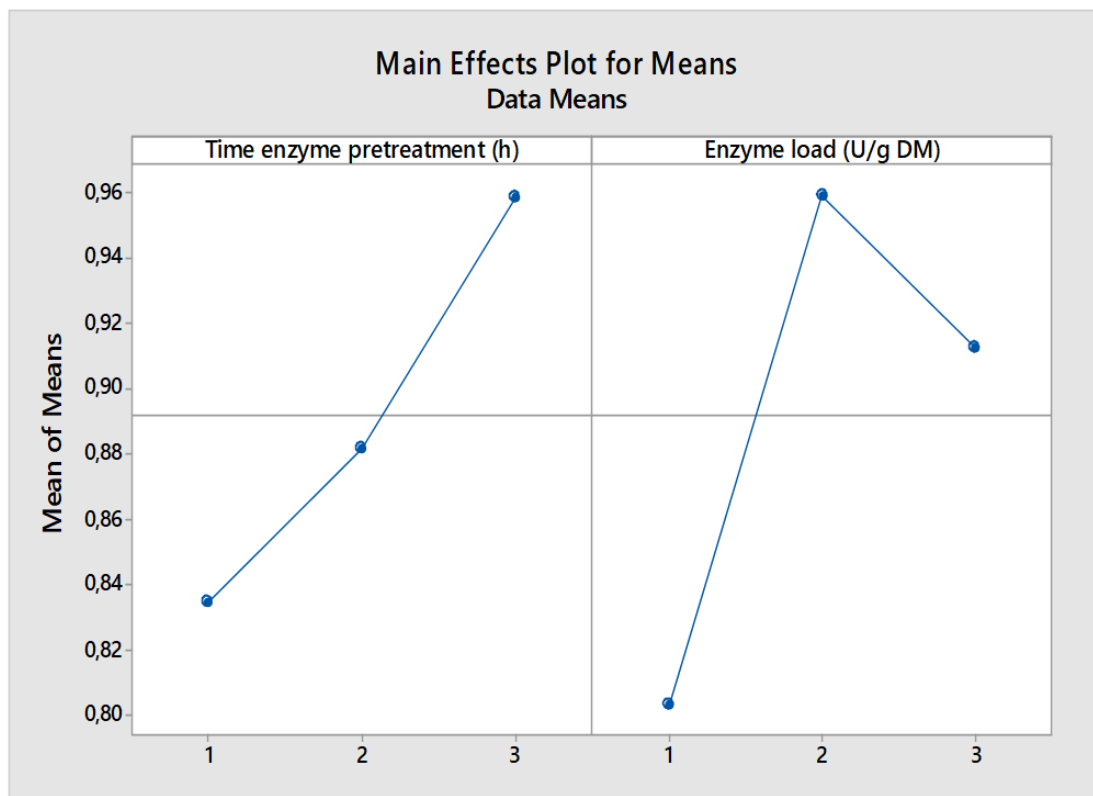
Στον Πίνακα 46 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	0,79	-2,06

1	2	0,88	-1,09
1	3	0,83	-1,60
2	1	0,78	-2,15
2	2	0,92	-0,73
2	3	0,94	-0,50
3	1	0,84	-1,53
3	2	1,08	-0,63
3	3	0,96	-0,36

Πίνακας 46: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Alcalase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 42 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 47 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 42: διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

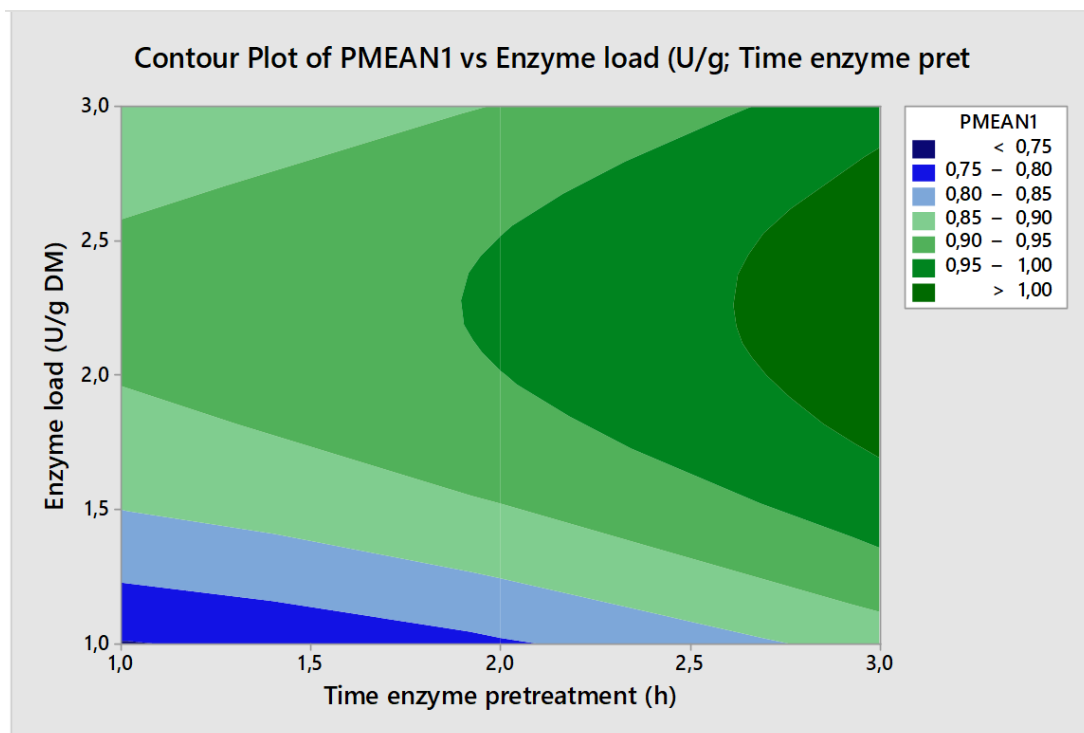
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	0,835	0,804
2	0,882	0,959 ^α
3	0,959 ^α	0,912
(max-min)	0,124	0,156
Ranking	2	1

Πίνακας 47: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

^αΒέλτιστη τιμή

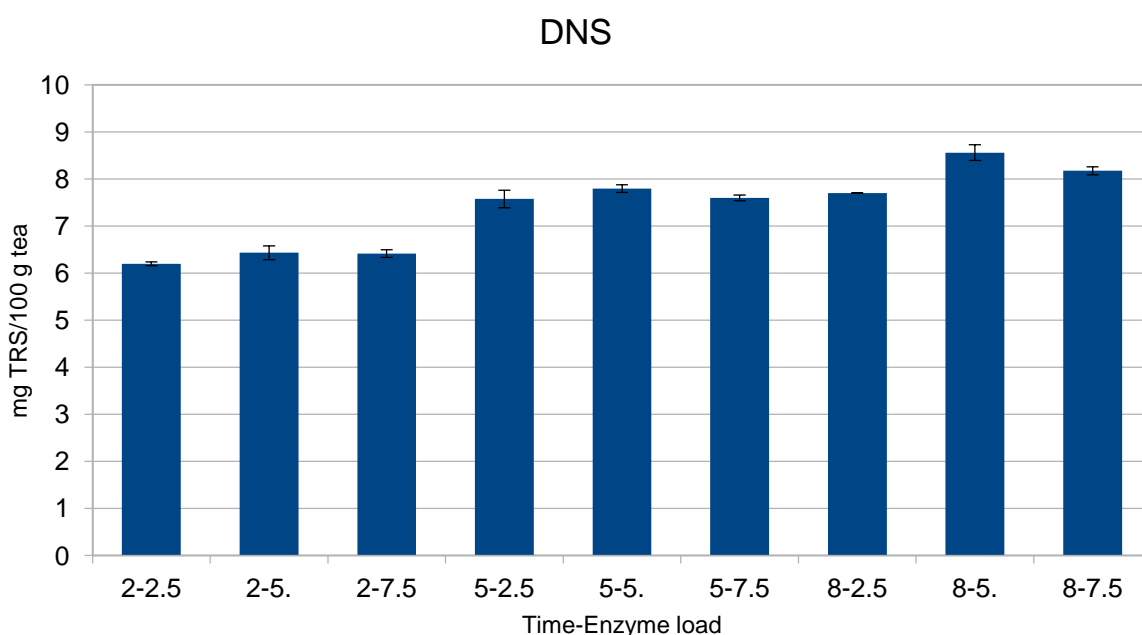
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 46 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 3,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 1.03 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 43).



Διάγραμμα 43 : Ισοψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 44, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 48.



Διάγραμμα 44: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	5,76 ± 0,12
5	-	6,68 ± 0,06
8	-	7,72 ± 0,12

Πίνακας 48: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου.

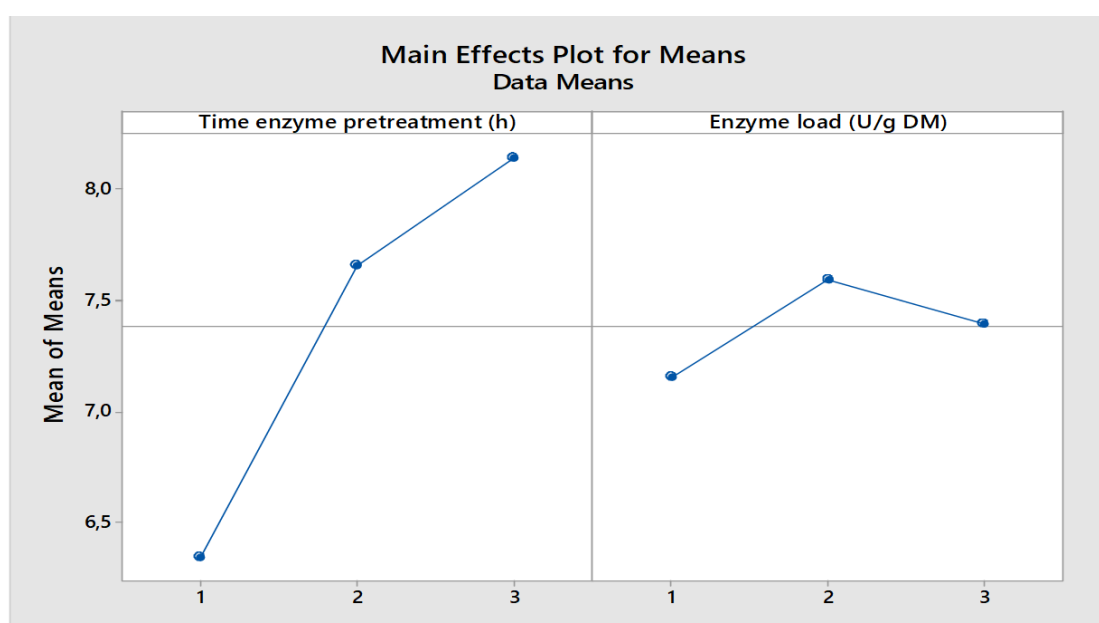
Στον Πίνακα 49 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	6,20	15,84
1	2	6,43	16,16
1	3	6,41	16,14
2	1	7,57	17,58
2	2	7,79	17,83

2	3	7,60	17,61
3	1	7,70	17,73
3	2	8,56	18,65
3	3	8,17	18,25

Πίνακας 49: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Alcalase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 45 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 50 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 45. διάγραμμα μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

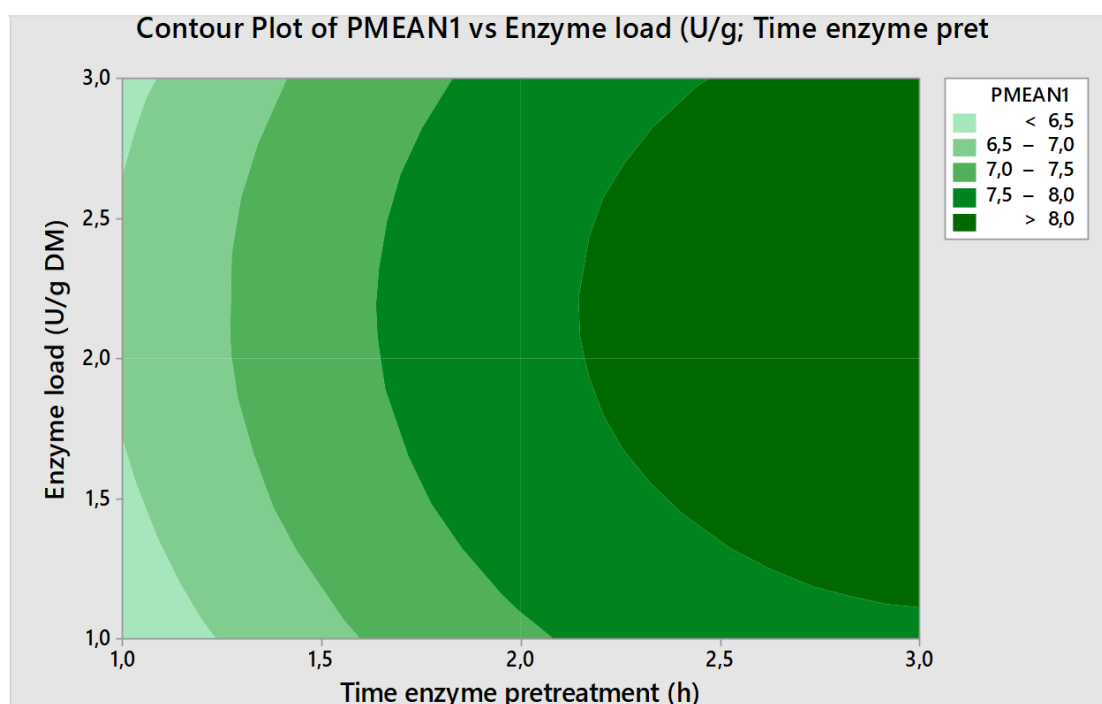
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	6,348	7,156
2	7,655	7,595 ^α
3	8,143 ^α	7,394
(max-min)	1,795	0,439
Ranking	1	2

Πίνακας 50: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

^aΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 50 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών αναγωγικών σακχάρων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 3,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 8,36 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

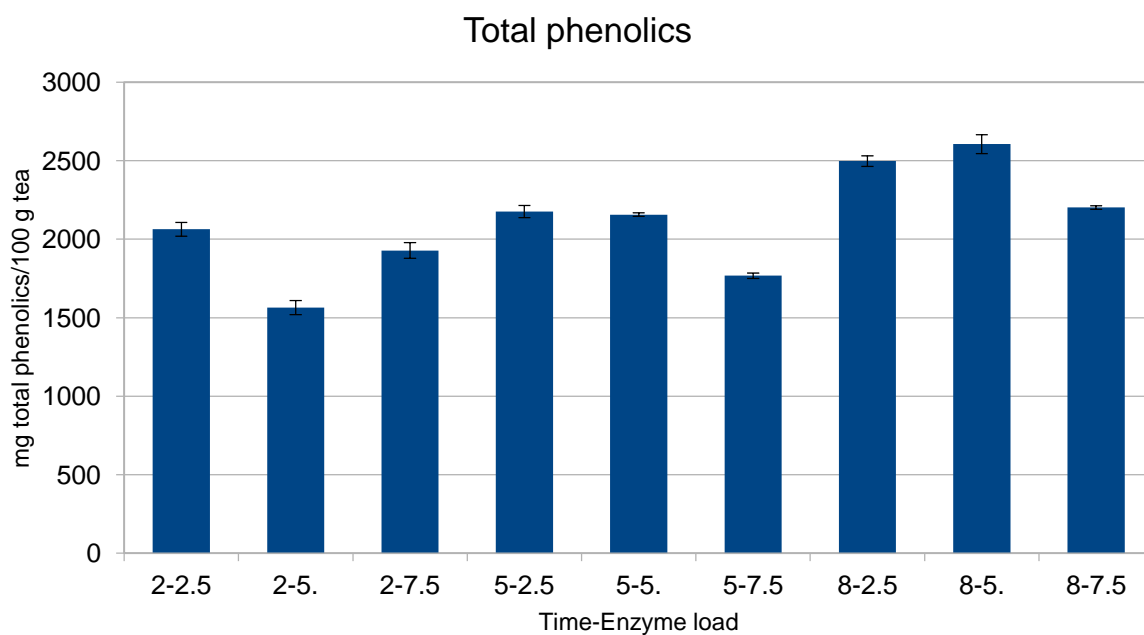
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 45).



Διάγραμμα 45: 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 47, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 47.



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

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	1387,15 ± 16,57
5	-	1695,76 ± 27,81
8	-	2089,97 ± 22,05

Πίνακας 51: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

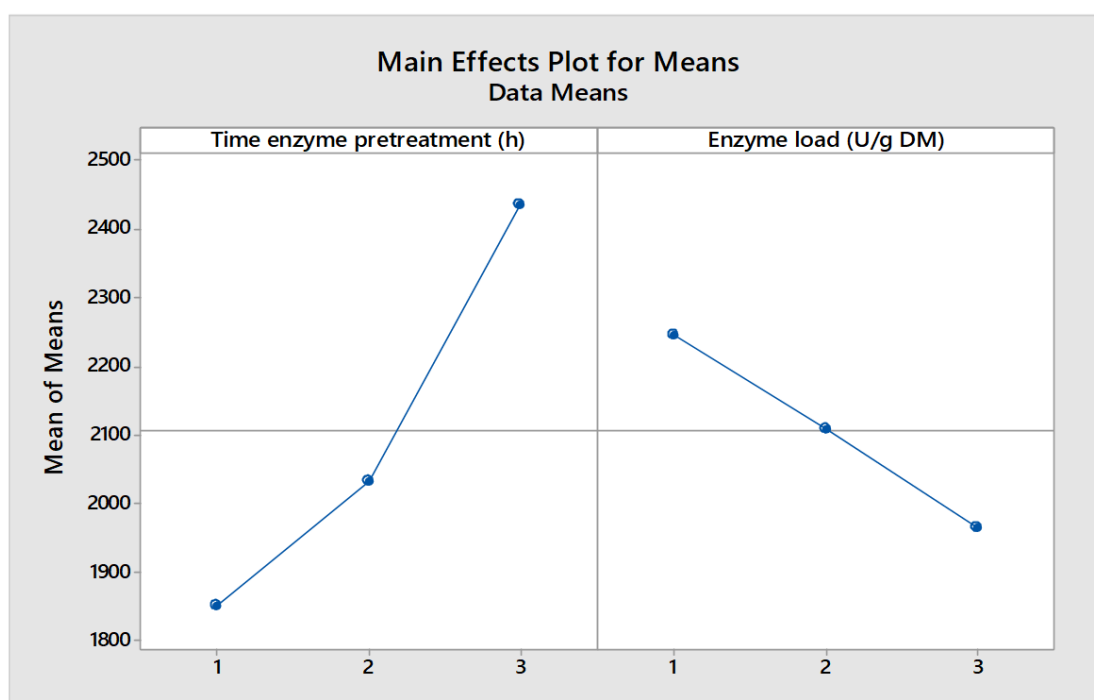
Στον Πίνακα 52 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	2063,80	66,29
1	2	1564,47	63,88
1	3	1927,90	65,70
2	1	2176,95	66,75
2	2	2156,61	66,68
2	3	1767,37	64,95

3	1	2497,85	67,95
3	2	2605,78	68,32
3	3	2201,99	66,86

Πίνακας 52: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Alcalase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 47 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 53 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 47: διάγραμμα μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

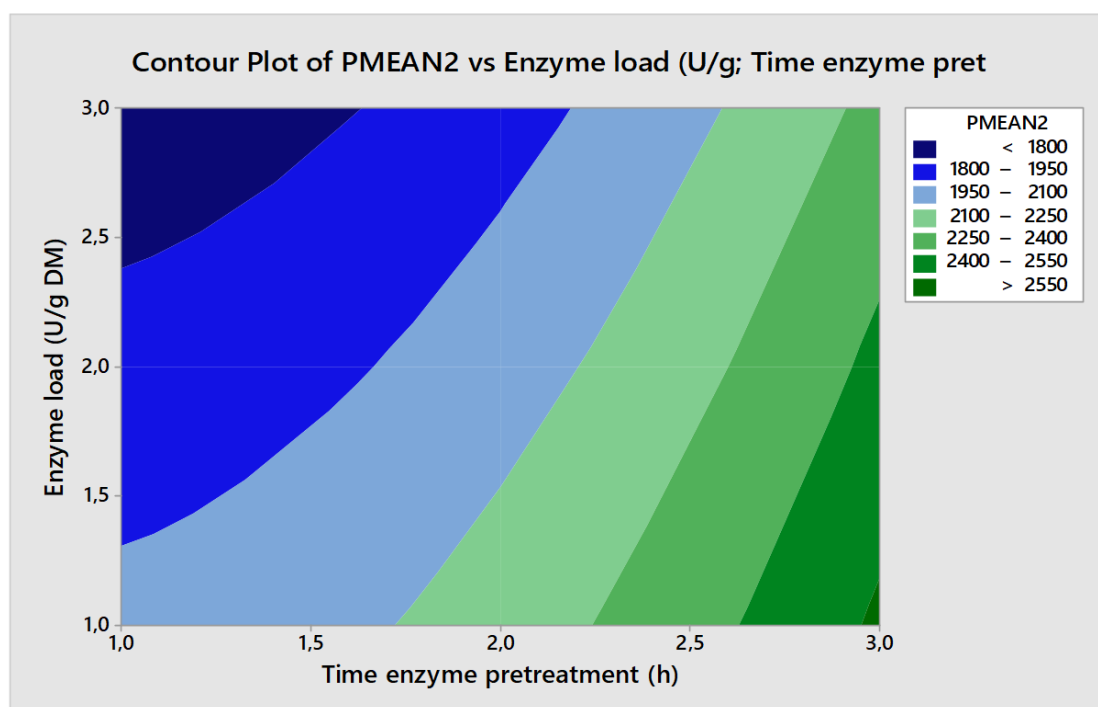
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	1852	2246 ^α
2	2034	2109
3	2435 ^α	1996
(max-min)	583	280
Ranking	1	2

Πίνακας 53: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 53 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 2.5 Units/g DM (επίπεδα 3,1) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2605,78 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

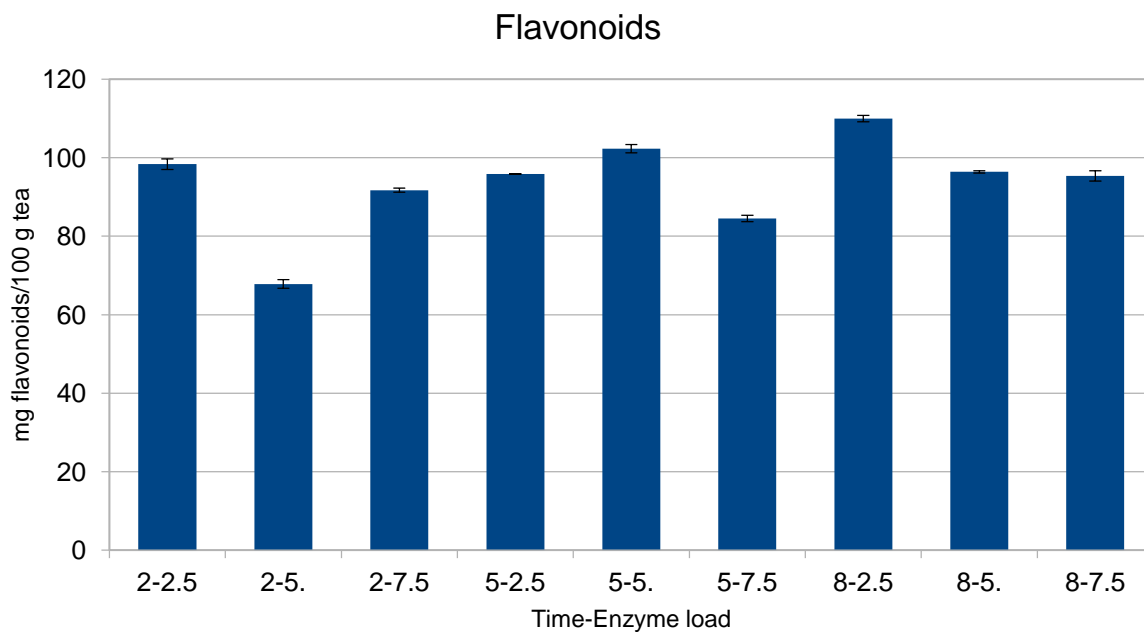
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 48).



Διάγραμμα 48: Ισοψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 49, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 50.



Διάγραμμα 49: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	63,78 ± 1,88
5	-	73,58 ± 1,08
8	-	89,59 ± 2,68

Πίνακας 54: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

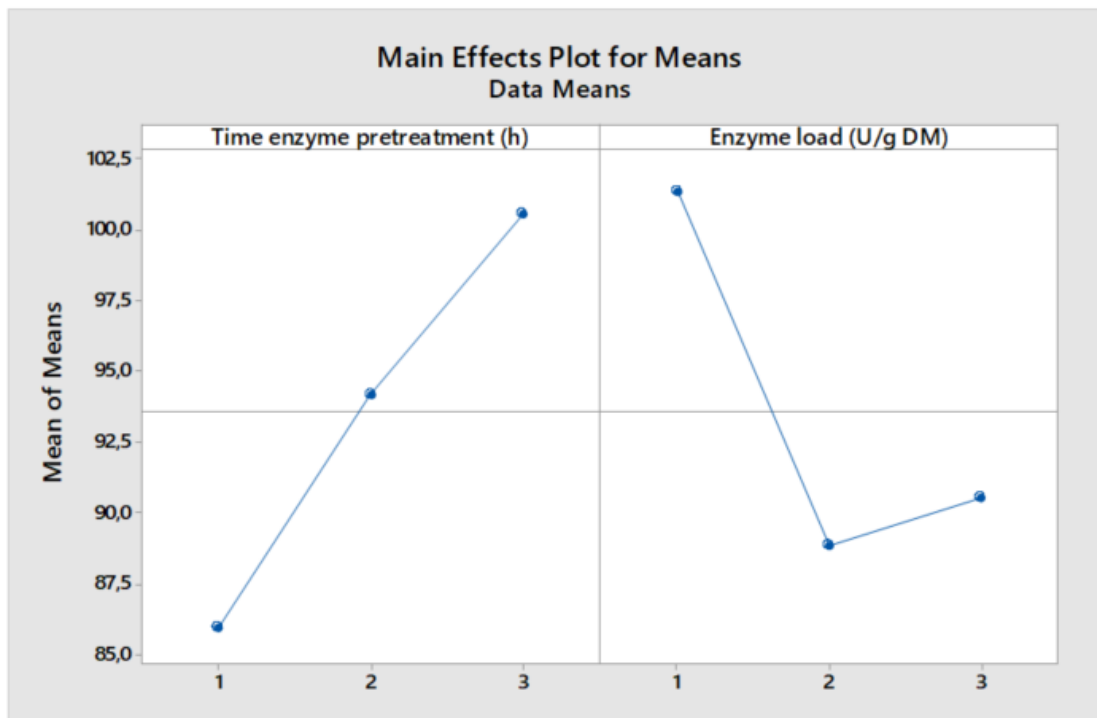
Στον Πίνακα 55 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	98,37	39,86
1	2	67,83	36,63
1	3	91,74	39,25
2	1	95,84	39,63
2	2	102,29	40,20
2	3	84,52	38,54

3	1	109,96	40,82
3	2	96,41	39,68
3	3	95,37	39,59

Πίνακας 55: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Alcalase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 50 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα φλαβονοειδή και στον Πίνακα 52 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 50: διάγραμμα μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

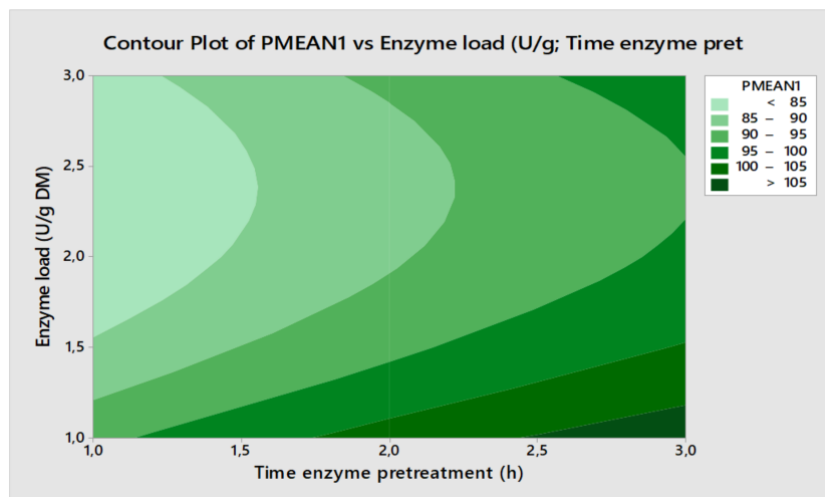
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	85,98	101,39 ^α
2	94,22	88,84
3	100,58 ^α	90,54
(max-min)	14,60	12,55
Ranking	1	2

Πίνακας 56: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 56 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των φλαβονοειδών επιτυγχάνεται μετά από 8 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 108,38 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 51).



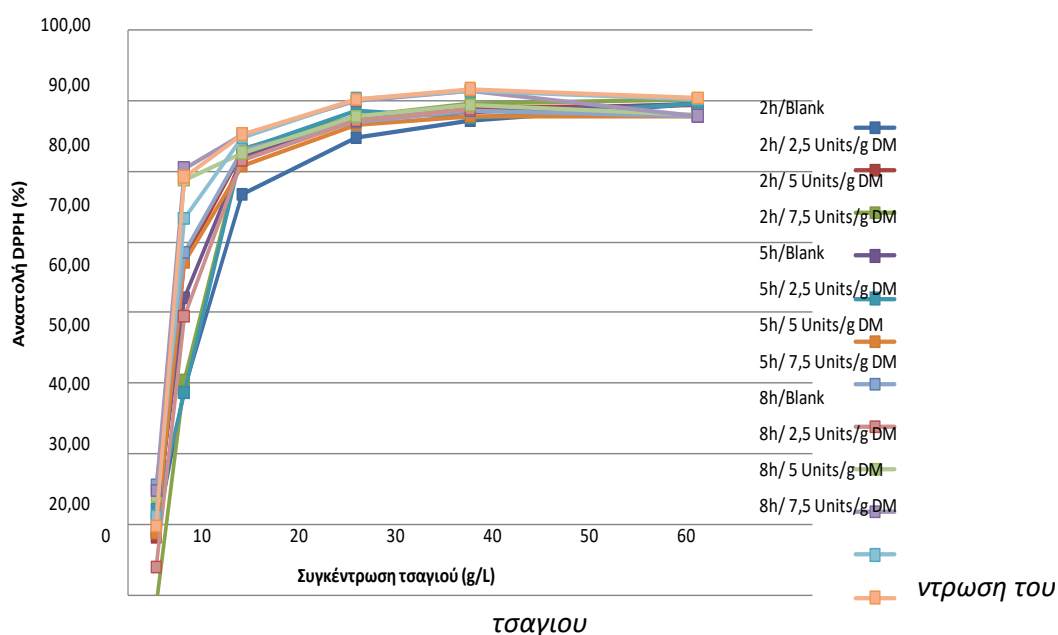
Διάγραμμα 51: Ισοψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Αντιοξειδωτική δράση

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 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 δράση.

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC_{50} (g/L)
2	2,5	4,0

2	5	5,0
2	7,5	4,1
5	2,5	4,0
5	5	3,7
5	7,5	4,4
8	2,5	3,3
8	5	3,7
8	7,5	3,6
2	-	5,1
5	-	5,2
8	-	3,4

Πίνακας 57: Τιμές IC50 των εκχυλισμάτων

5.4 EYE με χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Lipolase

Οι δοκιμές που έγιναν με το ενζυμικό σκεύασμα Lipolase παρουσιάζονται στον Πίνακα 54. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν υδατικές εκχυλίσεις σε pH 7,0 για 2, 5 και 8 h (control).

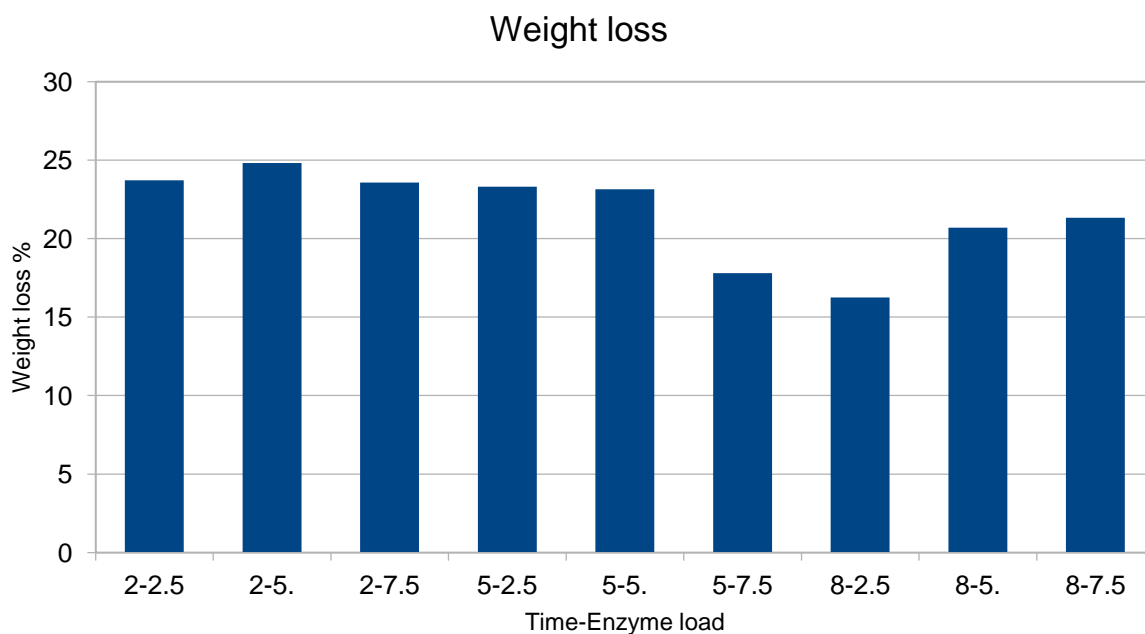
Αριθμός πειράματος	Factor A: χρόνος (h)	Factor B: ενζυμικό φορτίο (units/g D.M)
1	2	2,5
2	2	5
3	2	7,5
4	5	2,5
5	5	5
6	5	7,5
7	8	2,5
8	8	5
9	8	7,5

Πίνακας 58: Αριθμός και παράγοντες πειραμάτων της EYE με χρήση ενζυμικού παρασκευάσματος Lipolase

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 52, ενώ η απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 59.



Διάγραμμα 52: Απώλεια βάρους της πρώτης ύλης μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Απώλεια βάρους (%)
2	-	22,63
5	-	20,73
8	-	18,61

Πίνακας 59: Απώλεια βάρους των δειγμάτων απουσία ενζύμου

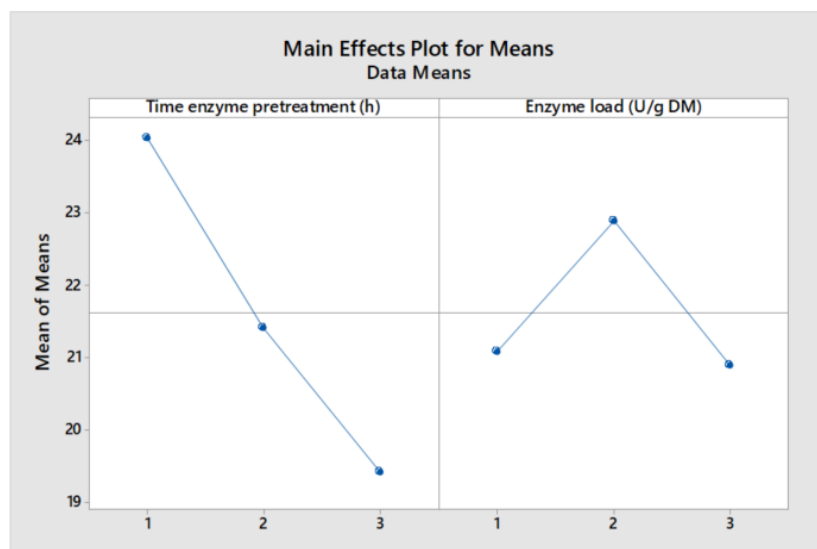
Στον Πίνακα 60 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απώλειας βάρους και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Απώλεια βάρους (%)	S/N
1	1	23,72	27,50

1	2	24,83	27,90
1	3	23,58	27,45
2	1	23,31	27,35
2	2	23,14	27,29
2	3	17,80	25,01
3	1	16,25	24,22
3	2	20,69	26,32
3	3	21,33	26,60

Πίνακας 60: Πειραματικά αποτελέσματα απώλειας βάρους και τιμές S/N της EYE με Lipolase

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) . Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκε η μεγιστοποίηση του χαρακτηριστικού. Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 53 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών ,ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απώλεια βάρους και στον Πίνακα 57 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 53: διάγραμμα μέσης τιμής για την απώλεια βάρους

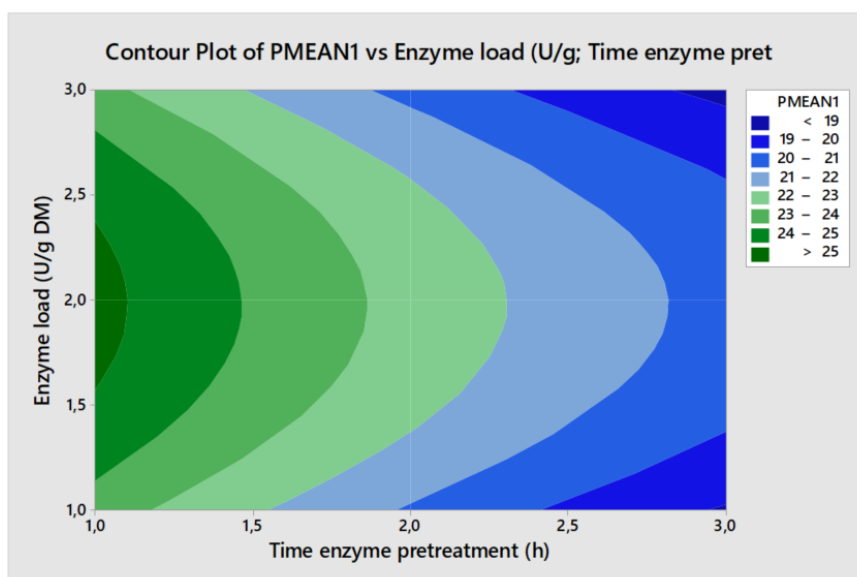
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	24,04 ^α	21,10
2	21,42	22,88 ^α
3	19,42	20,90
(max-min)	4,62	1,98
Ranking	1	2

Πίνακας 61: Πίνακας μέσων τιμών για την απώλεια βάρους

^αΒέλτιστη τιμή

Σύμφωνα με τους Hasçalik & Çaydaş (2008) το βέλτιστο επίπεδο των παραγόντων είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή S/N το οποίο συμπίπτει με τη μεγαλύτερη μέση τιμή. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 61 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απώλειας βάρους επιτυγχάνεται μετά από 2 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 1,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απώλειας βάρους είναι 25,30%. Επιπλέον, ο χρόνος 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 54).

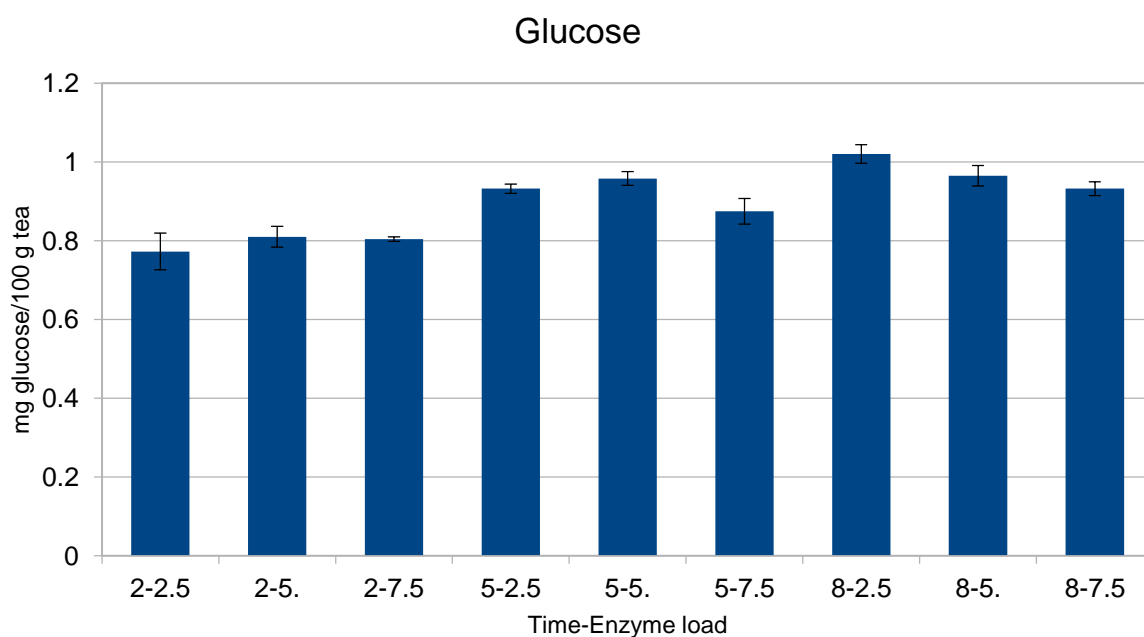


Διάγραμμα 54: Ισοϋψείς καμπύλες απώλειας βάρους συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ένζυμα παρατηρούμαι ότι μεγάλη απώλεια βάρους απαιτεί χαμηλά ενζυμικά φορτία και χαμηλούς χρόνους κατεργασίας.

Γλυκόζη και αναγωγικά σάκχαρα

Η απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 55, ενώ η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 58.



Διάγραμμα 55: Απελευθερούμενη γλυκόζη μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Γλυκόζη (g/100g τσαγιού)
2	-	0,73 ± 0,04
5	-	0,85 ± 0,03
8	-	0,83 ± 0,03

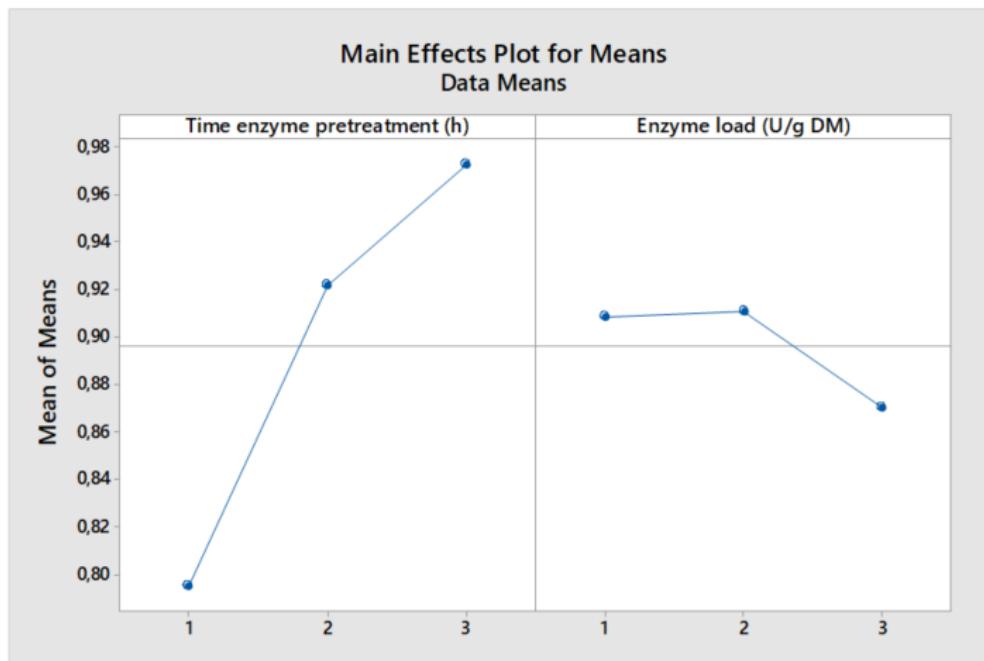
Πίνακας 62: Η απελευθερούμενη γλυκόζη απουσία ενζύμου

Στον Πίνακα 63 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της απελευθερούμενης γλυκόζης και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Γλυκόζη (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	0,77	-2,26
1	2	0,81	-1,84
1	3	0,80	-1,89
2	1	0,93	-0,61
2	2	0,96	-0,37
2	3	0,87	-1,17
3	1	1,02	0,17
3	2	0,96	-0,32
3	3	0,93	-0,61

Πίνακας 63: Πειραματικά αποτελέσματα απελευθερούμενης γλυκόζης και τιμές S/N της EYE με Lipolase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 56 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση την απελευθερούμενη γλυκόζη και στον Πίνακα 60 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 56: διάγραμμα μέσω τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

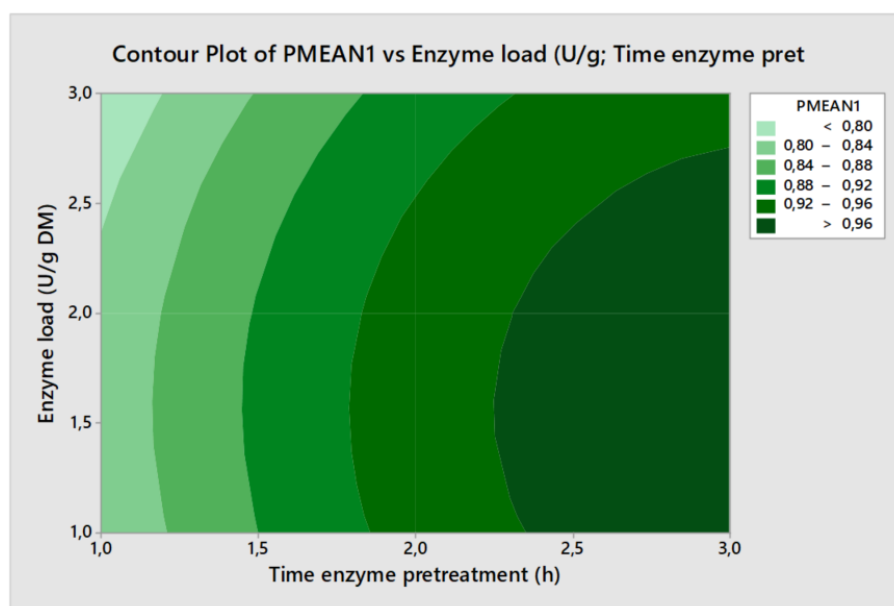
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	0,796	0,901
2	0,922	0,911 ^α
3	0,972 ^α	0,870
(max-min)	0,177	0,041
Ranking	1	2

Πίνακας 64: Πίνακας μέσων τιμών για την απελευθερούμενη γλυκόζη

^αΒέλτιστη τιμή

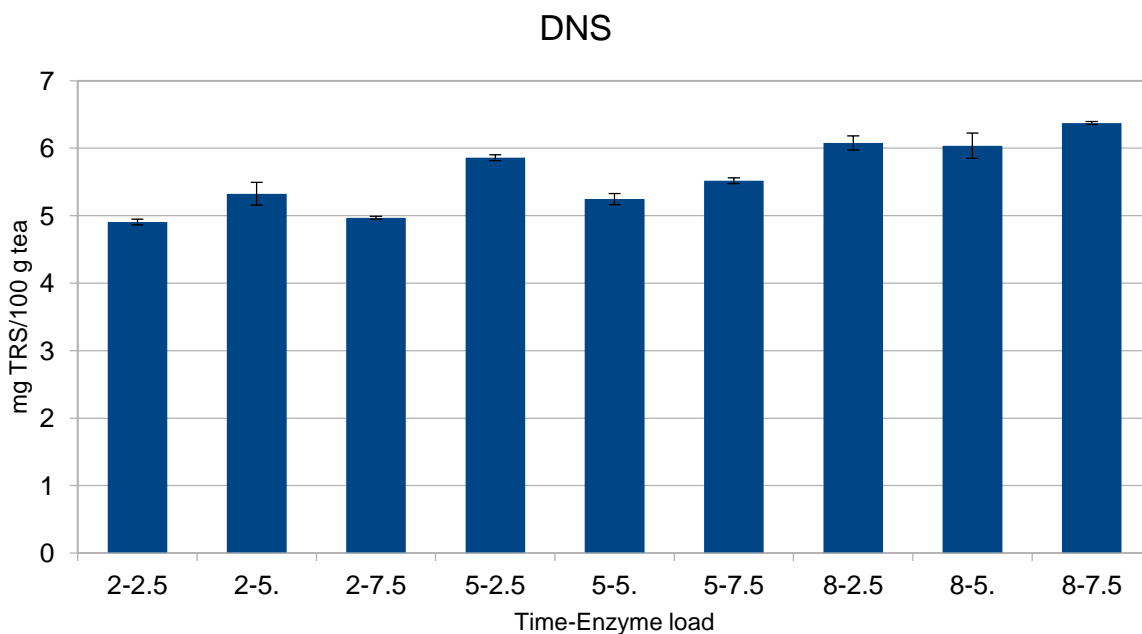
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 64 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση της απελευθερούμενης γλυκόζης επιτυγχάνεται μετά από 8 h ενζυμικής κατεργασίας με ενζυμικό φορτίο 5 Units/g DM (επίπεδα 3,2) και η προβλεπόμενη από την ανάλυση Taguchi μέγιστη τιμή απελευθερούμενης γλυκόζης είναι 0,987 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στη γλυκόζη.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στην απελευθερούμενη γλυκόζη παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 57).



Διάγραμμα 57: Ισοϋψείς καμπύλες απελευθερούμενης γλυκόζης συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 58, ενώ τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 61.



Διάγραμμα 58: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Αναγωγικά σάκχαρα (g/100g τσαγιού)
2	-	4,13 ± 0,12
5	-	4,15 ± 0,04
8	-	6,01 ± 0,02

Πίνακας 65: Συνολικά αναγωγικά σάκχαρα απουσία ενζύμου

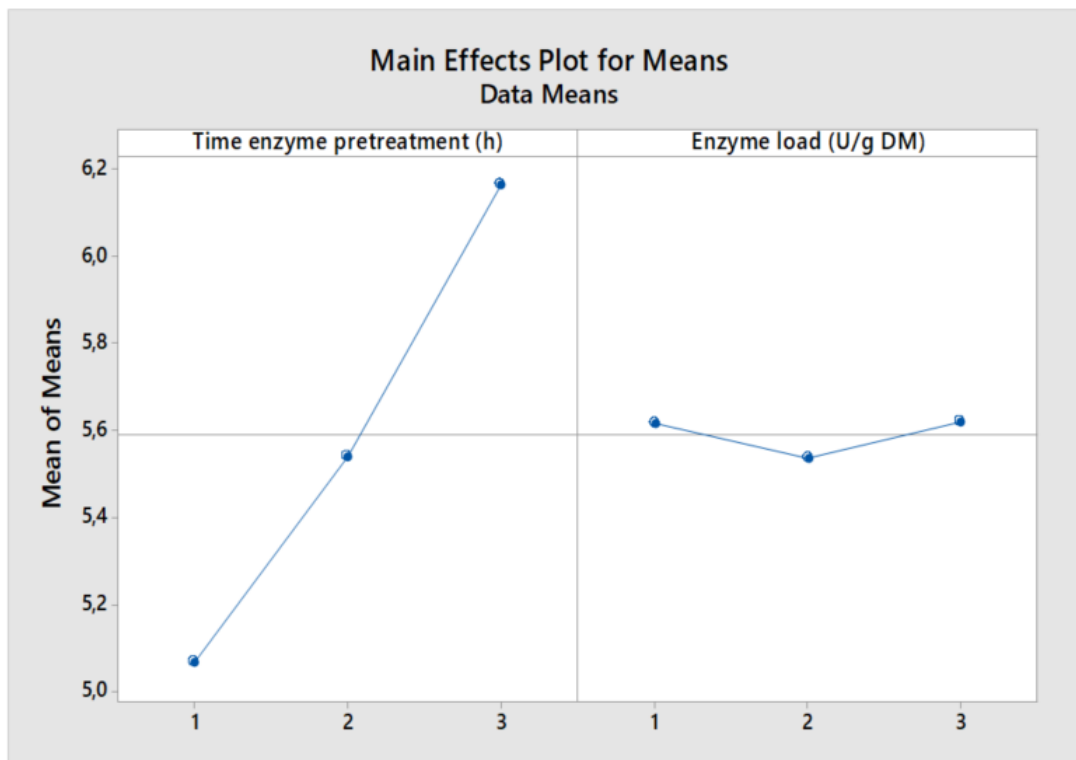
Στον Πίνακα 66 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των συνολικών αναγωγικών σακχάρων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Ολικά αναγωγικά σάκχαρα (g/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	4,91	13,82

1	2	5,33	14,52
1	3	4,97	13,93
2	1	5,86	15,36
2	2	5,25	14,39
2	3	5,52	14,84
3	1	6,08	15,68
3	2	6,04	15,61
3	3	6,37	16,09

Πίνακας 66: Πειραματικά αποτελέσματα συνολικών αναγωγικών σακχάρων και τιμές S/N της EYE με Lipolase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 59 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα και στον Πίνακα 63 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 59: διάγραμμα μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

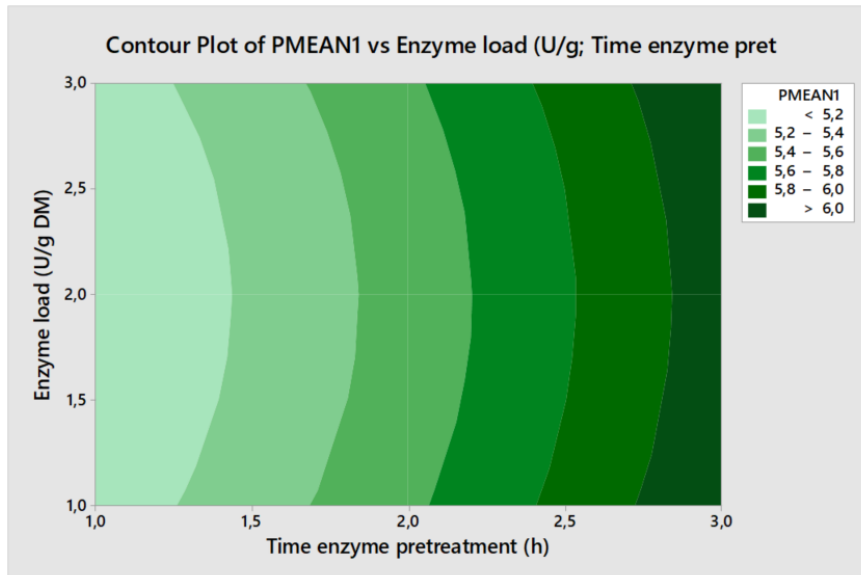
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	5,068	5,615
2	5,541	5,536
3	6,164 ^α	5,621 ^α
(max-min)	1,795	0,439
Ranking	1	2

Πίνακας 67: Πίνακας μέσων τιμών για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 67 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 6,19 g/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα.

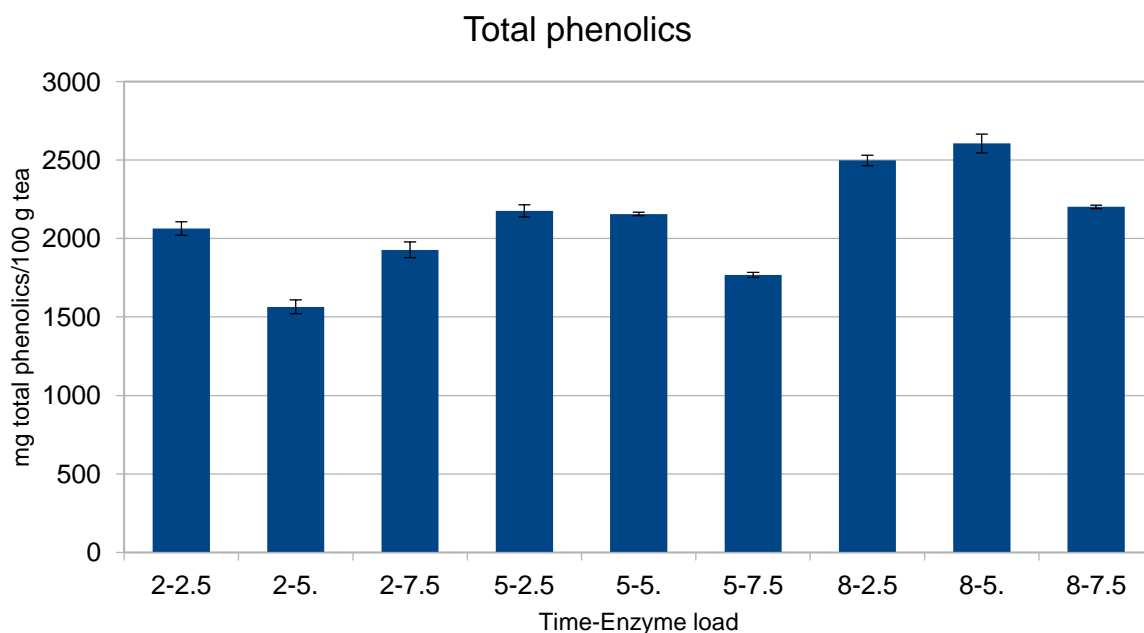
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα ολικά αναγωγικά σάκχαρα παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 60).



Διάγραμμα 60: Ισοψείς 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 61, ενώ οι ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 68.



Διάγραμμα 61: Ολικές φαινολικές ενώσεις μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100g τσαγιού)
2	-	791,11 ± 16,52
5	-	1529,28 ± 71,88
8	-	1694,62 ± 77,64

Πίνακας 68: Ολικές φαινολικές ενώσεις απουσία ενζύμου

Στον Πίνακα 69 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

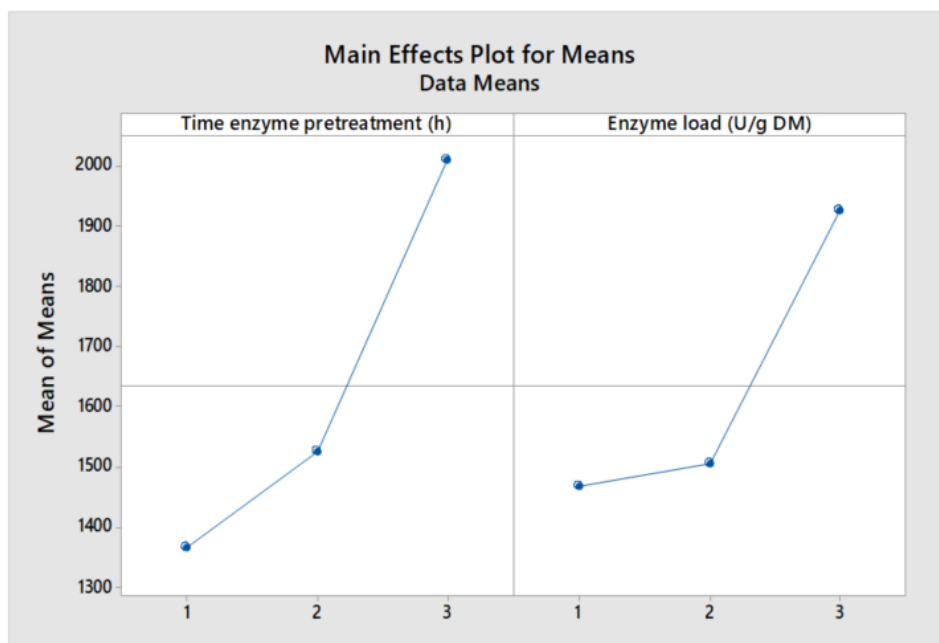
Παράγοντες ελέγχου

Πειραματικές τιμές

A	B	Ολικές φαινολικές ενώσεις (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	1121,59	60,98
1	2	1407,24	62,96
1	3	1568,46	63,91
2	1	1630,93	64,25
2	2	1233,37	61,82
2	3	1710,98	64,66
3	1	1654,78	64,36
3	2	1879,83	65,47
3	3	2498,89	67,94

Πίνακας 69: Πειραματικά αποτελέσματα ολικών φαινολικών ενώσεων και τιμές S/N της EYE με Lipolase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 62 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση οι ολικές φαινολικές ενώσεις και στον Πίνακα 66 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 62: διάγραμμα μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

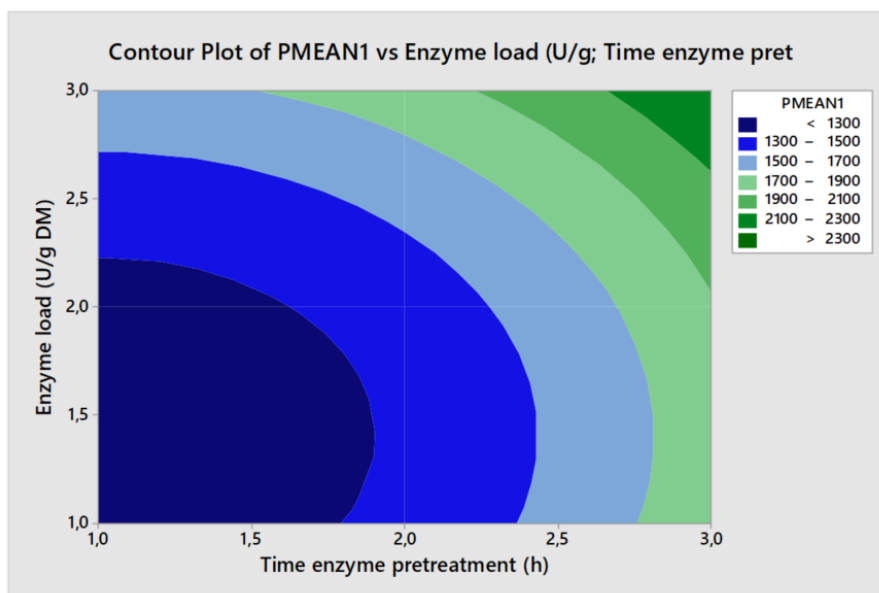
Επίπεδο	Παράγοντας Α : Χρόνος (h)	Παράγοντας Β: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	1366	1469
2	1525	1507
3	2011 ^α	1926 ^α
(max-min)	645	457
Ranking	1	2

Πίνακας 70: Πίνακας μέσων τιμών για τις ολικές φαινολικές ενώσεις

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 70 ο βέλτιστος συνδυασμός των δύο παραγόντων για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολικών ενώσεων 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 ολικών φαινολικών ενώσεων είναι 2303,27 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, ο χρόνος είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στις ολικές φαινολικές ενώσεις.

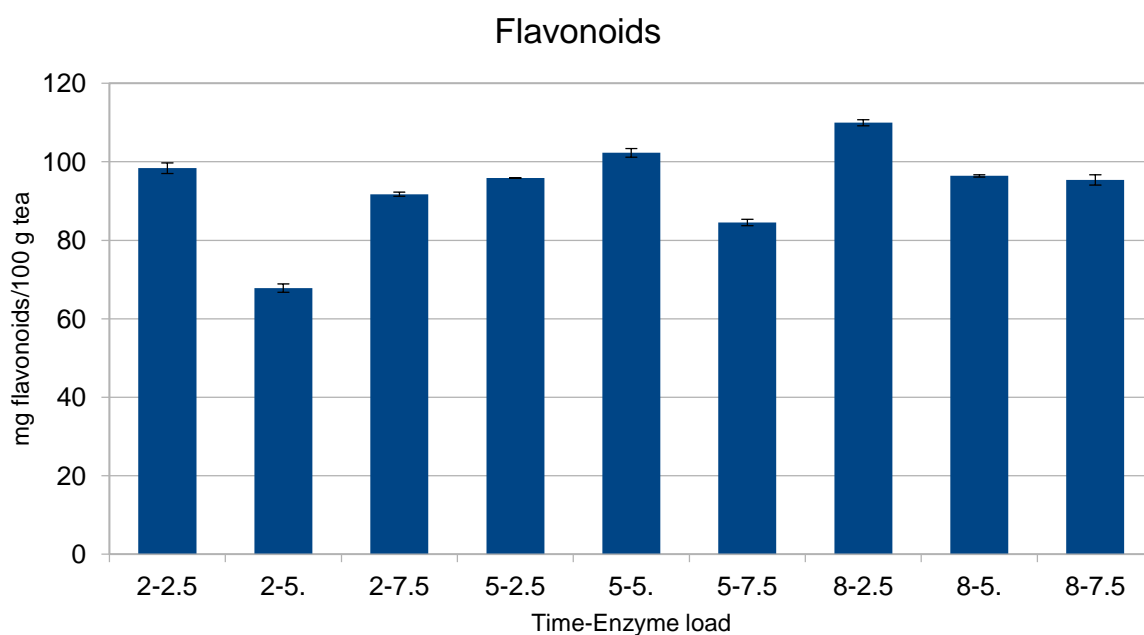
Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στις ολικές φαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται με τη μορφή ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 63).



Διάγραμμα 63: Ισοϋψείς καμπύλες ολικών φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 64, ενώ τα φλαβονοειδή απουσία ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 67.



Διάγραμμα 64: Τα φλαβονοειδή μετά την EYE και τη συμβατική εκχύλιση

Χρόνος ενζυμικής προκατεργασίας (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	Φλαβονοειδή (mg/100g τσαγιού)
2	-	66,99 ± 2,41
5	-	68,02 ± 1,34
8	-	88,41 ± 0,27

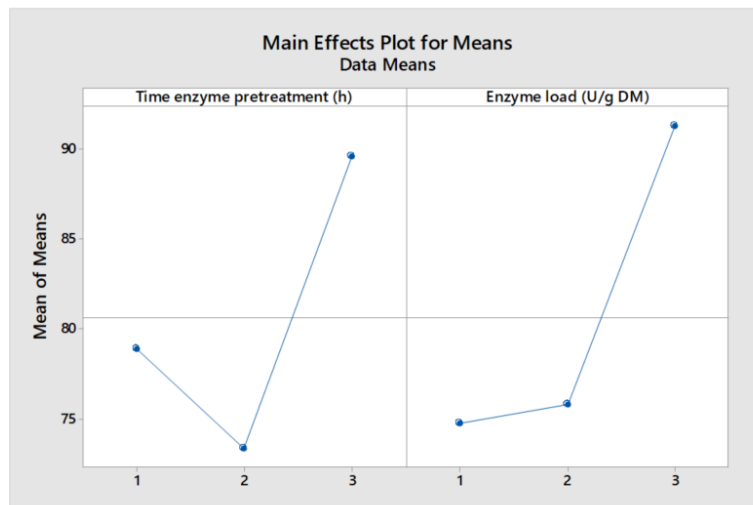
Πίνακας 71: Φλαβονοειδή απουσία ενζύμου

Στον Πίνακα 72 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των φλαβονοειδών και οι αντίστοιχες τιμές S/N.

Παράγοντες ελέγχου		Πειραματικές τιμές	
A	B	Φλαβονοειδή (mg/100 g τσαγιού)	S/N
1	1	73,32	37,30
1	2	80,95	38,16
1	3	82,39	38,32
2	1	68,59	36,72
2	2	56,30	35,01
2	3	95,36	39,58
3	1	82,48	38,33
3	2	90,18	39,09
3	3	96,12	39,65

Πίνακας 72: Πειραματικά αποτελέσματα φλαβονοειδών και τιμές S/N της EYE με Lipolase

Η βέλτιστη κατάσταση ανιχνεύεται μελετώντας την κύρια επίδραση (Main effect) του κάθε παράγοντα. Στο Διάγραμμα 65 παρουσιάζονται τα γραφήματα των μέσων τιμών, ενώ τα αντίστοιχα των τιμών S/N παρατίθενται στο Παράρτημα, για τους δύο παράγοντες ελέγχου (χρόνος και ενζυμικό φορτίο) στα τρία επίπεδα μεταβολής τους χρησιμοποιώντας ως απόκριση τα φλαβονοειδή και στον Πίνακα 69 οι αντίστοιχες αριθμητικές τιμές.



Διάγραμμα 65: διάγραμμα μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

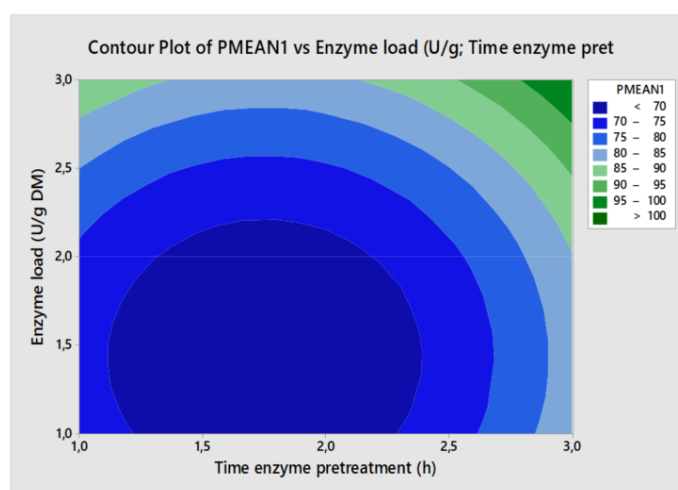
Επίπεδο	Παράγοντας A : Χρόνος (h)	Παράγοντας B: ενζυμικό φορτίο (U/g DM)
1	78,89	74,80
2	73,42	75,81
3	89,60 ^α	91,29 ^α
(max-min)	16,18	16,50
Ranking	2	1

Πίνακας 73: Πίνακας μέσων τιμών για τα φλαβονοειδή

^αΒέλτιστη τιμή

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 73 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 100,25 mg/100 g τσαγιού. Επιπλέον, το ενζυμικό φορτίο είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επίδραση στα φλαβονοειδή.

Η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων στα φλαβονοειδή παρουσιάζεται με τη μορφή ισοψών καμπυλών (Διάγραμμα 66).



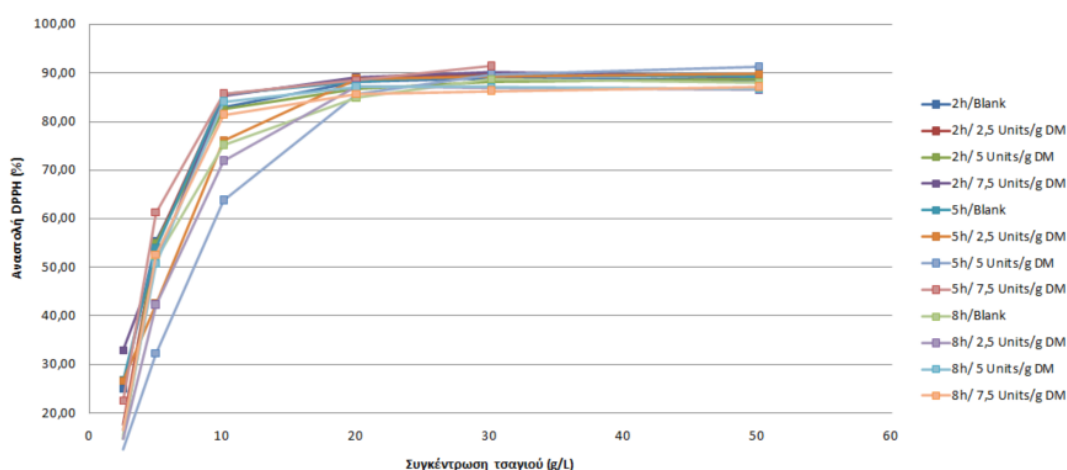
Διάγραμμα 66: Ισοψείς καμπύλες φλαβονοειδών συναρτήσει των παραγόντων του σχεδιασμού Taguchi

Αντιοξειδωτική δράση

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 67: Ποσοστιαία αναστολή του DPPH σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του τσαγιού

Στον παρακάτω πίνακα 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 δράση.

Χρόνος (h)	Ενζυμικό φορτίο (U/g DM)	IC ₅₀ (g/L)
2	2,5	4,5
2	5	4,6
2	7,5	4,8
5	2,5	6,2
5	5	7,8
5	7,5	4,3
8	2,5	6,4
8	5	4,9
8	7,5	4,8
2	-	4,5
5	-	4,6
8	-	4,7

Πίνακας 74: Τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι πειραματικές μέγιστες αποδόσεις των ενζύμων σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 75).

Ένζυμο	Total Phenolics (mg TP/100mg tea)	Flavonoids (mg flavonoids/100 mg tea)	#
Celluclast	2577,968	82,84541	Παρούσα διπλωματική
Liquozyme	2069,609	89,6849	Παρούσα διπλωματική
Lipolase	2498,892	96,12448	Παρούσα διπλωματική
Alcalase	2605,779	109,9593	Παρούσα διπλωματική
Cellic CTec2	2383,92	101,26	Διπλωματική Έλλη Δερτιλή
Viscozyme L	2621,35	83,88	Διπλωματική Έλλη Δερτιλή
Cellic/HTec2	2800,97	90,97	Διπλωματική Έλλη Δερτιλή

Πίνακας 75: Πειραματικές μέγιστες αποδόσεις ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών

Συμπεραίνουμε πως ο συνδυασμός EYE με τη συμβατική εκχύλιση είναι πιο αποδοτικός από τη χρήση μόνο της απλής συμβατικής μεθόδου.

Συγκεκριμένα όσον αφορά τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας για το ένζυμο *Celluclast* παρατηρείται μέγιστη

απόδοση σε ολικά φαινολικά μετά από κατεργασία 8h με ενζυμική σύγκέντρωση 2.5 Units/g DM και για φλαβονοειδή μετά από κατεργασία 2h με ενζυμική συγκέντρωση 7.5 Units/ g DM. Για το ένζυμο *Liquozyme* παρατηρείται επίσης μέγστη απόδοση σε ολικά φαινολικά μετά απο κατεργασία 8h με ενζυμική συγκέντρωση 2.5 Units/g DM και για φλαβονοειδή μετά από κατεργασία 2h με ενζυμική συγκέντρωση 2.5 Units/g DM. Για το ένζυμο *Lipolase* τόσο για τα ολικά φαινολικά όσο και για τα φλαβονοειδή παρατηρείται μέγιστη απόδοση μετά από κατεργασία 8h και ενζυμική συγκέντρωση 7.5 Units/g DM. Για το ένζυμο *Alcalase* τόσο για τα ολικά φαινολικά όσο και για τα φλαβονοειδή παρατηρείται μέγιστη απόδοση μετά από κατεργασία 8h και ενζυμική συγκέντρωση 2.5 Units g DM. Για το ένζυμο *Cellic CTec2* τόσο για τα ολικά φαινολικά όσο και για τα φλαβονοειδή παρατηρείται μέγιστη αποδόση μετά από κατεργασία 2h και ενζυμική συγκέντρωση 2.5 Units g DM . Για το ένζυμο *Viscozyme* παρατηρείται μέγιστη απόδοση σε ολικά φαινολικά για κατεργασία 2h και ενζυμική συγκέντρωση 7.5 Units g DM ενώ για ολικά φλαβονοειδή για κατεργασία 8h και ενζυμική συγκέντρωση 7.5 Units. Όσον αφορά τον συνεργιτισμό *Cellic CTec2/Htec2* μέγιστη απόδοση σε ολικά φαινολικά παρατηρήθηκε για ενζυμική συγκέντρωση CTec2 4.5 Units/g DM και Htec2 0.25 Units/ g DM , ενώ για ολικά φλαβονοειδή για συγκέντρωση CTec2 2.25 Units/g DM και HTec2 0.75 Units/g DM.

Για την απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά κυριότερος παράγοντας για τα ένζυμα *Celluclast* , *Liquozyme*, *Cellic CTec2* και *Viscozyme* αποδείχτηκε η ενζυμική συγκέντρωση ενώ για τα ένζυμα *Alcalase* και *Lipolase* ο χρόνος κατεργασίας. Για τον συνεργιτισμό CTec2/HTec2 κυριότερος παράγοντας αποδείχτηκε η συγκέντρωση του *Cellic CTec2*.

Για τη απόδοση της εκχύλισης σε φλαβονοειδή κυριότερος παράγοντας για τα ένζυμα *Celluclast* , *Liquozyme*, *Alcalase*, *Cellic CTec2* και *Viscozyme* αποδείχτηκε ο χρόνος κατεργασίας ενώ για το ένζυμο *Lipolase* η ενζυμική συγκέντρωση. Για τον συνεργιτισμό CTec2/HTec2 κυριότερος παράγοντας αποδείχτηκε η συγκέντρωση του *Cellic HTec2*.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση οι τιμές του IC50 κυμάνθηκαν μεταξύ 2,2 και 7,8 , με το πιο αποδοτικό ένζυμο να αποδεικνύεται το *Celluclast* του οποίου οι τιμές διακυμάνθηκαν μεταξύ 2,2 και 3,6 δείχνοντας μια συνολικά καλή αντιοξειδωτική δράση.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη αφορά ενζυμικές εκχυλίσεις σε εργαστηριακό περιβάλλον, συνεπώς για να μπορέσει να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα και να γενικευτεί σε βιομηχανική κλίμακα θα πρέπει να γίνει ανάλυση κόστους όλων των σταδίων ξεχωριστά αλλά και της διεργασίας σαν σύνολο.

Ακόμα, σημαντικό παράγοντα στη βιωσιμότητα της διεργασίας θα διαδραματίσει το ποσοστό ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

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.

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

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

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

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-epicandiciol, 7-epicandiciol 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.

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

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

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.

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*

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. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.

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.

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

D'Archivio M., Filesì C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2007; 43:348–361.

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.

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

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.

Fotini A Trikka, Sofia Michailidou, Antonios M Makris, Anagnostis Argiriou(January 2019). Biochemical Fingerprint of Greek *Sideritis* spp. : Implications for Potential Drug Discovery and Advanced Breeding Strategies

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

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.

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.

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

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 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

Linardaki Z., Papandreou M.A., Iatrou G., Lamari F.N., Margarity M., (2008). Antioxidant response of brain regions in adult mice after daily consumption of herbal tea from *Sideritis clandestina*. *Planta Medica*, 74(09), PA240.

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

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.

M. Devgun, A. Nanda, S.H. Ansari, Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb, *Acta Pol, Pharma. Drug. Research*, 69 (2012) 475-485.

M. Pinelo, A.S. Meyer, Enzyme-assisted extraction of antioxidants: Release of phenols from vegetal matrixes, *Electron J Environ Agric Food Chem*, 7 (2008) 3217-3220.

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

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.

O. Folin, V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of biological chemistry*, 73 (1927) 627-650.

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

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*.

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

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.

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.

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

Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X>
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.

Svendsen, Lipase protein engineering, *Biochim Biophys Acta*. 2000

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.

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

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

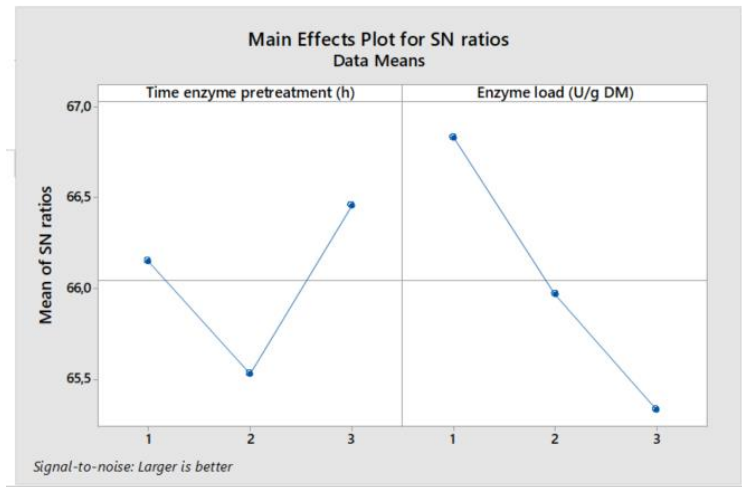
Wang S.M., Giang Y.S., Ling Y.C., 2002. Taguchi's method in optimizing the experimental conditions of simultaneous supercritical fluid extraction and chemical derivatization for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of amphetamine and methamphetamine in aqueous matrix, *For. Sci. Journ.*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

X. Cheng, 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.

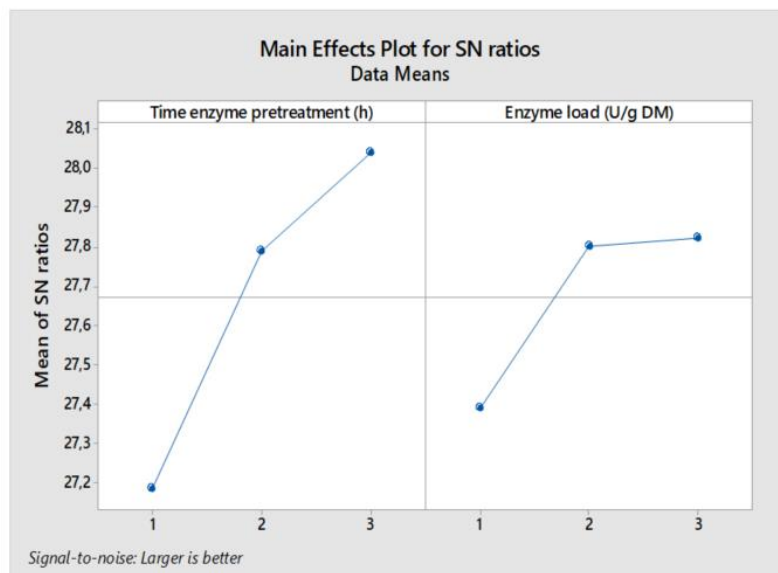
Z. Akar, M. Küçük, H. Doğan, A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32 (2017) 640-647

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

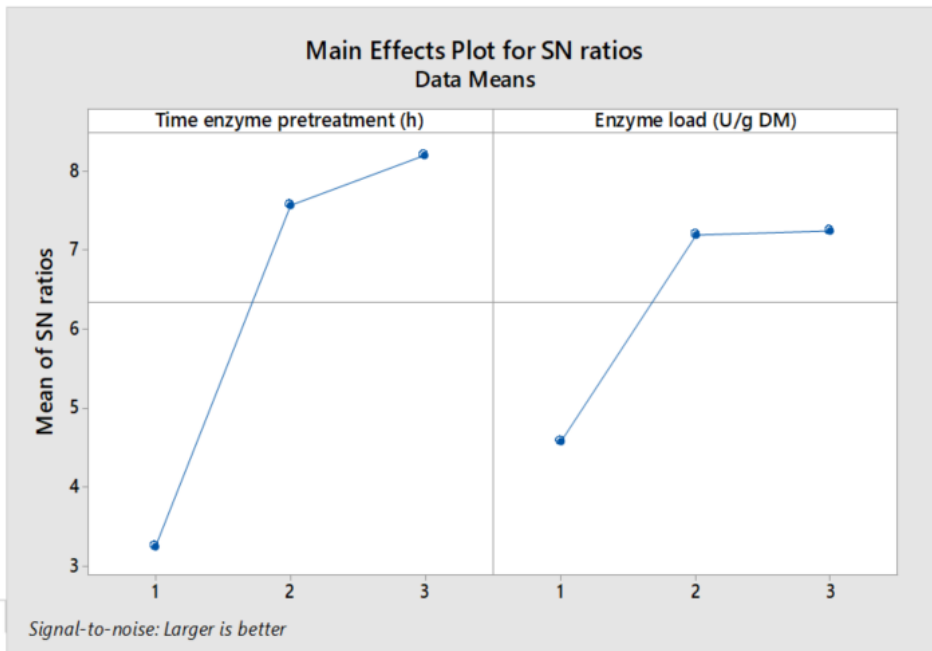
Celluclast



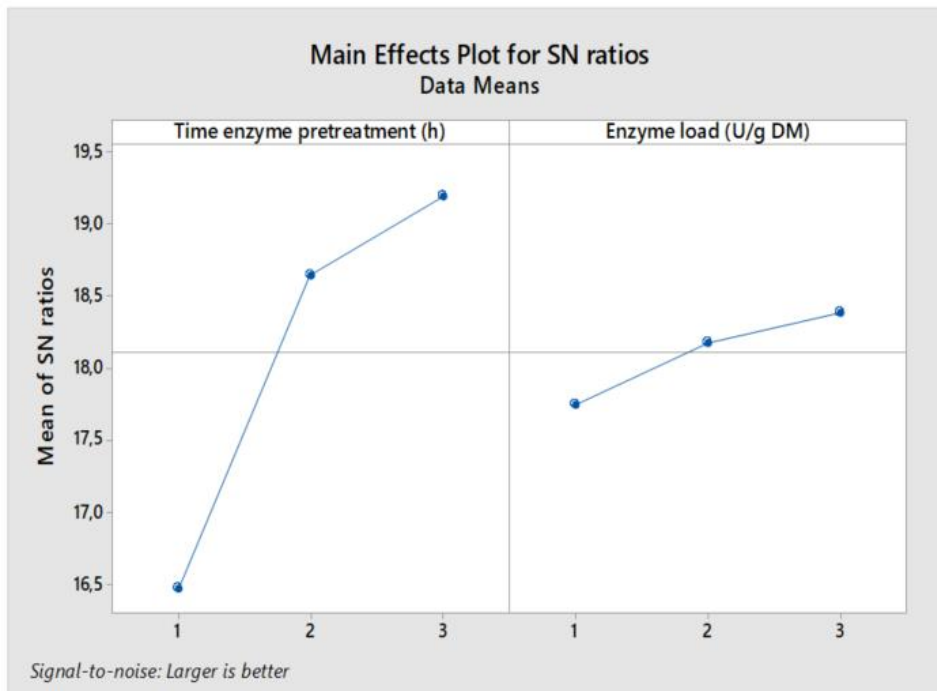
Διάγραμμα 68: S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά



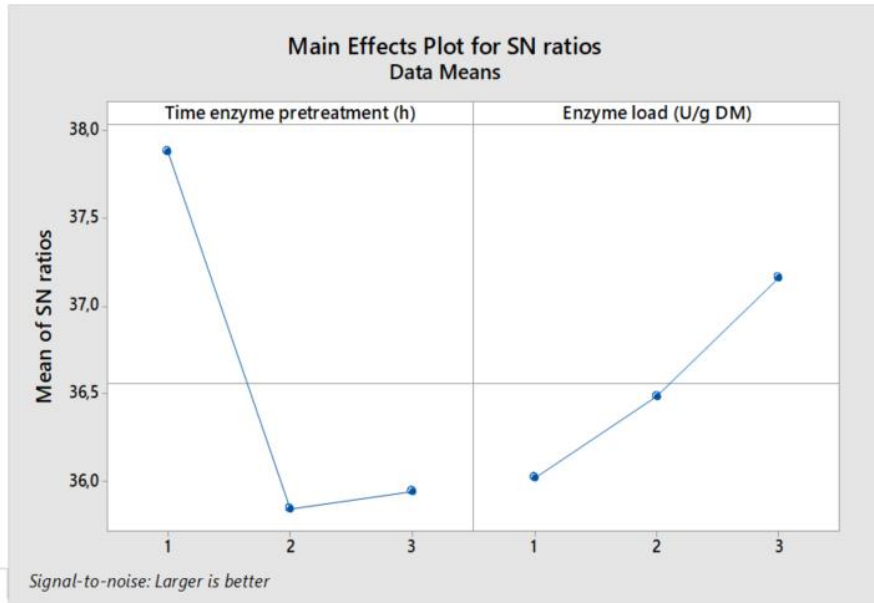
Διάγραμμα 69: S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους



Διάγραμμα 70: S/N διάγραμμα για την γλυκόζη

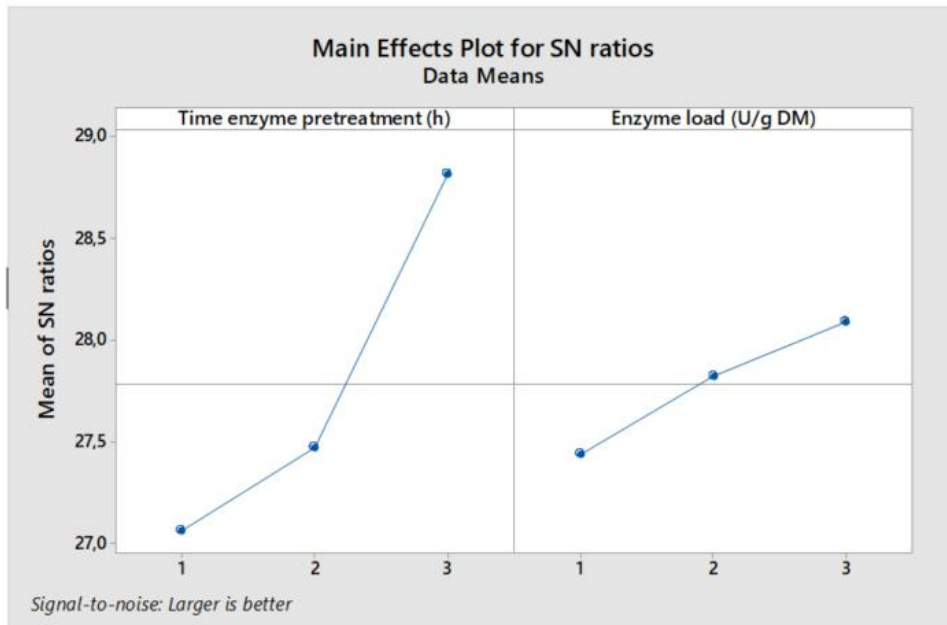


Διάγραμμα 71: S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα

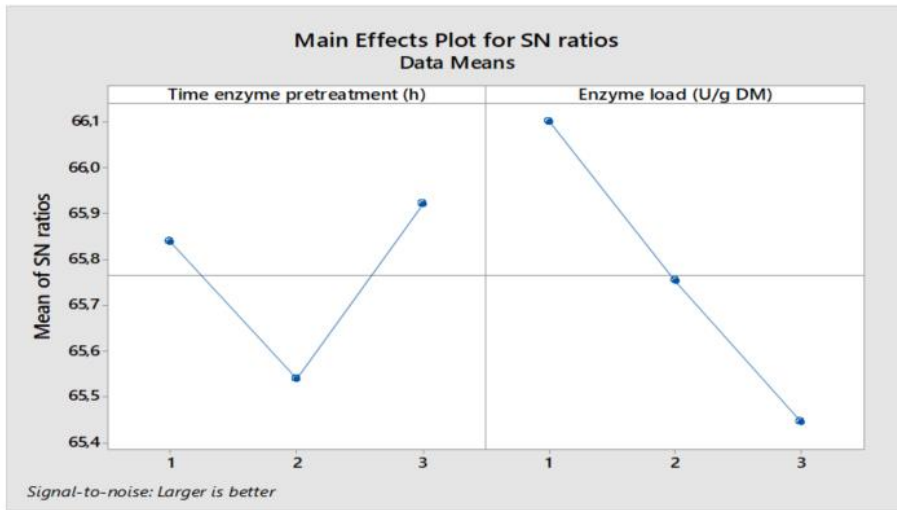


Διάγραμμα 72: S/N διάγραμμα για τα ολικά φλαβονοειδή

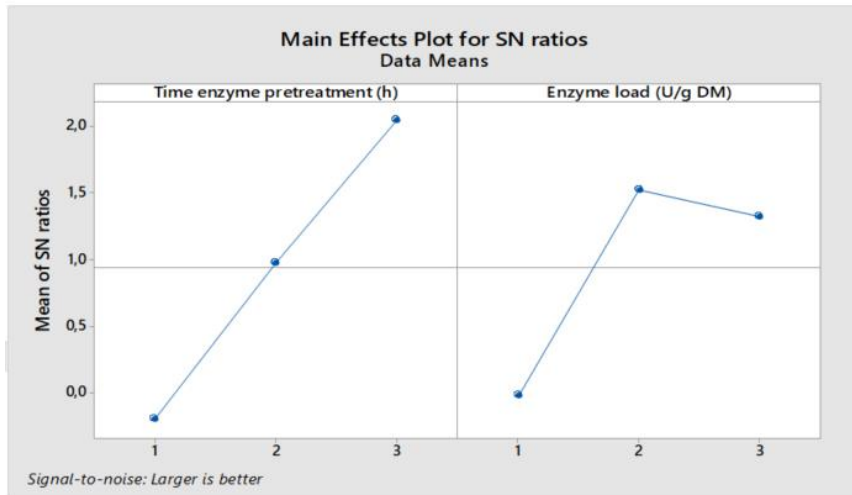
Liquozyme



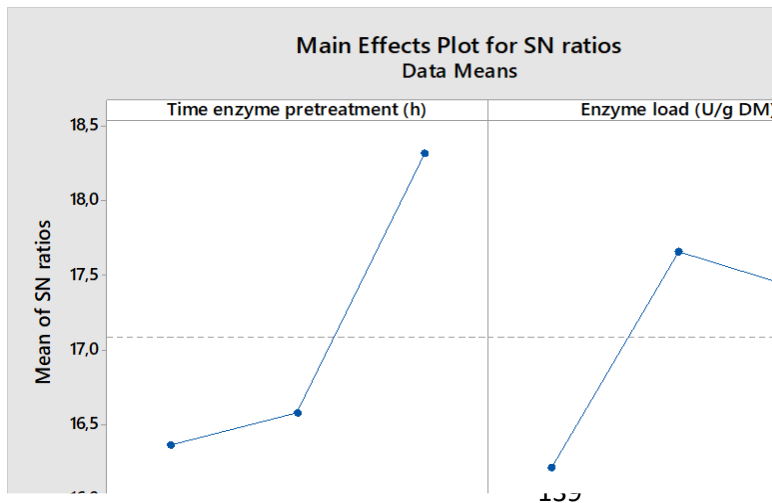
Διάγραμμα 73: S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους



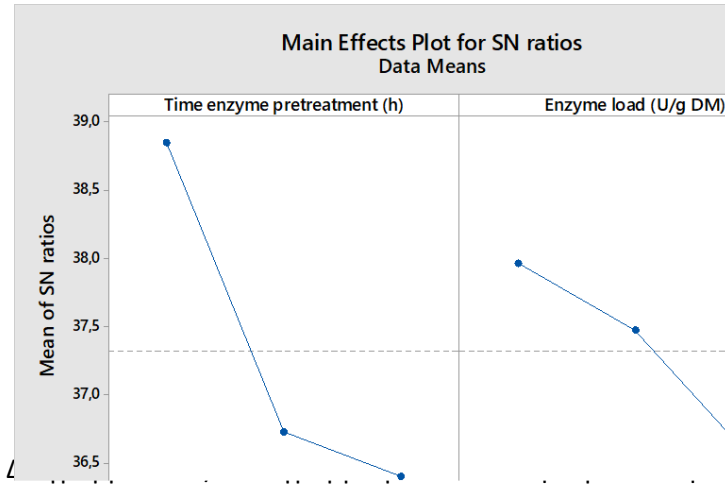
Διάγραμμα 74: S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά



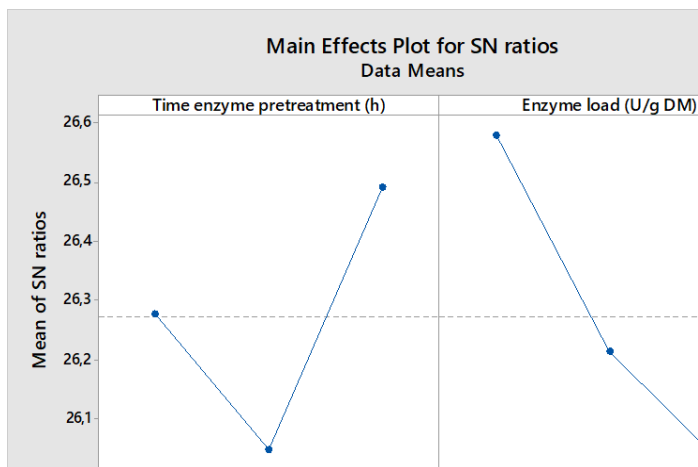
Διάγραμμα 75: S/N διάγραμμα για τη γλυκόζη



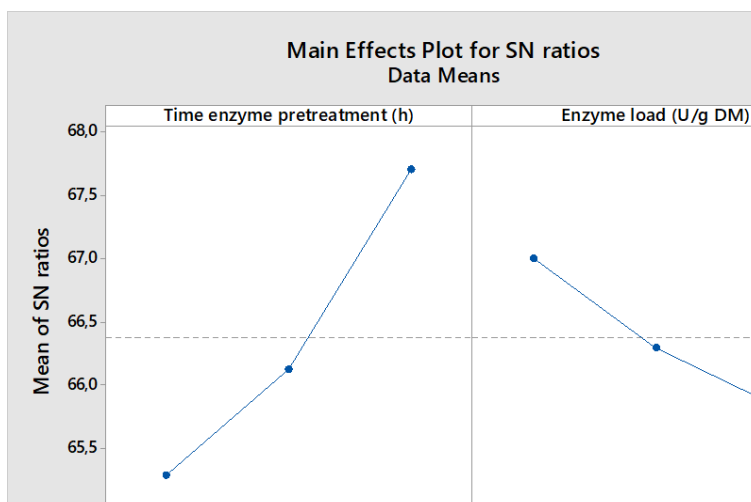
Διάγραμμα 75. S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σάκχαρα



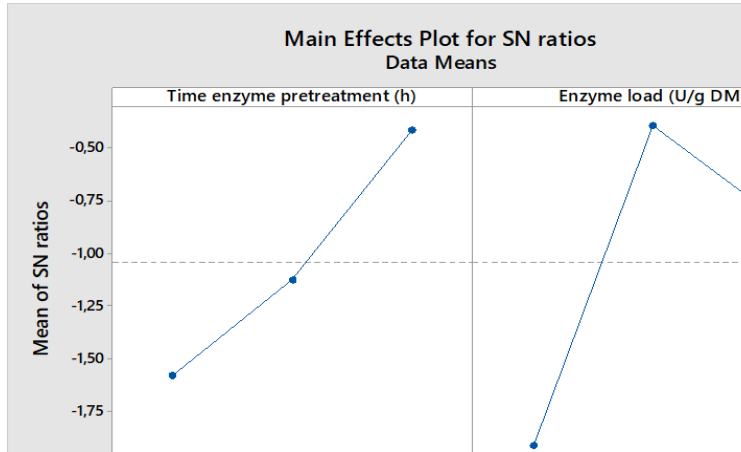
Alcalase



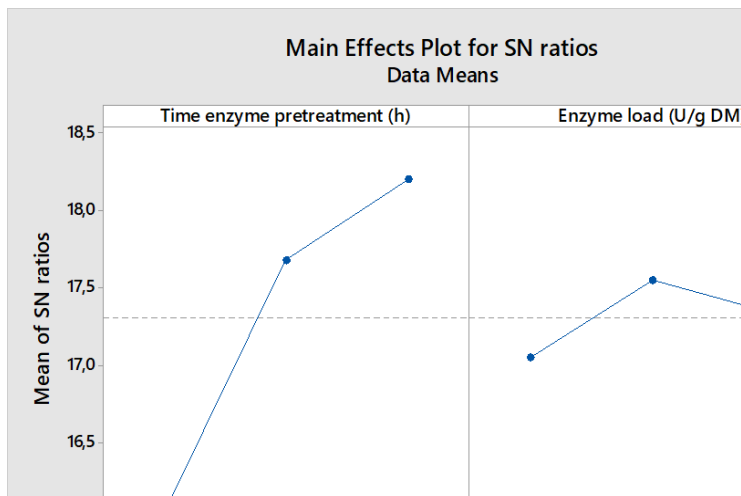
Διάγραμμα 77. S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους



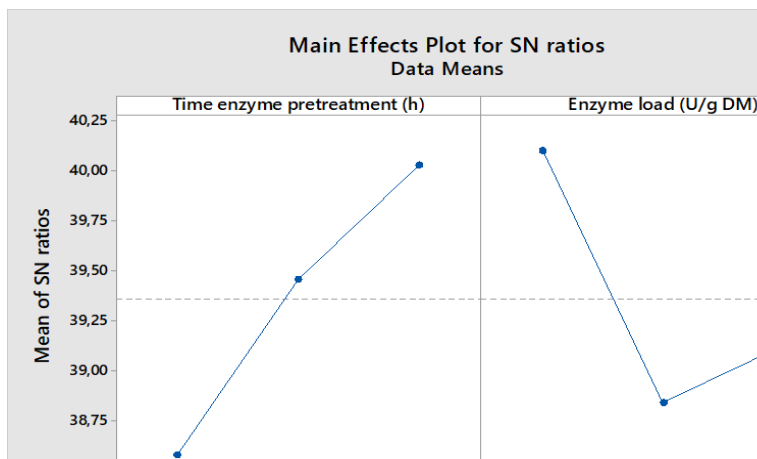
Διάγραμμα 78. S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά



Διάγραμμα 79. S/N διάγραμμα για τη γλυκόζη

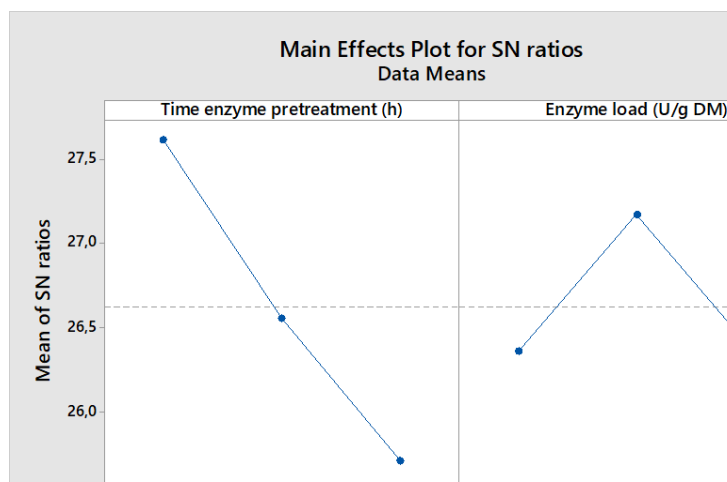


Διάγραμμα 80. S/N διάγραμμα για τα ολικά αναγωγικά σακχάρα

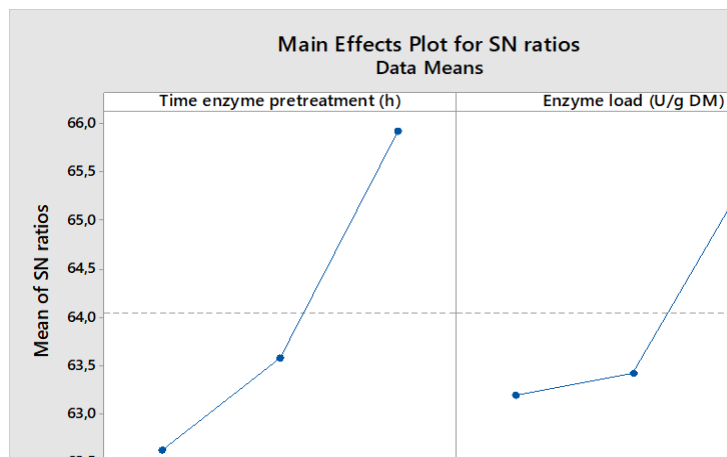


Διάγραμμα 81 . S/N διάγραμμα για τα ολικά φλαβονειδή

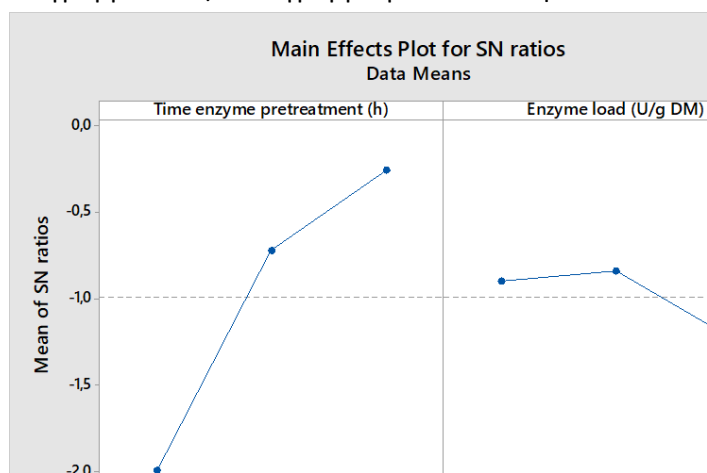
Lipolase



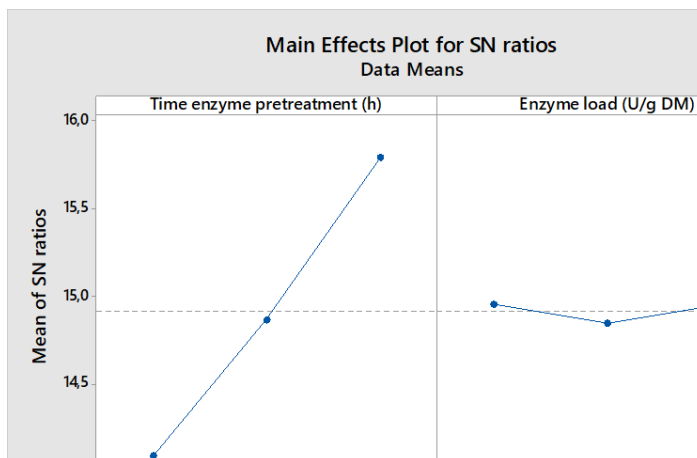
Διάγραμμα 82. S/N διάγραμμα για την απώλεια βάρους



Διάγραμμα 83. S/N διάγραμμα για τα ολικά φαινολικά



Διάγραμμα 84. S/N διάγραμμα για τη γλυκόζη



Διαγράμμα 85. S/N διαγράμμα για τα ολικα αναγωγικα σάκχαρα

