



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το άγριο
τριαντάφυλλο (*Rosa canina* L.) με χρήση
κυτταρινολυτικών ενζύμων**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΙΑΝΝΙΚΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Διομή Μαμμά

Αθήνα 2022

Περίληψη

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη διαφόρων παραμέτρων, όπως ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία στερεού-υγρού, το ενζυμικό φορτίο και η κοκκομετρία της πρώτης ύλης, οι οποίοι επηρεάζουν την Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE) βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού της αγριοτριανταφυλλιάς (*Rosa canina* L.)

Η ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση στις βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής έχει εντείνει την ερευνητική δραστηριότητα αναφορικά με την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από φαρμακευτικά φυτά, συμπεριλαμβανομένου και του άγριου τριαντάφυλλου. Ο καρπός του κυνόροδου *R. canina* L. περιέχει πληθώρα βιοενεργών συστατικών, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, γαλακτολιπίδια, τριτερπενικά οξέα, βιταμίνες A, C & E, καροτενοειδή, σάκχαρα, μεταλλικά στοιχεία κ.λπ.. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα των καρπών εμφανίζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσοτροποποιητικές, αντιδιαβητικές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές, νευροπροστατευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση βασίζεται στη χρήση υδρολυτικών κυρίως ενζύμων στοχεύοντας στην αποικοδόμηση του ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματος της φυτικής μήτρας, και πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, λόγω της αποφυγής της χρήσης τοξικών οργανικών διαλυτών, των ήπιων λειτουργικών συνθηκών και των ενισχυμένων αποδόσεων χάρη στην υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σύστασης της πρώτης ύλης, δηλαδή του αποξηραμένου περικαρπίου του καρπού της *R. canina* L.. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NREL, η περιεκτικότητα των υδατοδιαλυτών ενώσεων ανήλθε στο 40.3% β/β (ξ.β.) και η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη εκτιμήθηκε στο 9.9% β/β (ξ.β.). Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldhal στο 7.5% β/β (ξ.β.), ενώ τα ελεύθερα σάκχαρα που ανιχνεύθηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν η γλυκόζη (2.3 g/100 g πρώτης ύλης) και η φρουκτόζη (3.3g/100 g π.υ.).

Οι Ενζυμικά Υποβοηθούμενες Εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec3 της Novozymes, το οποίο συνιστά σύμπλεγμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών. Ειδικότερα, διεξήχθησαν τέσσερις πειραματικές σειρές, στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης, της αναλογίας στερεού-υγρού και του ενζυμικού φορτίου ταυτόχρονα με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης. Η θερμοκρασία και το pH του διαλύτη επιλέχθηκαν έτσι ώστε να βρίσκονται στα αντίστοιχα βέλτιστα εύρη για το ενζυμικό σκεύασμα, ενώ ο ρυθμός ανάδευσης ρυθμίστηκε στις 180 rpm. Έπειτα, τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και την αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.

Κατά τη μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης εξετάστηκαν τρία διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας (<500 μm, 500-600 μm και 850-1000 μm) για σταθερή αναλογία στερεού-υγρού (3% β/ο) και σταθερό ενζυμικό φορτίο (10 FPU/g πρώτης ύλης). Προέκυψε ότι η εκχύλιση πρακτικά τερματίζεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 2 και 6 h, ενώ για μικρότερους κόκκους στερεού απαιτείται λιγότερος χρόνος εκχύλισης. Οι μέγιστες αποδόσεις TPC κυμάνθηκαν στο εύρος 136.2-157.8 mg γαλλικού οξέος/g π.υ., οι μέγιστες αποδόσεις TFC στο εύρος 135.7-152.5 mg κατεχίνης /g π.υ. και η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση στο εύρος δεικτών IC₅₀ 0.83-1.08 μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος. Διαπιστώθηκε ότι όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία της πρώτης ύλης, τόσο περισσότερο αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση.

Στο πείραμα της μελέτης επίδρασης της αναλογίας στερεού-υγρού εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 2, 4, 6 και 8% β/ο σε σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g πρώτης ύλης και σε κοκκομετρία <500 μm. Προέκυψε ότι η εκχύλιση πρακτικά τερματίζεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 6 και 8 h. Οι μέγιστες τιμές TPC κυμάνθηκαν στο εύρος 138.3-158.9 mg γαλλικού οξέος/g π.υ., καθώς και υπολογίστηκε αύξηση της απόδοσης TPC της τάξης του 90-183% συγκριτικά με τα αντίστοιχα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης. Οι μέγιστες τιμές TFC κυμάνθηκαν στο εύρος 123.1-133.1 mg κατεχίνης/g π.υ., καθώς και υπολογίστηκε αύξηση της απόδοσης TFC της τάξης του 119-133% συγκριτικά με τα αντίστοιχα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα. Διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος των εκχυλιζόμενων βιοδραστικών ενώσεων, ενώ αντίθετα παρατηρείται μείωση της απόδοσης ανά μονάδα μάζας στερεού εξαιτίας των περιορισμών που προκαλεί το υψηλό ιξώδες στα φαινόμενα μεταφορά μάζας.

Στο πείραμα της μελέτης επίδρασης των υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 20, 25, 33.3 και 50% β/ο σε σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και σε κοκκομετρία <500 μm. Προέκυψε ότι για υψηλές συγκεντρώσεις στερεού απαιτούνται σημαντικά μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης. Οι μέγιστες αποδόσεις TPC κυμάνθηκαν στο εύρος 127.8-171.3 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. και οι μέγιστες αποδόσεις TFC στο εύρος 124.0-163.7 mg κατεχίνης /g π.υ.. Διαπιστώθηκε ότι για πολύ υψηλές αναλογίες στερεού-υγρού προέκυψαν πολύ ιξώδη συστήματα γεγονός που δυσχέρανε την υδρόλυση της φυτικής μήτρας από τα ένζυμα.

Στο πείραμα της μελέτης επίδρασης του ενζυμικού φορτίου εξετάστηκαν οι ενζυμικές συγκεντρώσεις 0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm. Οι μέγιστες αποδόσεις TPC κυμάνθηκαν στο εύρος 161.0-192.6 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. και οι μέγιστες αποδόσεις TFC στο εύρος 114.0-147.7 mg κατεχίνης /g π.υ.. Διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται η ενζυμική συγκέντρωση αυξάνονται αναλογικά και οι αποδόσεις TPC & TFC, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, γεγονός που υποδεικνύει ότι το εύρος των ενζυμικών φορτίων που μελετήθηκε είναι μικρότερο από τη βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση.

Τέλος, εφαρμόστηκε ο περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCC) τριών παραγόντων, στον οποίο μελετήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση της αναλογίας στερεού-υγρού (εύρος 6.6-23.4 % β/ο), του χρόνου εκχύλισης (εύρος 0.6-7 h) και του ενζυμικού φορτίου (εύρος 0.2-1.8 % ο/ο) με στόχο τη μεγιστοποίηση των αποδόσεων TPC & TFC και της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι μετρήσεις της απόδοσης TPC προσαρμόστηκαν ικανοποιητικά σε δευτεροβάθμιο μοντέλο ($R^2=0.7473$), ενώ η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) επιβεβαίωσε ότι ο χρόνος εκχύλισης έχει σημαντική επίδραση στην τιμή TPC ($p<0.0001$), καθώς και η αναλογία στερεού-υγρού ($p=0.0036$). Οι μετρήσεις δεικτών IC_{50} προσαρμόστηκαν πολύ καλά σε δευτεροβάθμιο μοντέλο ($R^2=0.8808$), ενώ ισχυρότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η αναλογία στερεού-υγρού ($p<0.0001$). Από τη βελτιστοποίηση διαπιστώθηκε ότι, οι μέγιστες δυνατές τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών είναι TFC = 127.005 mg κατεχίνης/g π.υ., TPC = 152.554 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. και αντιοξειδωτική ικανότητα με δείκτη $IC_{50}= 0.13752 \mu\text{L}$ εκχυλίσματος/mL δείγματος και επιτυγχάνονται εφαρμόζοντας χρόνο εκχύλισης 6 h, ενζυμικό φορτίο 1.5% ο/ο και αναλογία στερεού-υγρού 18% β/ο.

Λέξεις-Κλειδιά:

Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE), καρπός άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina L.*), κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, φυσικά προϊόντα, ολικό περιεχόμενο σε φαιολικές ενώσεις (TPC), ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC), αντιοξειδωτική δράση, δείκτης IC₅₀, περιγεγραμμένος κεντρικός σχεδιασμός (CCC)

Abstract

The aim of this diploma thesis is the study of various parameters, such as the extraction time, the solid-liquid ratio, the enzymatic concentration and the particle size of the raw material, which affect the Enzyme-Assisted Extraction (EAE) of bioactive compounds from the rose hip shell of wild rose (*Rosa canina L.*).

The increasing demand in the pharmaceutical, cosmetic, and dietary supplement industries has intensified research activity regarding the extraction of bioactive compounds from medicinal plants, including wild rose. The rose hip of the dogrose *R. canina L.* is rich in bioactive components such as phenolic acids, flavonoids, galactolipids, triterpene acids, vitamins A, C & E, carotenoids, carbohydrates, minerals, etc. Therefore, rose hip extracts exhibit strong antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antidiabetic, anticancer, cardioprotective, neuroprotective, and antimicrobial properties. Enzyme-Assisted Extraction is based on the use of mainly hydrolytic enzymes with the aim of disrupting the recalcitrant cell wall of the plant matrix, which consists of polysaccharides. The EAE of the *R. canina L.* rose hip is advantageous over conventional extraction methods due to the avoidance of the use of toxic organic solvents, the protection of thermolabile bioactive compounds in the mild operating conditions, the enhanced yields thanks to the high substrate specificity of the enzymes, etc.

Initially, the compositional analysis of the rose hip shell of *R. canina L.* was performed. According to the NREL protocol, the water-soluble compound content amounted to 40.3% w/w on a dry basis, and the cellulose content was estimated to be 9.9% w/w (d.b.). The protein content was determined by the Kjeldhal method at 7.5% w/w (d.b.), while the free sugars detected by high-performance liquid chromatography were glucose (2.3g/100g_{raw material}) and fructose (3.3g/100g_{r.m.}).

The Enzyme-Assisted Extractions were carried out using the enzymatic mixture Cellic CTec3 from Novozymes, which is a complex of cellulases and hemicellulases, while the raw material was the dried rose hip shell of *R. canina L.*. In particular, four experimental series were conducted, in which the effects of raw material particle size, solid-liquid ratio, and enzymatic concentration were investigated concurrently with the effect of extraction time. The temperature and pH of the solvent were selected to be in the respective optimal ranges of the enzymatic mixture, while the stirring rate was set at 180 rpm. Subsequently, the extracts were characterized in terms of total phenolic content (TPC) with the Folin-Ciocalteu method; total flavonoid content (TFC) with the aluminum chloride colorimetric method; and antioxidant activity by determining the DPPH radical scavenging capacity.

In the study of the effect of raw material particle size, three different particle size ranges (<500 μm , 500-600 μm and 850-1000 μm) were examined at a constant solid-liquid ratio (3% w/v) as well as at a constant enzymatic concentration (10 FPU/g_{r.m.}). The results showed that the extraction is practically terminated in the time interval between 2 and 4 h, while for smaller particle sizes less extraction time is required. The maximum TPC yields were determined in the range of 136.2-157.8 mg_{gallic acid}/g_{r.m.}, the maximum TFC yields in the range 135.7-152.5 mg_{catechin}/g_{r.m.} and the maximum antioxidant activity in the IC₅₀ index range of 0.83-1.08 μl _{extract/ml solution}. It is interesting to mention that a decrease in the particle size of the raw material increases the efficiency of the extraction of phenolic and flavonoid compounds, as well as compounds with antioxidant activity.

In the study of the effect of the solid-liquid ratio, four solid raw material concentrations were examined: 2, 4, 6 and 8% w/v in powder form (<500 μm) and at constant enzymatic concentration (2.5 FPU/g_{r.m.}). The results indicated that the extraction is practically terminated

in the time interval between 6 and 8 h. The maximum TPC values were determined in the range of 138.3-158.9 mg gallic acid/g r.m., and an increase in TPC yield of 90-183% was calculated compared to the corresponding hydroethanolic extracts of the conventional extraction. The maximum TFC values were determined in the range of 123.1-133.1 mg catechin/g r.m., and an increase in TFC yield of 119-133% compared to the corresponding hydroethanolic extracts was calculated. The findings showed that as the concentration of the solid raw material increases, the concentration per unit volume of extract of the bioactive compounds also increases, while, on the contrary, a decrease in the yield per unit mass of solid is observed due to the limitations caused by the high viscosity in the mass transfer phenomena.

In the study of the effect of high solid-liquid ratios, four concentrations of solid raw material were examined: 20, 25, 33.3 and 50% w/v in powder form (<500 μm) and at constant enzymatic concentration (1% v/v). The results revealed that for high solid concentrations, significantly longer extraction times are required. The maximum TPC yields ranged from 127.8-171.3 mg gallic acid/g r.m. and the maximum TFC yields were determined in the range of 124.0-163.7 mg catechin/g r.m.. It is noteworthy to mention that very high solid-liquid ratios result in extremely viscous systems, which hinder the hydrolyzation of the plant matrix by the enzymes.

In the study of the effect of the enzyme loading, four enzyme concentrations were examined: 0.5, 1, 1.5, 2 % v/v at constant raw material concentration (25% w/v) in powder form (<500 μm). The maximum TPC yields ranged from 161.0-192.6 mg gallic acid/g r.m. and the maximum TFC yields were determined in the range of 114.0-147.7 mg catechin /g r.m.. The results noted that as the enzyme concentration increases, the TPC and TFC yields increase proportionally, as well as the antioxidant activity of the extracts, which indicates that the range of enzyme loadings studied is less than the optimal enzyme concentration.

Finally, the Central Composite Circumscribed design (CCC) of three factors was applied, in which the simultaneous effect of solid-liquid ratio (range 6.6-23.4 % w/v), extraction time (range 0.6-7 h) and enzymatic concentration was studied (range 0.2-1.8% v/v), with the goal of increasing the TPC and TFC yields as well as the antioxidant activity. The TPC yield measurements were adequately fitted to a quadratic model ($R^2=0.7473$), while the analysis of variance (ANOVA) confirmed that the extraction time has a significant effect on the TPC value ($p<0.0001$), as well as the solid-liquid ratio ($p=0.0036$). The measurements of IC_{50} indices fitted very well to a quadratic model ($R^2=0.8808$) and the solid-liquid ratio showed a stronger effect on the antioxidant activity ($p<0.0001$). The optimization indicated that the maximum possible values of the dependent variables are $\text{TFC} = 127,005 \text{ mg catechin/g r.m.}$, $\text{TPC} = 152,554 \text{ mg gallic acid/g r.m.}$ and antioxidant capacity with an index of $\text{IC}_{50} = 0.13752 \mu\text{L extract/mL sample}$. The best results were obtained when applying an extraction time of 6 h, an enzymatic concentration of 1.5% v/v and a solid-liquid ratio of 18% w/v.

Keywords:

Enzyme-Assisted Extraction (EAE), rose hip of wild rose (*Rosa canina L.*), cellulases, hemicellulases, natural products, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), antioxidant activity, IC₅₀ index, Central Composite Circumscribed design (CCC)

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 Φυσικά προϊόντα.....	1
1.1 Γενικά στοιχεία	1
1.2 Φυσικά προϊόντα ως πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες.....	2
1.2.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες	2
1.2.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες	3
Κεφάλαιο 2 Καρπός άγριου τριαντάφυλλου (<i>Rosa canina L.</i>).....	10
2.1 Ταξινόμια και γεωγραφική εξάπλωση	10
2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	10
2.3 Ιστορική αναδρομή	11
2.4 Σύσταση του καρπού <i>Rosa canina L.</i>	12
2.5 Θεραπευτικές Εφαρμογές του καρπού <i>Rosa canina L.</i>	14
2.6 Μέθοδοι εκχύλισης του καρπού <i>Rosa canina L.</i>	17
Κεφάλαιο 3 Μέθοδοι εκχύλισης.....	19
3.1 Συμβατική εκχύλιση	19
3.1.1 Εκχύλιση με υδροαπόσταξη	19
3.1.2 Εκχύλιση με χρήση διαλυτών	20
3.2 Μη συμβατική εκχύλιση	23
3.2.1 Αρχές της πράσινης εκχύλισης	23
3.2.2 Μέθοδοι μη συμβατικής εκχύλισης	24
Κεφάλαιο 4 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE).....	25
4.1 Γενικά στοιχεία	25
4.2 Κυτταρικό τοίχωμα.....	29
4.2.1 Κυτταρίνη	30
4.2.2 Ημικυτταρίνες	30
4.2.3 Πηκτίνη.....	30
4.2.4 Γλυκοπρωτεΐνες	31
4.2.5 Λιγνίνη.....	31
4.3 Ένζυμα που υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα	32
4.3.1 Κυτταρινάσες.....	33
4.3.2 Ημικυτταρινάσες.....	33
4.3.3 Πηκτινάσες.....	34

4.3.4 Πρωτεάσες	35
4.4 Παράμετροι που επηρεάζουν την ΕΥΕ.....	35
4.4.1 Είδος ενζυμικού σκευάσματος.....	35
4.4.2 Θερμοκρασία	36
4.4.3 pH.....	37
4.4.4 Κοκκομετρία- Προεπεξεργασία.....	37
4.4.5 Ανάδευση.....	38
4.4.6 Αναλογία στερεού-υγρού.....	38
4.4.7 Ενζυμικό φορτίο	39
4.4.8 Χρόνος εκχύλισης.....	40
4.4.9 Άλλοι παράγοντες	40
4.5 Εφαρμογές της ΕΥΕ	41
4.5.1 Εργαστηριακή κλίμακα.....	41
4.5.2 Πιλοτική/ Βιομηχανική κλίμακα	47
Κεφάλαιο 5 Υλικά και μέθοδοι.....	50
5.1 Αντιδραστήρια, πρώτη ύλη, ενζυμικό σκεύασμα & εξοπλισμός.....	50
5.2 Περιγραφή πειραμάτων	53
5.2.1 Ανάλυση σύστασης περικαρπίου του καρπού της <i>Rosa canina L.</i>	53
5.2.2 Συμβατική εκχύλιση	54
5.2.3 Ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις	55
5.3 Πειραματικός Σχεδιασμός (Central Composite Design)	61
5.4 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	66
5.4.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content).....	66
5.4.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content).....	69
5.4.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.....	71
5.4.4 Μέθοδος ελέγχου αντιμικροβιακών ιδιοτήτων.....	74
Κεφάλαιο 6 Αποτελέσματα και Συζήτηση	76
6.1 Σύσταση περικαρπίου του καρπού της <i>Rosa canina L.</i>	76
6.2 Συμβατική εκχύλιση	77
6.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενες Εκχυλίσεις.....	81
6.3.1 Μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού	81
6.3.2 Μελέτη επίδρασης αναλογίας στερεού – υγρού	86

6.3.3 Μελέτη επίδρασης υψηλών αναλογιών στερεού - υγρού (High Solid).....	94
6.3.4 Μελέτη επίδρασης ενζυμικού φορτίου	101
6.4 Πειραματικός σχεδιασμός.....	108
6.4.1 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)	109
6.4.2 Ολικό περιεχόμενο σε φαιολικές ενώσεις (TPC).....	111
6.4.3 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH- Αντιοξειδωτική δράση (IC ₅₀)	115
6.4.4 Βελτιστοποίηση	119
6.4.5 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων.....	119
Κεφάλαιο 7 Συμπεράσματα	121
Κεφάλαιο 8 Προοπτικές - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	124
Βιβλιογραφία	128
Παράρτημα.....	136

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκχύλισή τους	20
Πίνακας 2: Παραδείγματα υδατικής EYE φαινολικών ενώσεων [47]	45
Πίνακας 3: Εφαρμογή ενζύμων για την εκχύλιση χρωστικών υλών	46
Πίνακας 4: Κατάλογος βιοδραστικών ενώσεων βιομηχανικής σημασίας που λαμβάνονται με EYE από φυτά	48
Πίνακας 5: Κατάλογος αντιδραστηρίων, τυποποιημένων χημικών παρασκευασμάτων και αντίστοιχων εταιρειών	50
Πίνακας 6: Στοιχεία του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS της Novozymes [69].....	51
Πίνακας 7: Κατάλογος οργάνων και συσκευών	52
Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού περικαρπίου του καρπού <i>R. canina L.</i>	56
Πίνακας 9: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης της αναλογίας στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού <i>R. canina L.</i>	57
Πίνακας 10: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης των υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού <i>R. canina L.</i>	58
Πίνακας 11: Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού <i>R. canina L.</i>) για την αντίστοιχη αναλογία στερεού-υγρού	59
Πίνακας 12: Οι πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης του ενζυμικού φορτίου στην εκχύλιση του στερεού περικαρπίου του καρπού <i>R. canina L.</i>	60
Πίνακας 13: Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού <i>R. canina L.</i>) για το αντίστοιχο ποσοστό % ο/ο ενζύμου	60
Πίνακας 14: Μήτρα περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων και τριών επιπέδων [77].....	61
Πίνακας 15: Αντιστοίχιση των παραγόντων και των επιπέδων του περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) με τις πειραματικές συνθήκες	62
Πίνακας 16: Μήτρα περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων και τριών επιπέδων με πειραματικές τιμές.....	63
Πίνακας 17: Σύσταση περικαρπίου του καρπού της <i>R. canina L.</i>	76
Πίνακας 18: Συγκέντρωση και απόδοση σε TPC και TFC κατά την εκχύλιση του περικαρπίου των καρπών της <i>R. canina L.</i> κοκκομετρίας <500 μm με υδροαιθανολικό διάλυμα (αιθανόλη/νερό, 70/30 ο/ο).....	77
Πίνακας 19: Δείκτης IC ₅₀ των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση διαφορετικών συγκεντρώσεων περικαρπίου <i>R. canina L.</i> κοκκομετρίας <500 μm.	80
Πίνακας 20: Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 3% β/ο, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ. και για t=2, 6 & 48h.	85

Πίνακας 21: Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=2, 6 & 8h.....	93
Πίνακας 22: Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=6 & 48h.....	99
Πίνακας 23: Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48 h.....	107
Πίνακας 24: Αποτελέσματα εξαρτημένων μεταβλητών (TPC, TFC & IC ₅₀) για τις αντίστοιχες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, χρόνος εκχύλισης, ενζυμικό φορτίο) στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.....	108
Πίνακας 25: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.....	109
Πίνακας 26: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στον πειραματικό σχεδιασμό CCC του πλήρους και του τροποποιημένου μοντέλου.....	113
Πίνακας 27: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση του πλήρους και του τροποποιημένου μαθηματικού μοντέλου στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.....	116

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Πηγές φυσικών προϊόντων ως φαρμακευτικές ουσίες [2]	1
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη φαρμάκων από φυσικά προϊόντα [2]	2
Εικόνα 3: Πρωτογενείς μεταβολίτες, (i) Αζωτούχος βάση νουκλεϊκών οξέων (αδενίνη), (ii) Μονοσακχαρίτης (D-γλυκόζη), (iii) Λιπαρό οξύ βραχείας αλύσου (βουτυρικό οξύ), (iv) Αμινοξέα	3
Εικόνα 4: Κατηγοριοποίηση φαινολικών ενώσεων	4
Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση φαινολικών οξέων [7]	5
Εικόνα 6: Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και οι τάξεις τους [8]	6
Εικόνα 7: Δομική ταξινόμηση ταννινών [10]	7
Εικόνα 8: Δομή βενζο-α-πυρόνης	7
Εικόνα 9: Καρβόνη (συστατικό αιθέριων ελαίων)	8
Εικόνα 10: Δομή ορισμένων βασικών διατροφικών καροτενοειδών [12]	8
Εικόνα 11: Η δομή του στεροειδούς σκελετού και της χοληστερόλης	9
Εικόνα 12: Η δομή της μορφίνης	9
Εικόνα 13: <i>Rosa canina</i> L., (i) Συνολική άποψη του φυτού, (ii), άνθος και (iii) καρπός	10
Εικόνα 14: Απλοποιημένη βοτανική ανατομία του καρπού <i>Rosa canina</i> L. και επισήμανση των δομικών στοιχείων του	11
Εικόνα 15: Βοτανική εικονογράφηση του <i>Rosa canina</i> L.	11
Εικόνα 16: Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM): (i) κυτταρικό τοίχωμα φυτού χωρίς επεξεργασία, (ii) κυτταρικό τοίχωμα φυτού που υποβλήθηκε σε ενζυμική επεξεργασία [43]	25
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του κυτταρικού τοιχώματος για την απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων μέσω EYE [45]	26
Εικόνα 18: Γραφική απεικόνιση φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, που περιγράφει τις διασυνδεδεμένες φαινολικές ενώσεις, τα πεπτίδια και το δίκτυο πολυσακχαριτών. A: κυτταρίνη από μικροϊνίδια κυτταρίνης, B: ημικυτταρίνες αποτελούμενες από ξυλογλυκάνες, γλυκουρονοαραβινοξυλάνη, (1–3) (1–4)β-γλυκάνες και γλυκομαννάνη, C: δομικές πρωτεΐνες, D: πηκτίνη αποτελούμενη από ομογαλακτουρόνη, ξυλογαλακτουρονάνη και ραμνογαλακτουρονάνες I και II, E: φαινολικές ενώσεις, F: λιγνίνη; G: επίστρωση ξυλάνης και μαννάνης στα μικροϊνίδια κυτταρίνης [49]	27
Εικόνα 19: Δομή και σύνθεση του (i) πρωτογενούς και (ii) δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτών [53]	29
Εικόνα 20: Η δράση των κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και πηκτινολυτικών για την υδρόλυση των αντίστοιχων πολυσακχαριτών με στόχο την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος [55]	32
Εικόνα 21: Ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης [54]	34
Εικόνα 22: Ενζυμικό σκεύασμα Cellic [®] CTec3 HS της Novozymes	51
Εικόνα 23: Πρώτη ύλη του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa canina</i> L.	51
Εικόνα 24: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	54

Εικόνα 25: Κοσκίνιση αποξηραμένου περικαρπίου του καρπού <i>R. canina L.</i> και 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας: <500 μm, 500-600 μm και 850-1000 μm.....	56
Εικόνα 26: Πειράματα μελέτης επίδρασης στην ΕΥΕ αναλογίας στερεού-υγρού και ενζυμικού φορτίου	59
Εικόνα 27: Θερμοστατούμενος αναδευτήρας (thermomixer)	64
Εικόνα 28: (i),(iii) Οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της φαινόλης και του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, (ii) Ιοντισμός της φαινόλης σε αλκαλικό περιβάλλον Na ₂ CO ₃ [80], [81].....	66
Εικόνα 29: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	68
Εικόνα 30: Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της κερσετίνης (φλαβονοειδές) και του Al ³⁺ [80]	69
Εικόνα 31: Συμπλοκοποίηση Al ³⁺ και φλαβονοειδών (κερσετίνη) παρουσία NaNO ₂ [84].....	70
Εικόνα 32: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη μέθοδο γλωριούχου αργιλίου.....	71
Εικόνα 33: Οι αλλαγές της χημικής δομής (i) του χρώματος (ii) και του φάσματος απορρόφησης της ρίζας DPPH μετά από αναγωγή από ένα αντιοξειδωτικό	72
Εικόνα 34: Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH	73
Εικόνα 35: Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method).....	74
Εικόνα 36: Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method).....	75
Εικόνα 37: Αντιμικροβιακή δράση εκχυλίσματος: (A) μέθοδος διάχυσης πηγαδιού, (B) μέθοδος διάχυσης δίσκου.....	119

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής της γενικής διεργασίας της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (EYE) για την παραγωγή φυσικών προϊόντων	28
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (mg/L) για τον προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	68
Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (mg/mL) για τον προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου	70
Διάγραμμα 4: Οι τιμές απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm.....	78
Διάγραμμα 5: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία <500 μm.	78
Διάγραμμα 6: Οι τιμές απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm.	79
Διάγραμμα 7: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία <500 μm.	79
Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.....	81
Διάγραμμα 9: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.	82
Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.	83
Διάγραμμα 11: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.	84
Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ.....	86
Διάγραμμα 13: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής	

πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. (οι γραμμοσκιασμένες ράβδοι αντιστοιχούν στις αποδόσεις TPC της συμβατικής εκχύλισης)	87
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=24h.....	88
Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ.	90
Διάγραμμα 16: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. (οι γραμμοσκιασμένες ράβδοι αντιστοιχούν στις αποδόσεις TFC της συμβατικής εκχύλισης).....	91
Διάγραμμα 17: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία<500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=24h.....	92
Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.	94
Διάγραμμα 19: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.	95
Διάγραμμα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=48h.....	96
Διάγραμμα 21: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.	97
Διάγραμμα 22: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.	98
Διάγραμμα 23: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=48h.....	99

Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % o/o) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.	101
Διάγραμμα 25: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % o/o) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.	102
Διάγραμμα 26: Μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου για σταθερή συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48h.	103
Διάγραμμα 27: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % o/o) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.	104
Διάγραμμα 28: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % o/o) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.	105
Διάγραμμα 29: Μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου για σταθερή συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης <i>R. canina L.</i> 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48h.	106
Διάγραμμα 30: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών της απόδοσης TFC στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.	110
Διάγραμμα 31: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή συναρτήσει των μεταβλητών (χρόνος εκχύλισης, αναλογία στερεού-υγρού) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....	110
Διάγραμμα 32: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, ενζυμικό φορτίο) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....	111
Διάγραμμα 33: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών (χρόνος εκχύλισης, αναλογία στερεού-υγρού) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....	114
Διάγραμμα 34: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, ενζυμικό φορτίο) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....	114
Διάγραμμα 35: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών των δεικτών IC ₅₀ ενδεικτικών της αντιοξειδωτικής δράσης στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.....	117
Διάγραμμα 36: Ισοϋψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, χρόνος εκχύλισης) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....	117

Διάγραμμα 37: Ισοϋψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, ενζυμικό φορτίο) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.....118

Συντομογραφίες

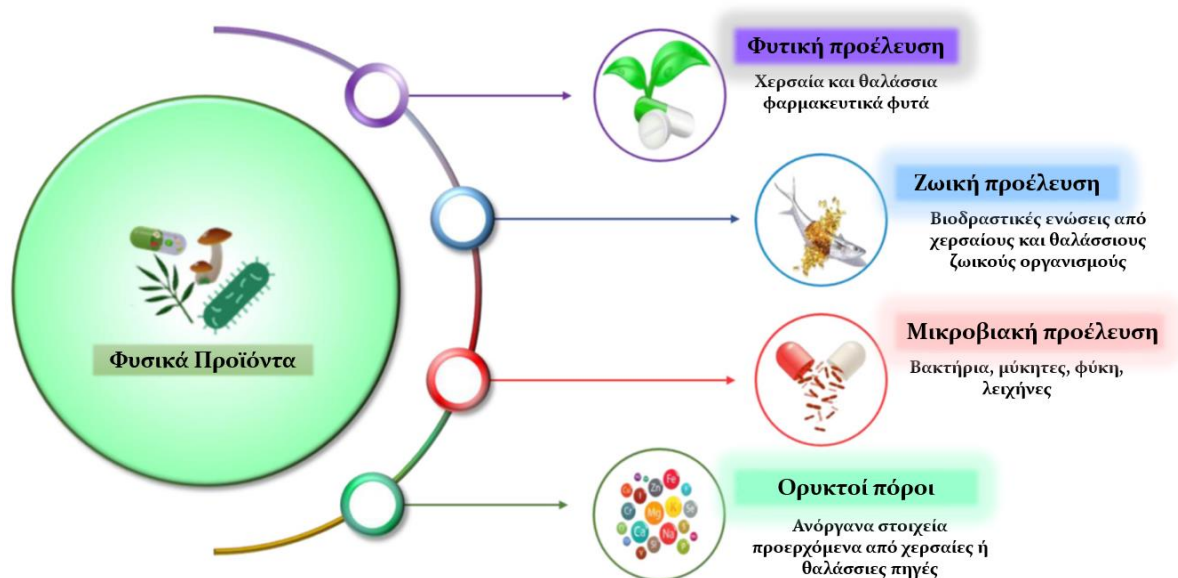
Συντομογραφία	Επεξήγηση
EYE EAE	Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση Enzyme-Assisted Extraction
TPC	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)
TFC	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content)
CCC	Περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Circumscribed design)
FCC	Εδροκεντρωμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Face Centred Central composite design)
CCI	Εγγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Inscribed design)
SLE	Εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid–Liquid Extraction)
UAE	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction)
MAE	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction)
SFE	Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction)
PEF	Εκχύλιση με Παλμικό Ηλεκτρικό Πεδίο (Pulsed-Electric Field extraction)
PFE	Εκχύλιση με Ρευστό Υπό Πίεση (Pressurized fluid extraction)
SWE	Εκχύλιση με Νερό σε Υποκρίσιμες Συνθήκες (Subcritical Water Extraction)
NaDES	Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents)
IL's	Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids)
EATPP	Ενζυμικά Υποβοηθούμενος Καταμερισμός σε Τρεις Φάσεις (Enzyme-Assisted Three-Phase Partitioning)
VOCs	Πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds)
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography)
FPU	Filter Paper Unit
IC₅₀	(Half-maximal) Inhibitory Concentration
LPMOs	Λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases)

DPPH	α,α-διφαινυλ-β-πικρυλυδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
NPDD	Natural product-based drug discovery
HRGP	Hydroxyproline-Rich GlycoProtein
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DeoxyriboNucleic Acid)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (RiboNucleic Acid)
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine triphosphate)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists

Κεφάλαιο 1 Φυσικά προϊόντα

1.1 Γενικά στοιχεία

Ως φυσικό προϊόν (natural product) χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε οργανική ένωση συντίθεται από ζώντα οργανισμό. Τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει ο ευρύτερος ορισμός της έννοιας του φυσικού προϊόντος, βάσει του οποίου φυσικό προϊόν συνιστά οτιδήποτε παράγεται από έμβια όντα και συνεπώς περιλαμβάνονται βιολογικά υλικά, σωματικά υγρά και εκκρίματα, βιοτικά υλικά στοιχεία κλπ.. Επιπλέον, στην κατηγορία των φυσικών προϊόντων υπάγονται οι ορμόνες, οι βιταμίνες, τα προϊόντα βιοτεχνολογίας και γενετικής μηχανικής, τα τρόφιμα με βιολογικά δραστικά συστατικά, τα συμπληρώματα διατροφής, ορισμένα συστατικά καλλυντικών, οι δρόγες με παραισθησιογόνο δράση και τα αντικαρκινικά μόρια [1]. Στην Εικόνα 1 απεικονίζονται οι πηγές των φυσικών προϊόντων που αξιοποιούνται από τη φαρμακευτική βιομηχανία.



Εικόνα 1: Πηγές φυσικών προϊόντων ως φαρμακευτικές ουσίες [2]

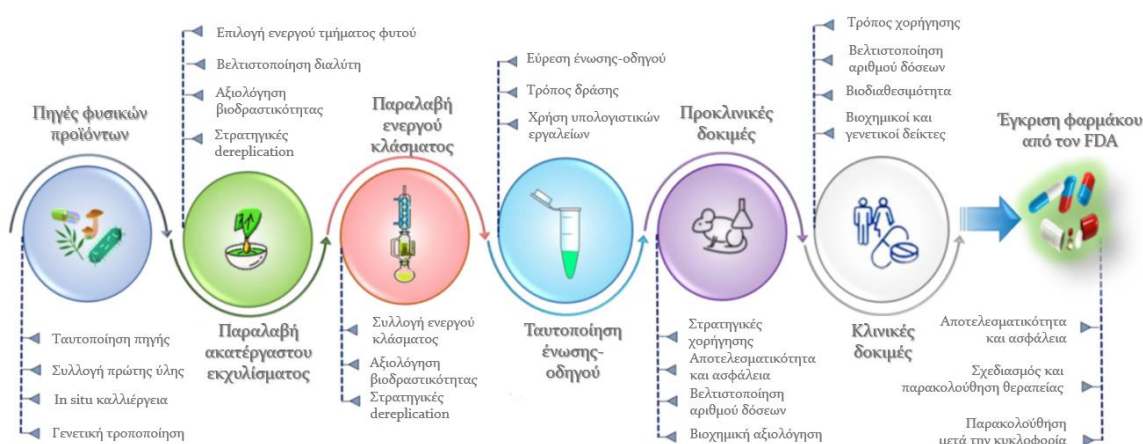
Παγκόσμια αγορά φυσικών προϊόντων

Τα φυσικά προϊόντα χάρη στα βιοενεργά συστατικά που περιέχουν αξιοποιούνται ευρέως στον κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής, στον τομέα των καλλυντικών, αλλά και στον κλάδο της φαρμακοβιομηχανίας. Μάλιστα, ο συγκεκριμένος κλάδος παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανάπτυξη και αυξημένο παγκόσμιο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι η αναμενόμενη ή εκτιμώμενη αγορά για φαρμακευτικά προϊόντα και υλικά το 2025 είναι 2.12 τρισεκατομμύρια δολάρια. Άνοδος καταγράφεται και στην παγκόσμια αγορά φυτικών εκχυλισμάτων, η οποία σύμφωνα με έρευνες αγοράς προβλέπεται να αυξηθεί από 30.8 δισ. δολάρια το 2021 σε 55.3 δισ. δολάρια έως το 2026 με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης (CAGR) 6% από το 2021 έως το 2026. Οι κύριοι παράγοντες που συντελούν την αγορά φυτικών εκχυλισμάτων είναι η αύξηση του αριθμού των ανθρώπων που

ευαισθητοποιούνται για την υγεία, οι ανερχόμενες τάσεις για vegan προϊόντα, καθώς και η επίδραση της πανδημίας του κορονοϊού (Covid-19) [2], [3].

Τεχνολογίες για την ανακάλυψη φαρμάκων από φυσικά προϊόντα

Η ανακάλυψη φαρμάκων με βάση ένα φυσικό προϊόν (Natural product-based drug discovery, NPDD) περιλαμβάνει διάφορες στρατηγικές, όπως μεθοδολογίες εικονικής και πραγματικής ταχείας διαλογής (high-throughput screening) ενάντια σε συγκεκριμένο φαρμακευτικό στόχο, τεχνολογίες omics (γονιδιωματική, πρωτεωμική, μεταβολομική) σχεδιασμό φαρμάκων με τη βοήθεια υπολογιστικών ψηφιακών μοντέλων/βιβλιοθηκών και τεχνητή νοημοσύνη [2]. Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στην έρευνα ανακάλυψης φαρμακευτικών μορίων απεικονίζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη φαρμάκων από φυσικά προϊόντα [2]

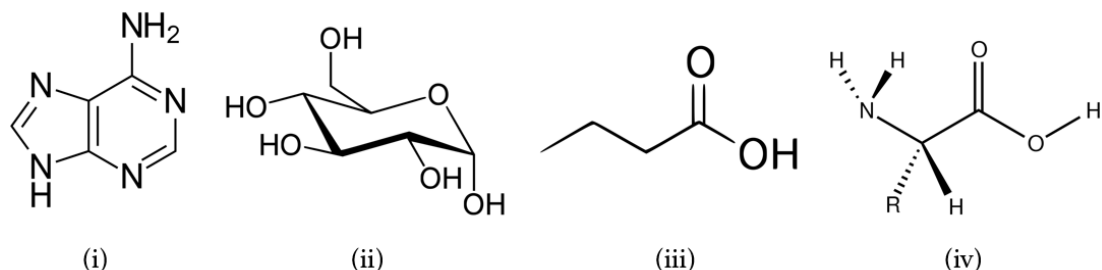
1.2 Φυσικά προϊόντα ως πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες

Στη βιβλιογραφία τα φυσικά προϊόντα ορίζονται εναλλακτικά και ως όλα τα προϊόντα του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού. Ωστόσο, στους τομείς της φαρμακευτικής χημείας και φαρμακογνωσίας χρησιμοποιείται συνήθως ο περιοριστικός ορισμός ότι φυσικά προϊόντα περιλαμβάνουν αποκλειστικά τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού.

1.2.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες

Ο πρωτογενής μεταβολισμός συνιστά το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. Για παράδειγμα, στον κύκλο του Krebs τα φυτά μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα σε υδατάνθρακες, οι οποίοι στη συνέχεια μετατρέπονται σε ενέργεια υπό τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Τα προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού διαθέτουν πλήρως εξακριβωμένο ρόλο, κοινό σε όλους τους οργανισμούς. Ως εκ τούτου, ο πρωτογενής μεταβολίτης (primary metabolite) αποτελεί ένα οργανικό μόριο του οποίου η ύπαρξη και λειτουργία είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Σχετίζεται δηλαδή άμεσα με ζωτικές

κυτταρικές λειτουργίες συμμετέχοντας στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή του οργανισμού. Στους πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνονται τα βασικά μόρια (νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που αποτελούν τις δομικές μονάδες σχηματισμού των βιολογικών μακρομορίων (DNA, RNA, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, και λιπίδια) (Εικόνα 3) [1], [4].



Εικόνα 3: Πρωτογενείς μεταβολίτες, (i) Αζωτούχος βάση νουκλεϊκών οξέων (αδενίνη), (ii) Μονοσακχαρίτης (D-γλυκόζη), (iii) Λιπαρό οξύ βραχείας αλύσου (βουτυρικό οξύ), (iv) Αμινοξέα

1.2.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

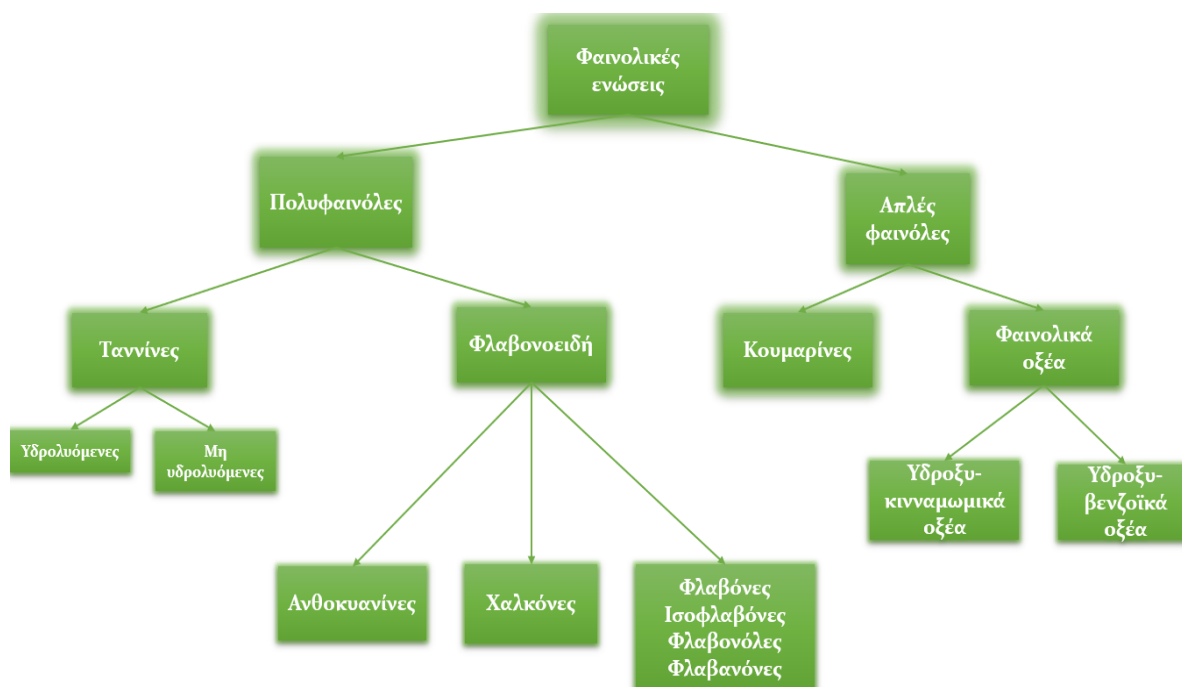
Ως δευτερογενής μεταβολισμός ορίζεται το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που δεν είναι κοινές για όλα τα είδη οργανισμών. Τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού χαρακτηρίζουν το είδος που τα παράγει, αλλά δε συμμετέχουν στη βασική οργανική του λειτουργία. Έτσι, ο δευτερογενής μεταβολίτης (secondary metabolite) δεν εμπλέκεται άμεσα στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή του οργανισμού, δηλαδή η έλλειψή του δεν επιφέρει άμεσο θάνατο, αλλά η παρατεταμένη απουσία του έχει επιπτώσεις στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχετίζονται επίσης με την αλληλεπίδραση περιβάλλοντος-οργανισμού, ενώ διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα δομών και λειτουργιών. Έχει ταυτοποιηθεί πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά οι σημαντικότερες τάξεις τους είναι:

- Φαινολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, ταννίνες κ.λπ.)
- Τερπένια και τερπενοειδή
- Στεροειδή
- Αλκαλοειδή
- Σημειοχημικές ουσίες, δηλαδή χημικές ουσίες που εκκρίνονται από τους οργανισμούς για την ανταλλαγή χημικών μηνυμάτων με σκοπό την επικοινωνία μεταξύ ίδιων ή διαφορετικών ειδών (φερομόνες, αλλομόνες κ.λπ.) [1], [4].

1.2.2.1 Φαινολικές ενώσεις

Αναφορικά με τη δομή τους, οι φαινολικές ενώσεις (phenolic compounds) περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου, και ποικίλλουν από απλά φαινολικά μόρια έως ενώσεις με υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Οι περισσότερες φυσικά απαντώμενες φαινολικές ενώσεις υπάρχουν ως συζυγή με μονο- και πολυσακχαρίτες, ενώ μπορεί επίσης να εμφανίζονται ως λειτουργικά παράγωγα (εστέρες, μεθυλεστέρας). Αν και αυτή η δομική ποικιλομορφία έχει ως αποτέλεσμα το ευρύ φάσμα των φαινολικών ενώσεων,

οι ενώσεις αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις εξής βασικές κατηγορίες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 [5]:



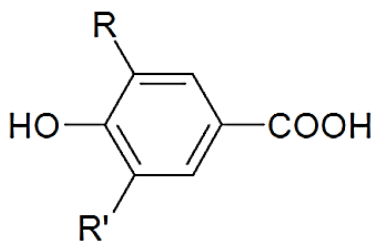
Εικόνα 4: Κατηγοριοποίηση φαινολικών ενώσεων

Φαινολικά οξέα

Ο όρος «φαινολικά οξέα» (phenolic acids) περιγράφει τις φαινολικές ενώσεις που φέρουν τουλάχιστον μία ομάδα καρβοξυλίου. Συνήθως απαντώνται με τη μορφή αμιδίων, εστέρων ή γλυκοζιτών και σπάνια στην ελεύθερη μορφή τους. Παρ'όλο που ο βασικός σκελετός της δομής τους παραμένει ο ίδιος, τα φαινολικά οξέα διαφοροποιούνται ανάλογα με τον αριθμό και την θέση ομάδων υδροξυλίου πάνω στον δακτύλιο και ως αποτέλεσμα παρουσιάζουν μεγάλη δομική ποικιλία. Γενικά, τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δύο υποομάδες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (C6-C3) (Εικόνα 5). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, που προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ, βρίσκονται στα τρόφιμα συχνά ως απλοί εστέρες με κινικό οξύ ή γλυκόζη. Τα τέσσερα πιο κοινά υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι το φερουλικό, το καφεϊκό, το π-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ. Όσον αφορά τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, αυτά προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ και βρίσκονται είτε σε διαλυτή μορφή (συζευγμένα με σάκχαρα ή οργανικά οξέα), είτε συνδεδεμένα με κλάσματα του κυτταρικού τοιχώματος ως λιγνίνη. Τέλος, σημειώνεται ότι τα φαινολικά οξέα έχουν πολύ ισχυρότερη *in vitro* αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με γνωστές αντιοξειδωτικές βιταμίνες [6].

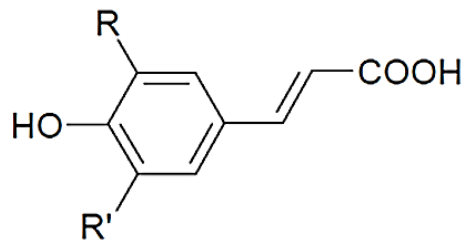
Φαινολικά οξέα

Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος



R = R' = H; p- υδροξυβενζοϊκό οξύ
R = OH, R' = H; πρωτοκατεχικό οξύ
R = OCH₃, R' = H; βανιλλικό οξύ
R = R' = OH; γαλλικό οξύ
R = R' = OCH₃; συριγγικό οξύ

Παράγωγα του κινναμωνικού οξέος



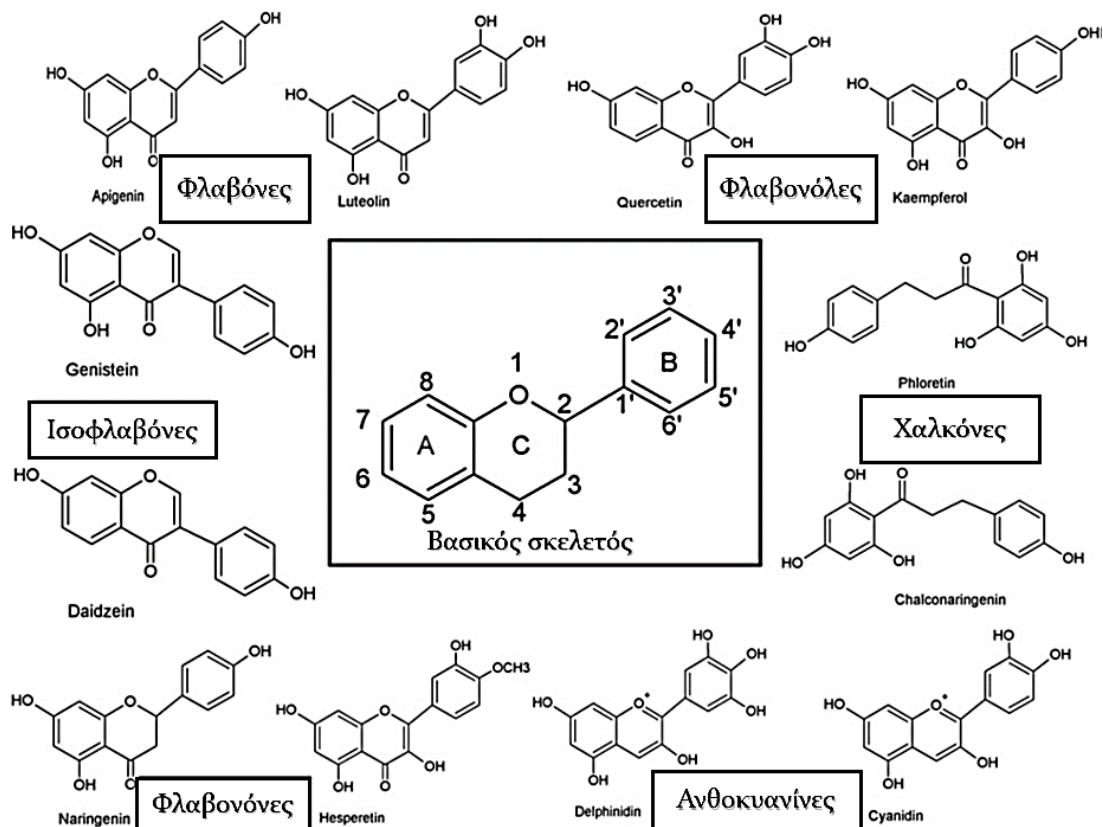
R = R' = H; p-κουμαρικό οξύ
R = OH, R' = H; καφεϊκό οξύ
R = OCH₃, R' = H; φερουλικό οξύ
R = R' = OCH₃; σιναπικό οξύ

Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση φαινολικών οξέων [7]

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή (flavonoids) μπορούν να διαιρεθούν σε διαφορετικές υποομάδες ανάλογα με τον άνθρακα του δακτυλίου C στον οποίο είναι συνδεδεμένος ο δακτύλιος B, καθώς και ανάλογα με τον βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του δακτυλίου C. Τα φλαβονοειδή στα οποία ο δακτύλιος B είναι συνδεδεμένος στη θέση 3 του δακτυλίου C ονομάζονται ισοφλαβόνες. Αυτά στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 4 ονομάζονται νεοφλαβονοειδή, ενώ εκείνα στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 2 μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε πολλές υποομάδες με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου C. Αυτές οι υποομάδες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι ανθοκυανίνες και οι χαλκόνες. (Εικόνα 6)

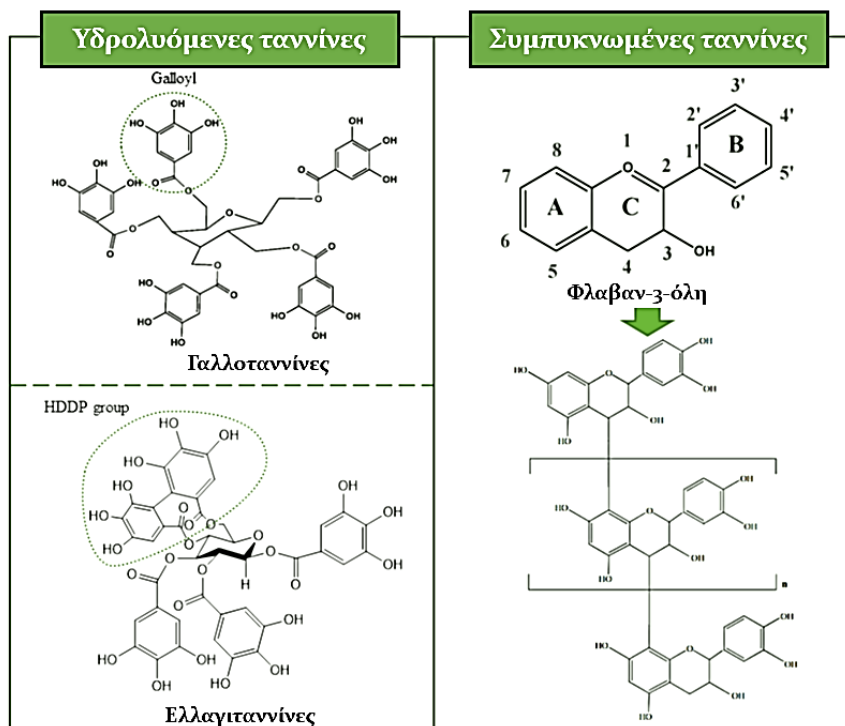
Πιο συγκεκριμένα, οι ανθοκυανίνες είναι οι χρωστικές ουσίες που ευθύνονται για τα χρώματα στα φυτά, τα λουλούδια και τα φρούτα. Η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η μαλβιδίνη και η πελαργονιδίνη είναι οι πιο συχνά μελετημένες ανθοκυανίνες. Εμφανίζονται κυρίως στα εξωτερικά κυτταρικά στρώματα διάφορων φρούτων, όπως μαύρα φραγκοστάφυλα, κόκκινα σταφύλια, σμέουρα, φράουλες και βατόμουρα. Η σταθερότητα, σε συνδυασμό με τα οφέλη για την υγεία αυτών των ενώσεων, διευκολύνει τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων σε διάφορες εφαρμογές. Το χρώμα της ανθοκυανίνης εξαρτάται από το pH και επίσης από τη μεθυλίωση ή την ακυλίωση στις ομάδες υδροξυλίου στους δακτυλίους A και B [8].



Εικόνα 6: Βασική δομή σκελετού των φλαβονοειδών και οι τάξεις τους [8]

Ταννίνες

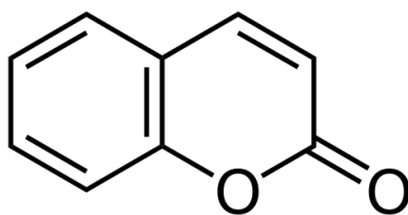
Οι ταννίνες (tannins) μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τις υδρολυόμενες και τις μη υδρολυόμενες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα πολυϋδρικής αλκοόλης, όπως γλυκόζη, και υδροξυλομάδες, οι οποίες εστεροποιούνται είτε εν μέρει είτε εξ ολοκλήρου από γαλλικό οξύ (γαλλοταννίνες) ή εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (ελλαγιταννίνες). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερείς ή ολιγομερείς φλαβαν-3-όλες, που σχηματίζονται από το συνδυασμό των δακτυλίων A και B του βασικού σκελετού των φλαβονοειδών (Εικόνα 7). Οι ταννίνες, ιδιαίτερα οι συμπυκνωμένες μορφές, αναφέρεται ότι αναστέλλουν τις ενζυμικές δραστηριότητες της κυτταρίνης, της πηκτινάσης, της αμυλάσης, των λιπασών, των πρωτεασών, της β-γαλακτοζιδάσης και άλλων μικροβιακών ενζύμων, ενώ επίσης συνδέονται με μέταλλα και πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνουν την βακτηριακή ανάπτυξη και ταυτόχρονα να ευνοούν την άμυνα του φυτού έναντι στους μικροοργανισμούς [9], [10].



Εικόνα 7: Δομική ταξινόμηση ταννινών [10]

Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες (coumarins) ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών, οι οποίες αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία ομάδα πυρόνης. Ειδικότερα οι κουμαρίνες συγκαταλέγονται στις βενζο-α-πυρόνες (Εικόνα 8). Έχει διαπιστωθεί ότι οι κουμαρίνες εμφανίζουν αντιμικροβιακή, αντιβιοτική, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση [11].

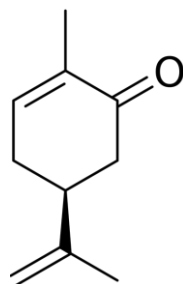


Εικόνα 8: Δομή βενζο-α-πυρόνης

1.2.2.2 Τερπένια και Τερπενοειδή

Ως τερπένια (terpens) ορίζονται οι υδρογονάνθρακες βιολογικής προέλευσης που μπορούν να προκύψουν όταν ως δομική μονάδα χρησιμοποιηθεί το ισοπρένιο. Η δομή τους λοιπόν βασίζεται σε επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8), οι οποίες με κατάλληλο συνδυασμό οδηγούν σε σκελετούς με 5, 10, 15 έως 40 ατόμων άνθρακα. Τα τερπένια αποτελούν τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων (Εικόνα 9) και της ρητίνης των φυτών και εντάσσονται στην κατηγορία των λιπιδίων. Επιπλέον, ως τερπενοειδή (terpenoids) ορίζονται τα χημικώς τροποποιημένα τερπένια. Ειδικότερα, η αναδιαμόρφωση της δομής των τερπενίων μπορεί να έχει προκύψει με

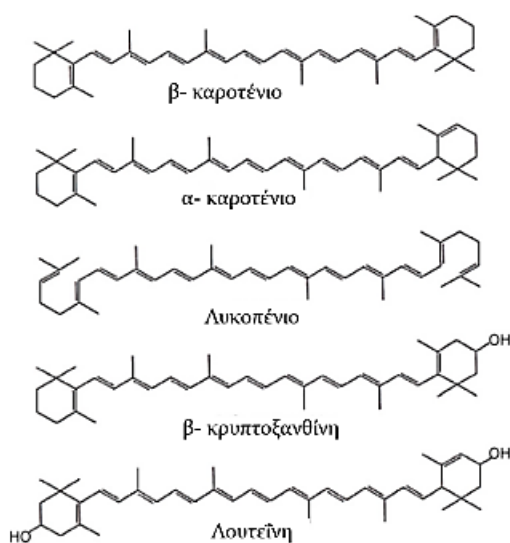
οξειδωση, αναδιάταξη του ανθρακικού σκελετού κ.λπ.. Εναλλακτικά, τερπένια και τερπενοειδή αντιμετωπίζονται στη βιβλιογραφία ως ενιαία ομάδα [1], [4].



Εικόνα 9: Καρβόνη (συστατικό αιθέριων ελαίων)

Καροτενοειδή

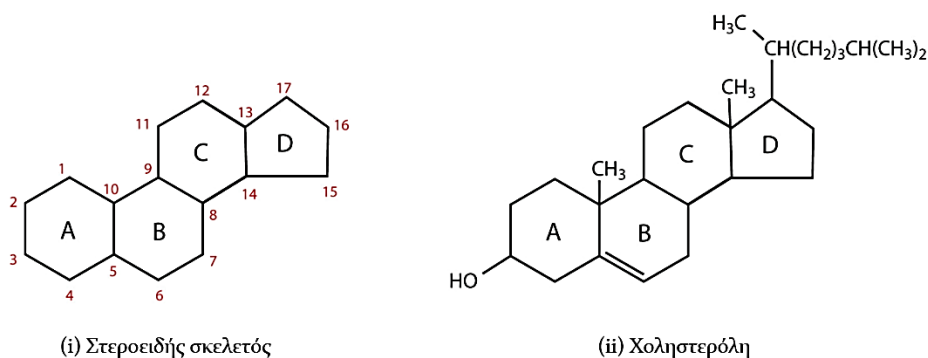
Τα καροτενοειδή (carotenoids) αποτελούν υποκατηγορία των τερπενίων και συνεπώς διαθέτουν δομή πολυισοπρένιου, δηλαδή αποτελούνται από μία μακρά ανθρακική αλυσίδα συζυγών διπλών δεσμών με συμμετρία γύρω από τον κεντρικό διπλό δεσμό. Λόγω των συζυγών διπλών δεσμών δύνανται να δημιουργηθούν *cis*- και *trans*- ισομερή, ενώ μέσω της κυκλοποίησης των ακραίων ομάδων της αλυσίδας ή της παρουσίας οξυγονούχων ομάδων, σχηματίζονται τα διαφορετικά είδη καροτενοειδών. Γενικά, τα καροτενοειδή συνιστούν μια οικογένεια χρωστικών ενώσεων που συντίθενται αποκλειστικά από φυτά και μικροοργανισμούς και συνεπώς τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν τις κύριες πηγές καροτενοειδών στην ανθρώπινη διατροφή. Πιο συγκεκριμένα, τα καροτενοειδή περιέχονται ως μικροσυστατικά στα φρούτα και στα λαχανικά και τους προσδίδουν το κίτρινο, το πορτοκαλί ή το κόκκινο χρώμα τους. Μάλιστα, τα καροτενοειδή εμφανίζουν ευεργετικές ιδιότητες στην πρόληψη ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, του καρκίνου, της οστεοαρθρίτιδας κλπ., δεδομένου ότι αποτελούν σημαντικές διατροφικές πηγές βιταμίνης A και διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σχεδόν το 90% των καροτενοειδών στη διατροφή και το ανθρώπινο σώμα αντιπροσωπεύεται από το β-καροτένιο, το α-καροτένιο, το λυκοπένιο, τη λουτεΐνη και την κρυπτοξανθίνη (Εικόνα 10) [12].



Εικόνα 10: Δομή ορισμένων βασικών διατροφικών καροτενοειδών [12]

1.2.2.3 Στεροειδή

Τα στεροειδή (steroids) είναι πολυκυκλικές οργανικές ενώσεις φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. Χαρακτηρίζονται από τη μοριακή δομή 17 ατόμων άνθρακα διατεταγμένων σε τέσσερις δακτυλίους (τρεις εξαμελείς και ένας πενταμελής). Η δομική μονάδα των στεροειδών ονομάζεται υπερδρο-1,2-κυκλοπεντανοφαινανθρένιο (Εικόνα 11-i). Τα στεροειδή εμφανίζουν ιδιαίτερα σημαντική φυσιολογική δράση και δομική σταθερότητα. Μερικά ευρύτατα διαδεδομένα στεροειδή είναι η χοληστερόλη (Εικόνα 11-ii), η κορτιζόνη, η εργοκαλσιφερόλη και χοληκαλσιφερόλη (σύμπλεγμα βιταμινών D) [1].



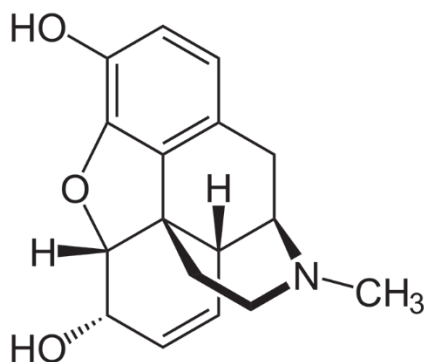
(i) Στεροειδής σκελετός

(ii) Χοληστερόλη

Εικόνα 11: Η δομή του στεροειδούς σκελετού και της χοληστερόλης

1.2.2.4 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή (alkaloids) είναι ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν άζωτο με αρνητικό αριθμό οξείδωσης. Το άζωτο στα αλκαλοειδή μπορεί να ανήκει ή όχι στον δακτύλιο. Το 1804, ο Γερμανός χημικός Friedrich Serturmer απομόνωσε το πρώτο γνωστό αλκαλοειδές, τη μορφίνη από το όπιο (Εικόνα 12), ενώ σήμερα, πάνω από 12.000 αλκαλοειδή έχουν ταυτοποιηθεί. Τα αλκαλοειδή εμφανίζουν χαρακτηριστικές χημικές και φυσιολογικές ιδιότητες, όπως η πολύπλοκη δομή, ο ισχυρά δηλητηριώδης χαρακτήρας και η φαρμακευτική δράση σε μικρές ποσότητες [1].



Εικόνα 12: Η δομή της μορφίνης

Κεφάλαιο 2 Καρπός άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.)

2.1 Ταξινόμια και γεωγραφική εξάπλωση

Το γένος *Rosa* είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα μέλη της οικογένειας Rosaceae και περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη, τα οποία κατανέμονται στις εύκρατες και υποτροπικές ζώνες του βόρειου ημισφαιρίου (Ασία, Ευρώπη, Βόρεια Αμερική) [13]. Το γένος *Rosa* υποδιαιρείται περαιτέρω σε 10 διαφορετικά τμήματα. Ένα από τα μεγαλύτερα είναι το τμήμα *Caninae*, δηλαδή τα κυνόροδα, το οποίο περιλαμβάνει περίπου 50 είδη [14]. Ιδιαίτερα δημοφιλές είδος του *Caninae* συνιστά το *Rosa canina* L. ή κυνόροδο ή άγριο τριαντάφυλλο, το οποίο απαντάται σχεδόν σε ολόκληρη την Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και τη Μικρά Ασία [15].

Η Ελλάδα είναι αρκετά πλούσια σε διάφορα είδη *Rosa spp.*. Μάλιστα, συμπεριλαμβάνει αυτοφυείς άγριους πληθυσμούς από 23 διαφορετικά είδη, δηλαδή σχεδόν τα μισά από τα ευρωπαϊκά είδη *Rosa* που περιλαμβάνονται στο Flora Europaea. Ειδικότερα, το *R. canina* γνωρίζει ευρεία εξάπλωση στην Ελλάδα σε μια ποικιλία οικοτόπων (πλαγιές, κοιλάδες, όχθες ποταμών, αλσύλλια και ανοιχτά δάση κατά μήκος των δρόμων), ενώ φύεται έως τα 1600–1700 m από την επιφάνεια της θάλασσας (περιστασιακά μέχρι τα 2000 m) [16].

2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το είδος *Rosa canina* L. είναι ένας φυλλοβόλος αναρριχώμενος θάμνος με ύψος έως και 4 μέτρα, κυρτά αγκάθια στο βλαστό και πέντε ή επτά οδοντωτά φύλλα ανά μίσχο (Εικόνα 13-i). Η ανθοφορία του φυτού διαρκεί από τον Μάιο έως τον Ιούνιο και τα άνθη του είναι λευκά ή ανοιχτό ροζ (ή σπάνια έντονο ροζ) με πέντε πέταλα. Η διάμετρος των ανθέων κυμαίνεται από τέσσερα έως έξι εκατοστά (Εικόνα 13-ii) [15].

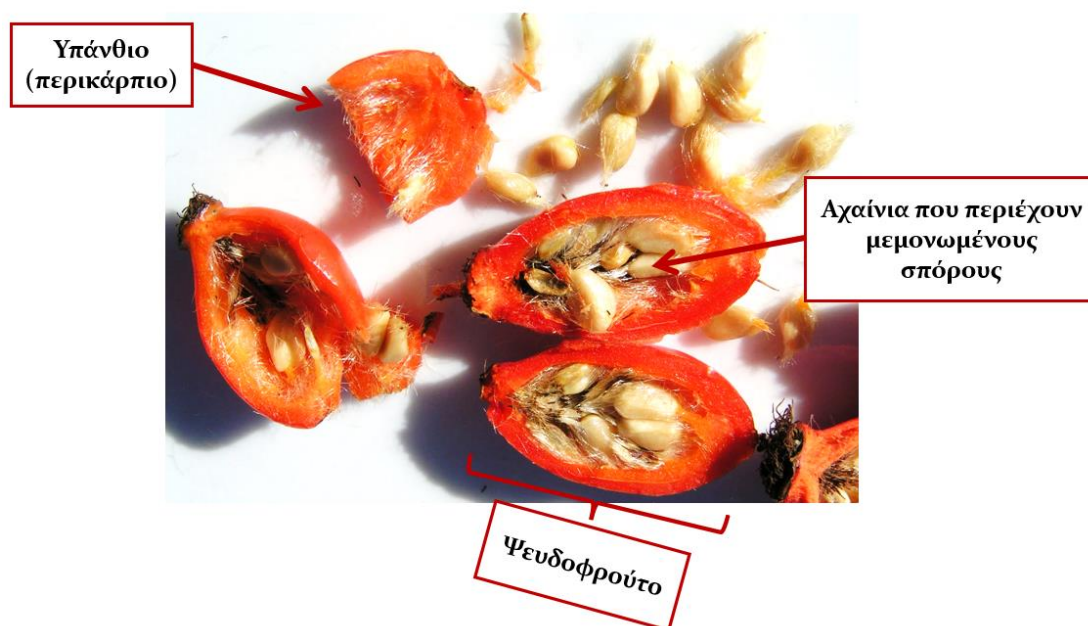


Εικόνα 13: *Rosa canina* L., (i) Συνολική άποψη του φυτού, (ii), άνθος και (iii) καρπός

Οι καρποί (rosehip) του κυνόροδου ωριμάζουν από τον Σεπτέμβριο έως τον Οκτώβριο, ενώ διαθέτουν ελλειψοειδές ή ωοειδές σχήμα και συνήθως

πορτοκαλοκίτρινη απόχρωση (Εικόνα 13-iii) [15]. Γενικά, η απόχρωση των καρπών του γένους *Rosa* κυμαίνεται από κίτρινο-πορτοκαλί έως σκούρο κόκκινο ή και μαύρο, ανάλογα με τη σύσταση σε χρωστικές ενώσεις, όπως τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή ή οι ανθοκυανίνες [17]. Μάλιστα, οι καρποί στο *R. canina* έχει παρατηρηθεί ότι είναι οι πιο επιμήκεις συγκριτικά με τους καρπούς παρόμοιων ειδών [18].

Το κέλυφος του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *R. canina* L., δηλαδή το κόκκινο σαρκώδες περικάρπιο, ονομάζεται υπάνθιο (hypanthium) και στην πραγματικότητα δεν αποτελεί μέρος του βοτανικού καρπού. Οι βοτανικοί καρποί του *R. canina* είναι τα αχάινια, δηλαδή οι λεπτές μεμβράνες που περιβάλλουν τους εσώκλειστους σπόρους στον καρπό. Ο συνολικός καρπός του κυνόροδου ονομάζεται «ψευδοφρούτο» (Εικόνα 14) [19].



Εικόνα 14: Απλοποιημένη βοτανική ανατομία του καρπού *Rosa canina* L. και επισήμανση των δομικών στοιχείων του

2.3 Ιστορική αναδρομή

Το κυνόροδο (*R. canina* L.) εκτιμάται ότι εξελίχθηκε κατά τη διάρκεια της τελευταίας ευρωπαϊκής μεταπαγετώδους περιόδου από ένα διαφορετικό γένος άγρια αναπτυσσόμενου *Rosa* spp. και ένα εξαφανισμένο προγονικό, το «*Protocaninae*». Το φυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά ως φαρμακευτικό φυτό από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23–79 π.Χ.), ο οποίος παρατήρησε τη χρήση του μεταξύ των γαλλικών φυλών για τη θεραπεία των δαγκωμάτων των σκύλων. Μάλιστα, από αυτή την περιγραφή προέκυψε εν συνεχεία το όνομα του είδους (*R. canina*). Επιπλέον, στην Ευρώπη του δωδέκατου αιώνα, γίνεται αναφορά



Εικόνα 15: Βοτανική εικονογράφηση του *Rosa canina* L.

από τη γνωστή Γερμανίδα μοναχή Hildegard of Bingen, η οποία το χρησιμοποιούσε ως ενδυναμωτικό αφέψημα στις θεραπείες της. Το φυτό έγινε ιδιαίτερα δημοφιλές στους ναυτικούς ως μέσο προστασίας από το σκορβούτο, λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης σε βιταμίνη C, και έτσι εξαπλώθηκε σε πολλές ηπείρους. Ακόμη, κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, κυνόροδα έγιναν η βασική πηγή βιταμίνης C στη Βρετανία εξαιτίας διαφόρων περιορισμών στις εμπορικές συναλλαγές εσπεριδοειδών. Τέλος, στη Σκανδιναβία, αποτελούσε παράδοση η αξιοποίηση των κυνόροδων για την παρασκευή μαρμελάδων και σουπών [19]. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η βοτανική απεικόνιση του *Rosa canina* L, η οποία εκτίθεται στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Λονδίνου.

2.4 Σύσταση του καρπού *Rosa canina* L.

Γενικά, το είδος *R. canina* διαθέτει το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις και ανθοκυανίνες, καθώς εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με άλλα είδη [18]. Επιπλέον, ο καρπός του κυνόροδου θεωρείται καλή πηγή βιταμίνης C. Μάλιστα, κατά τη σύγκριση διαφορετικών ειδών άγριου τριαντάφυλλου ως προς την περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, ο καρπός *R. canina* ήταν αυτός με την υψηλότερη συγκέντρωση [20]. Στη συνέχεια, συνοψίζονται οι πιο εξέχουσες ενώσεις ή κατηγορίες ενώσεων, οι οποίες εμφανίζουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία:

Φαινολικές ενώσεις

- Φαινολικά οξέα (πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γαλλικός μεθυλεστέρας, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, χλωρογενικό οξύ)
- Ανθοκυανίνες (κυανιδίνη-3-O γλυκοζίτης)
- Ταννίνες, συμπεριλαμβανομένων των προανθοκυανιδινών (συμπυκνωμένες ταννίνες)
- Φλαβονοειδή, όπως φλαβόνες (απιγενίνη), φλαβονόλες (ρουτίνη, κατεχίνη, κερσετίνη, κερσιτρίνη), φλαβονόνες (εσπεριδίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη), παράγωγα διυδροχάλκονης (φλοριτζίνη)
- Φυτοστερόλες (β-σιτοστερόλη)

Τερπενοειδή

- Πεντακυκλικά τριτερπένια (ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ)

Λοιπά

- Οξέα φρούτων (ασκορβικό, μηλικό, κιτρικό οξύ)
- Λιπαρά οξέα (α-λινολενικό, λινολεϊκό, παλμιτικό οξύ)
- Πηκτίνες και διαιτητικές ίνες
- Καροτενοειδή (λυκοπένιο, β-καροτένιο), τοκοφερόλες
- Γαλακτολιπίδια (GOPO/GLGPG, μονο-γαλακτοζυλο διγλυκερίδιο, δι-γαλακτοζυλο διγλυκερίδιο) [21]

Τέλος, ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου περιέχει πολλά μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως N, P, K, Ca, Mg και Zn [22].

Σύγκριση περιεχομένου σε βιοδραστικές ενώσεις μεταξύ σπόρων και περικαρπίου του καρπού *Rosa canina* L.

Κατά τη σύγκριση δύο προϊόντων άγριου τριαντάφυλλου, ένα προϊόν που περιείχε αποκλειστικά το περικάρπιο (υπάνθιο) του καρπού και ένα προϊόν που περιείχε συνδυασμό του περικαρπίου και των σπόρων του καρπού, προέκυψε ότι η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα στο προϊόν με τους σπόρους ήταν περίπου τέσσερις φορές υψηλότερη σε σχέση με το προϊόν χωρίς τους σπόρους. Ομοίως, η περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ (πολυακόρεστο λιπαρό οξύ) ήταν περίπου επτά φορές υψηλότερη στο προϊόν με σπόρους άγριου τριαντάφυλλου σε σύγκριση με το προϊόν αποκλειστικά από περικάρπιο. Συμπερασματικά, τα λιπαρά οξέα του καρπού εντοπίζονται κυρίως στους σπόρους του. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και β-καροτένιο ήταν σχεδόν ίδια και στα δύο προϊόντα, ενώ οι ποσότητες τριτερπενοειδών, γαλακτολιπιδίων, λυκοπενίου και βιταμίνης E ήταν υψηλότερες στο καθαρό προϊόν περικαρπίου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την κυριαρχία αυτών των συστατικών στο υπάνθιο του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου. Τέλος, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή μετρήθηκε ίδιο τόσο στους σπόρους, όσο και στο περικάρπιο του καρπού. Ωστόσο, η κατανομή των διαφόρων υποομάδων των φλαβονοειδών ενώσεων ήταν διαφορετική στους σπόρους συγκριτικά με την κατανομή στο υπάνθιο [19].

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσοτική και ποιοτική σύσταση σε βιοδραστικές ενώσεις στον καρπό *Rosa canina* L.

Η βιολογική διακύμανση στα φυτοχημικά συστατικά του άγριου τριαντάφυλλου ανάμεσα στα διαφορετικά υποείδη *R. canina* είναι έντονη. Επίσης, η βιοχημική σύνθεση του φυτού και συνεπώς η ποιότητα του παραγόμενου εκχυλίσματος επηρεάζεται και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται η άγρια τριανταφυλλιά, όπως ο αριθμός ωρών με ηλιοφάνεια, το υψόμετρο, η σύσταση του εδάφους, η ποσότητα βροχής κ.λπ., αλλά και από την περίοδο συγκομιδής.

Η σκόνη του κονιοποιημένου άγριου τριαντάφυλλου παρουσιάζει επίσης σημαντικές διαφορές στο χρώμα και την οσμή ανάλογα με τη σύστασή της και τη μέθοδο επεξεργασίας. Ως εκ τούτου, οι σκόνες μπορεί να είναι καφέ καθώς ορισμένες εγκαταστάσεις ξήρανσης χρησιμοποιούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες (έως και 800°C), ή πορτοκαλί για χαμηλότερες θερμοκρασίες επεξεργασίας. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι το χρώμα καθορίζεται και από την αναλογία σπόρων και περικαρπίου [19].

Μερικές φορές, οι καρποί μετά τη συγκομιδή απλώνονται στο έδαφος για να στεγνώσουν στον ήλιο, αλλά αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση από μύκητες. Επιπλέον, μια παρατεταμένη αφυδάτωση σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση κατά 90% της περιεκτικότητας σε βιταμίνη C, πιθανώς λόγω ενζυμικής αποικοδόμησης κατά τη διάρκεια της μακράς έκθεσης σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Οι εμπορικές εταιρείες συνήθως χρησιμοποιούν ξηραντήρια με παροχή ρεύματος θερμού αέρα (hot air dryers), αλλά οι περισσότερες από τις επιθυμητές ενώσεις είναι θερμοευαίσθητες και ευαίσθητες στο οξυγόνο, και επομένως η ξήρανση έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια χρωστικών ουσιών και βιταμινών, καθώς και την υποβάθμιση

των θρεπτικών συστατικών. Οι απώλειες μπορούν να μειωθούν με προσεκτική βελτιστοποίηση του προφίλ θερμοκρασίας (π.χ. έως και 50–65% διατήρηση του ασκορβικού οξέος. Για τη διατήρηση των καροτενοειδών, οι χαμηλές θερμοκρασίες έχουν αναφερθεί ως η πιο αποτελεσματική λύση, πιθανώς επειδή οι ενώσεις αυτές έχουν πολλούς διπλούς δεσμούς και είναι επιρρεπείς στην οξείδωση που ενισχύεται από το φως και την αυξημένη θερμοκρασία. Τέλος, ο παρατεταμένος χρόνος ξήρανσης μπορεί να αποφευχθεί με καλύτερη άλεση της πρώτης ύλης, ενώ βελτιωμένη διατήρηση της βιταμίνης C δύναται να επιτευχθεί με ξήρανση με CO₂, ξήρανση με λυοφιλίωση (freeze-drying) ή ξήρανση σε χαμηλή θερμοκρασία (60°C) υπό πίεση [14].

2.5 Θεραπευτικές Εφαρμογές του καρπού *Rosa canina* L.

Ο καρπός του *R. canina* L., χάρη στην πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων που περιέχει, παρουσιάζει ευεργετικές, θεραπευτικές και καταπραϊντικές ιδιότητες ενάντια σε διάφορα προβλήματα της ανθρώπινης υγείας. Δεν είναι τυχαίο λοιπόν ότι συνιστούσε στοιχείο της παραδοσιακής ιατρικής διαφόρων εθνών ανά τους αιώνες.

Γαστρεντερικό σύστημα

Από ορισμένες μελέτες σε πειραματόζωα έχει προκύψει προστατευτική δράση του καρπού *R. Canina* έναντι στην εμφάνιση έλκους. Τα καροτενοειδή που περιέχονται στον καρπό μπορούν να προστατεύσουν αποτελεσματικά τον γαστρικό βλεννογόνο από τα ελικοβακτηρίδια και τις φλεγμονές [22].

Συκώτι και νεφρό

Από δοκιμές σε πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί ότι το υδροαιθανολικό εκχύλισμα του καρπού *R. canina* θα μπορούσε να αναστείλει την ηπατική βλάβη ακολουθούμενη από ηπατική τοξικότητα. Η ηπατοπροστατευτική δράση του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου φαίνεται να συσχετίζεται με τη μείωση του οξειδωτικού στρες. Επίσης, σε πειραματόζωο (αρουραίος) με νεφρολιθίαση, έχει αναφερθεί ότι το εκχύλισμα κυνόροδου δύναται να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της πέτρας στα νεφρά [22].

Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα

Το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου έχει νευροπροστατευτική δράση ενάντια στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, ενώ έχει ακόμη αναφερθεί και πιθανή δράση κατά του Alzheimer. Τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα του καρπού *R. canina* φαίνεται να οφείλονται στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του. Ωστόσο, για ασφαλέστερα αποτελέσματα αναφορικά με την νευροπροστατευτική δράση απαιτείται περαιτέρω πειραματική διερεύνηση και διεξαγωγή κλινικών δοκιμών [22].

Καρδιά και αρτηρίες

Κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση καρπού από άγριο τριαντάφυλλο μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Το

κυνόροδο είναι πλούσιο σε ασκορβικό οξύ και φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν δράση κατά της παχυσαρκίας, καθώς και αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι ο καρπός *R. Canina* μείωσε τη χοληστερόλη του πλάσματος και εξασθένησε τον σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας σε ένα μοντέλο ποντικού με υπερχοληστερολαιμία. Επιπλέον, έχει αναφερθεί σε κλινικές μελέτες ότι η χορήγηση σκόνης *R. Canina* (40 gr, 6 εβδομάδες) μείωσε τους δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου σε παχύσαρκα μη διαβητικά άτομα [22], [23].

Δέρμα και μαλλιά

Μία σύγχρονη χρήση του άγριου τριαντάφυλλου είναι η εφαρμογή του σε καλλυντικά προϊόντα, όπως κρέμες και σαπούνια. Σε κλινική μελέτη, η τοπική χορήγηση σκόνης σπόρων και περικαρπίου του καρπού *R. canina* είχε σημαντικά αποτελέσματα στη λείανση των ρυτίδων, ενώ επίσης αύξησε την υγρασία και την ελαστικότητα του δέρματος. Σε ορισμένες άλλες κλινικές δοκιμές, το έλαιο σπόρων *R. canina* φαίνεται να απέτρεψε την επιθηλίτιδα μετά από ακτινοθεραπεία και το ερύθημα των χειρουργικών ουλών. Κάποιες άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι προανθοκυανιδίνες από μεθανολικό εκχύλισμα του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου θα μπορούσαν να αποτρέψουν τη μελανογένεση στο δέρμα πειραματόζωων. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ύπαρξη κερσεΐνης στο κυνόροδο, η οποία αναστέλλει τόσο την πρωτεϊνική έκφραση, όσο και την δράση της τυροσινάσης (ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή μελανίνης) [22], [24].

Αρθρώσεις και μύες

Προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει τη δράση κατά της αρθρίτιδας και τις αναλγητικές ιδιότητες του καρπού *R. canina*. Συγκεκριμένα, αυτές οι επιδράσεις παρατηρήθηκαν σε άτομα με οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και χρόνια μυοσκελετικό πόνο [21], [22].

Αντικαρκινικές ιδιότητες

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως φαινόλες, β-καροτένιο, γλουταθειόνη, τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ και ανθοκυανίνες, ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλο έχει έλξει το ενδιαφέρον ως πιθανό αντικαρκινογόνο φυτό. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι το εκχύλισμα *R. canina* εμπόδισε την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών όγκου (καρκίνωμα παχέος εντέρου, μαστού, πνεύμονα, τραχήλου και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), αλλά δεν άσκησε καμία τοξικότητα στην πρωτογενή καλλιέργεια ήπατος χωρίς όγκο [22].

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Είναι ευρέως γνωστό ότι στους ζωντανούς οργανισμούς, οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) παράγονται ενδογενώς υπό φυσιολογικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός και η φλεγμονή. Κάθε ελεύθερη ρίζα περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, γεγονός που την καθιστά πολύ δραστική καθώς χρειάζονται και άλλα ηλεκτρόνια προκειμένου να πληρωθούν τα τροχιακά και να γίνουν πιο σταθερές. Γενικά, απαιτούνται χαμηλά επίπεδα ROS για την εξέλιξη πολλών

βασικών βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Ωστόσο, η υπερβολική ενδοκυτταρική συγκέντρωση ROS μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, μια παθολογική κατάσταση που σχετίζεται με την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες στον άνθρωπο. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ των επιπέδων ROS στον οργανισμό και της ικανότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί τα υγιή κύτταρα του σώματος σε απώλεια της λειτουργίας και της δομής, όπως μετουσίωση των πρωτεϊνών, καταστροφή λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και βλάβη στο DNA [25]–[27].

Βέβαια, ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αρκετούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για να εξουδετερώσει την υπερπαραγωγή και τις βλαβερές επιδράσεις των ROS. Οι αντιοξειδωτικοί προστατευτικοί μηχανισμοί ενεργούν για να διατηρήσουν μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της δέσμευσής τους. Αυτά τα αντιοξειδωτικά είτε παράγονται ενδογενώς, είτε λαμβάνονται μέσω της διατροφής, ειδικά από φυτικές τροφές. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτικών τροφών αποδίδονται κυρίως στις βιταμίνες A, B και C και στις φαινολικές ενώσεις, όπως οι ταννίνες και τα φλαβονοειδή, τα οποία εμφανίζουν δράση κατά των ελεύθερων ριζών, λόγω των φαινολικών υδροξυλίων τους που δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, χηλικοί παράγοντες μεταλλικών ιόντων, ενεργοποιητές αντιοξειδωτικών ενζύμων και αναστολείς οξειδασών [25], [26].

Σε αρκετές *in vitro* μελέτες έχει διαπιστωθεί αντιοξειδωτική δράση του καρπού *R. canina*. Όπως προαναφέρθηκε, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες δεν οφείλονται μόνο στην υψηλή ποσότητα βιταμίνης C, αλλά και στην μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, προανθοκυανιδίνες, φλαβονοειδή, βιταμίνη E και καροτενοειδή. Για παράδειγμα, η ικανότητα του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς στη δέσμευση των υπεροξειδικών ριζών είναι περίπου 87.26 % [22].

Δράση κατά της παχυσαρκίας

In vivo προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η *per os* χορήγηση του καρπού *R. canina* ή των εκχυλισμάτων του εμφανίζει σημαντική ανασταλτική επίδραση στην αύξηση του σωματικού βάρους. Για παράδειγμα, σε τρεις μικρές κλινικές δοκιμές, η σκόνη ή τα εκχυλίσματα *R. canina* αναφέρθηκε ότι μειώνουν το κοιλιακό λίπος καθώς και τον παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου που σχετίζεται με την παχυσαρκία, όπως τα επίπεδα χοληστερόλης στην κυκλοφορία του αίματος. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ο καρπός *R. canina* να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας νέας κατηγορίας φαρμακευτικών προϊόντων κατά της παχυσαρκίας [22], [23].

Αντιφλεγμονώδης δράση

Το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου περιέχει μια σειρά από βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη φλεγμονή. Διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την αντιφλεγμονώδη δράση του *R. canina*, όπως η αναστολή προφλεγμονωδών ενζύμων (π.χ. MMPs και COX-2) και ως εκ τούτου η

μείωση της παραγωγής προφλεγμονωδών. Πιθανότατα τα γαλακτολιπίδια έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιφλεγμονώδη δράση του καρπού *R. canina* [22].

Κοινό κρυολόγημα και εποχική γρίπη

Το κοινό κρυολόγημα και η γρίπη εμφανίζονται πιο συχνά κατά τη χειμερινή περίοδο. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα κλινικών δοκιμών υποδηλώνουν ότι η χορήγηση υγρού παρασκευάσματος *R. canina* μειώνει τη συχνότητα κρυολογήματος κατά 18% και μειώνει την ένταση των διαφορετικών συμπτωμάτων του κρυολογήματος. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην ύπαρξη βιταμίνης C, η οποία συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος [28].

Αντιμικροβιακή δράση

Οι μεταδοτικές ασθένειες έχουν μεγάλο αντίκτυπο στην παγκόσμια υγεία, ενώ ιδιαίτερα ανησυχητικά είναι τα αυξανόμενα ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά. Συνεπώς, η έρευνα της φαρμακευτικής βιομηχανίας έχει στραφεί στην αναζήτηση νέων φαρμάκων με αντιμικροβιακή δράση. Για παράδειγμα, οι φυτικές φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια ενδιαφέρουσα πηγή νέων αντιβιοτικών, ειδικά κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Μερικά από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα αντιβακτηριακά αποτελέσματα που προκαλούνται από φαινολικά περιλαμβάνουν την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, τη στέρηση θρεπτικών ουσιών και την αναστολή εξωκυτταρικών ενζύμων. Η τελλιμαγκρανδίνη I (είδος ελλαγιταννίνης) που περιέχεται στα εκχυλίσματα *R. canina* αναφέρθηκε ότι ενισχύει την επίδραση του αντιβιοτικού οξακιλίνη (β-λακτάμη) έναντι του ανθεκτικού σε πολλά φάρμακα *Staphylococcus aureus*. Αυτό το φυτοχημικό είναι σε θέση να αναστέλλει ένα βακτηριακό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αντοχή στα αντιβιοτικά β-λακτάμης [27].

2.6 Μέθοδοι εκχύλισης του καρπού *Rosa canina L.*

Προκειμένου να ληφθούν τα βιοενεργά συστατικά-στόχοι από τη φυτική μήτρα του *R. canina*, εφαρμόζεται η εκχύλιση ως διεργασία διαχωρισμού. Διαφορετικά είδη διαλυτών χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. φαινολικές ενώσεις), όπως η αιθανόλη (EtOH), η μεθανόλη (MeOH), η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας ή τα υδατικά μείγματα αυτών των διαλυτών [29]. Ωστόσο, για να ληφθεί η μεγαλύτερη ποσότητα ενός επιθυμητού συστατικού, δεν αρκεί μόνο η επιλογή ενός κατάλληλου τύπου διαλύτη, αλλά και η επιλογή της βέλτιστης μεθόδου εκχύλισης. Πέρα από τη χρήση παραδοσιακών και συμβατικών μεθόδων εκχύλισης (π.χ. διαβροχή, εκχύλιση Soxhlet), των οποίων η χρήση αναφέρεται κατά κόρον στη βιβλιογραφία, ολοένα και περισσότερες πειραματικές μελέτες εφαρμόζουν νέες «πράσινες» μεθόδους εκχύλισης, όπως η εκχύλιση με υπερήχους, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση κ.λπ.[30].

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες για την εκχύλιση του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου με διαφορετικά συστήματα διαλυτών. Για παράδειγμα, έχει εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων που εξήχθησαν από διαφορετικά

αποξηραμένα και κονιοποιημένα είδη καρπού με χρήση διαλύτη αιθανόλης [30]. Επίσης, έχει προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε εκχυλίσματα που έχουν προκύψει από κονιοποιημένο καρπό άγριου τριαντάφυλλου με τη βοήθεια διαλύτη αιθανόλης/νερού και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διαβροχής (maceration) [31]. Με τη χρήση του ίδιου συστήματος διαλυτών και της ίδιας μεθόδου έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση συγκεκριμένα του καρπού *R. canina* [32], ενώ άλλοι ερευνητές εξέτασαν το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες και σε ασκορβικό οξύ, καθώς και διερεύνησαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του *R. canina* εφαρμόζοντας τη μέθοδο Soxhlet με διαλύτες n-εξάνιο, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη [26]. Ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή στον καρπό του *R. canina* έχει επίσης πραγματοποιηθεί με διαλύτη μεθανόλης/νερού (60:40) ή με χρήση καθαρής μεθανόλης και ανάδευση για 48 h [16], [25].

Αναφορικά με την παραλαβή του ελαίου του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς, το οποίο εμφανίζει καλλυντικές ιδιότητες και αποτελείται κυρίως από λινολενικό, λινολεϊκό και τρανς-ρετινοϊκό οξύ, η συμβατική διαδικασία εκχύλισης εκτελείται με οργανικούς διαλύτες σε υψηλές θερμοκρασίες λειτουργίας (80°C ή υψηλότερες). Όμως έτσι μειώνεται η περιεκτικότητα σε τρανς-ρετινοϊκό οξύ, γνωστό ως προβιταμίνη Α. Η ψυχρή έκθλιψη (cold mechanical expelling) είναι μια εναλλακτική διαδικασία εκχύλισης ελαίου, αλλά έχει χαμηλή απόδοση, γεγονός που μπορεί να βελτιωθεί με ενζυμική προεπεξεργασία. Στη βιβλιογραφία μελετάται η χρήση ενζύμων στη διαδικασία εκχύλισης ελαίου σε υδατικό περιβάλλον. Τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα που συνήθως χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν ενεργότητες κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και πηκτινασών [33].

Κεφάλαιο 3 Μέθοδοι εκχύλισης

Οι μεταβολίτες των φυτών ή τα βιοενεργά συστατικά ή τα φυτοχημικά αποτελούν ουσίες με βιολογικό ενδιαφέρον, καθώς επιδρούν θετικά στην ανθρώπινη υγεία, αλλά και με οικονομικό ενδιαφέρον, αφού συνιστούν αντικείμενο ολοένα και αυξανόμενης ζήτησης στην παγκόσμια αγορά. Είναι λογικό λοιπόν οι βιομηχανίες, και οι ιδιαίτερα αυτές που δραστηριοποιούνται στον κλάδο των φαρμάκων, των τροφίμων και της κοσμετολογίας, να αναζητούν αποτελεσματικούς και συνάμα οικολογικούς τρόπους εξαγωγής των πολύτιμων βιοδραστικών ενώσεων από τις φυτικές πρώτες ύλες.

Η πιο δημοφιλής διεργασία για την παραλαβή των συγκεκριμένων ουσιών είναι η εκχύλιση (extraction), η οποία συγκαταλέγεται στις φυσικές μεθόδους διαχωρισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των διαλυτών βιοενεργών συστατικών από τη φυτική πρώτη ύλη μέσω της αλληλεπίδρασής της με κάποιον κατάλληλο ρευστό διαλύτη. Συχνά οι τεχνικές εκχύλισης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: η πρώτη ονομάζεται έκπλυση ή εκχύλιση στερεών και χρησιμοποιείται για τη διάλυση διαλυτής ύλης από ένα μίγμα της με αδιάλυτο στερεό, ενώ η δεύτερη κατηγορία ονομάζεται εκχύλιση υγρών και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ενός πολύτιμου προϊόντος από ένα διάλυμα πολλών συστατικών μέσω επαφής με ένα μη αναμίξιμο διαλύτη που έχει συγγένεια με το προϊόν. Η εκχύλιση υγρών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό υγρών με παραπλήσια σημεία ζέσεως, τα οποία είναι δύσκολο να διαχωριστούν με απόσταξη [34].

Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε συμβατικές και μη συμβατικές. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης απαιτούν συνήθως τη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών, μεγάλο χρόνο ανάδευσης και υψηλή θερμοκρασία (π.χ. απόσταξη). Αντίθετα, οι σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης είναι διαδικασίες που μειώνουν τη χρήση τοξικού οργανικού διαλύτη και τον χρόνο εκχύλισης [35].

3.1 Συμβατική εκχύλιση

3.1.1 Εκχύλιση με υδροαπόσταξη

Μία από τις παλαιότερες τεχνικές εκχύλισης που ακόμη χρησιμοποιείται είναι η υδροαπόσταξη (hydrodistillation), η οποία εφαρμόζεται για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων και αιθέριων ελαίων από μέρη φυτών ή υπολείμματα αυτών. Κατά την υδροαπόσταξη προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού στην πρώτη ύλη και το μείγμα θερμαίνεται μέχρι να βράσει. Ωστόσο, μπορεί να εισαχθεί και απευθείας ο ατμός στο δείγμα. Με την ψύξη των ατμών νερού και ελαίου, το μίγμα ατμών συμπυκνώνεται. Το συμπυκνωμένο μείγμα μεταφέρεται από τον συμπυκνωτή σε έναν διαχωριστή, ο οποίος διαχωρίζει αυτόματα το έλαιο και τις βιοδραστικές χημικές ουσίες από το νερό. Η συγκεκριμένη διεργασία προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως η έλλειψη οργανικών διαλυτών, η εξάλειψη της ανάγκης αφυδάτωσης των φυτικών υλικών, ο εύκολος διαχωρισμός κ.λπ.. Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου αφορά στην περίπτωση ευαίσθητων στη θερμότητα φαινολικών

ενώσεων, ενώ μερικές φορές μπορεί να οδηγήσει σε καύση των δειγμάτων. Τέλος, η υδροαπόσταξη έχει υψηλότερο λειτουργικό κόστος, συγκριτικά με άλλες τεχνικές, ενώ απαιτεί συγκριτικά μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης [36].

3.1.2 Εκχύλιση με χρήση διαλυτών

Η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων βασίζεται στη χρήση διαλυτών με διαφορετικές πολικότητες ανάλογα με τη φύση της βιοδραστικής ένωσης - στόχο. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων και των αντίστοιχων διαλυτών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκχύλισή τους [37], [38]. Γενικά, οι λιπόφιλες ενώσεις μπορούν να εκχυλιστούν καλά χρησιμοποιώντας μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, ενώ η ανάκτηση μιας πολικής ένωσης μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με την προσθήκη πολικών διαλυτών, όπως το νερό [39].

Πίνακας 1: Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εκχύλισή τους

Τύπος βιοδραστικής ένωσης	Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων	Κοινώς χρησιμοποιούμενοι διαλύτες
Πολικές οργανικές ενώσεις	Αλκαλοειδή, Σάκχαρα, Αμινοξέα, Πολυυδροξυστεροειδή, Σαπωνίνες, Ταννίνες, Φαινολικές ενώσεις, Φλαβονοειδή	Βουτανόλη, Χλωροφόρμιο, Οξικός αιθυλεστέρας, Ακετόνη, Μεθανόλη, Αιθανόλη, Νερό
Ενώσεις μεσαίας πολικότητας	Πεπτίδια	Διχλωρομεθάνιο, Μεθανόλη, Τετραχλωράνθρακας
Μη πολικές ενώσεις	Τερπενοειδή, Λιπαρά οξέα	Τετραχλωράνθρακας, Εξάνιο

Η εκχύλιση με διαλύτες θα μπορούσε να ακολουθεί την αρχή είτε των εκχυλίσεων "υγρού-υγρού" είτε "στερεού-υγρού". Η εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid-Liquid Extraction, SLE) είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από διαφορετικά είδη φυτών. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση αυτή υπάρχει η πολύ διαδεδομένη εκχύλιση Soxhlet (Soxhlet Extraction, SE). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στερεού-υγρού, μία σειρά από παράλληλα και διαδοχικά στάδια λαμβάνουν χώρα μεταξύ του διαλύματος και του διαλύτη που περιλαμβάνουν:

- I. Μεταφορά του διαλύτη από τον κύριο όγκο του διαλύματος στην επιφάνεια της στερεάς μήτρας
- II. Διείσδυση ή διάχυση του διαλύτη στους πόρους της στερεάς μήτρας
- III. Διαλυτοποίηση των διαλυτών ενώσεων που περιέχονται στη στερεή πρώτη ύλη

- IV. Μεταφορά των διαλυμένων ουσιών και του διαλύτη από το εσωτερικό της στερεάς μήτρας προς την επιφάνειά της
- V. Μετακίνηση της εκχυλισμένης διαλυμένης ουσίας από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού υλικού προς τον κύριο όγκο του διαλύματος

Οποιοδήποτε από αυτά τα φαινόμενα μπορεί να ευθύνεται για τον περιορισμό του ρυθμού εκχύλισης. Ο συνολικός ρυθμός της εκχύλισης καθορίζεται από το στάδιο που έχει τον πιο αργό ρυθμό ή το στάδιο ελέγχου ταχύτητας. Η μεταφορά της διαλυμένης ουσίας στο εσωτερικό των στερεών σωματιδίων συμβαίνει λόγω της βαθμίδας της συγκέντρωσης στη διεπιφάνεια στερεού-υγρού και περιγράφεται μαθηματικά με την εξίσωση της διάχυσης, η οποία βασίζεται στον νόμο του Fick [40].

Συνοψίζοντας, η εκχύλιση με υδροαπόσταξη και οργανικούς διαλύτες εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς. Αρχικά, απαιτείται συνήθως προεπεξεργασία της πρώτης ύλης. Επίσης, από τη χρήση οργανικών διαλυτών αναδύονται διάφορα ζητήματα ασφάλειας, καθώς είναι ιδιαίτερα τοξικοί, αλλά και οικονομικά ζητήματα. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες συνήθως δεν ανακυκλώνονται και ως εκ τούτου αυξάνουν το κόστος της διαδικασίας. Το κόστος της διεργασίας αυξάνεται επίσης με την προσθήκη σταδίων διαχείρισης και επεξεργασίας των επικίνδυνων αποβλήτων. Ακόμη, λόγω της χαμηλής εξειδίκευσης των μεθόδων, μπορεί να προκύψει διακύμανση στην ποιότητα του προϊόντος εξαιτίας εναπομεινάντων ανεπιθύμητων υλικών. Τέλος, συχνά οι συμβατικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις εκχύλισης, ενώ απαιτούνται και μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, με συνέπεια την καταστροφή των θερμοευαίσθητων ενώσεων (π.χ. καροτενοειδή) και την αυξημένη κατανάλωση ενέργειας [39].

3.1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εκχύλισης

Ο ρυθμός εκχύλισης εξαρτάται από την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η πίεση, η θερμοκρασία, η παροχή επαρκούς χρόνου επαφής μεταξύ του διαλύτη και της στερεής πρώτης ύλης, η αναλογία στερεού δείγματος προς υγρό διαλύτη, η γνώση των χαρακτηριστικών της φυτικής ύλης που εκχυλίζεται κ.α.. Στη συνέχεια παρουσιάζεται συνοπτικά η επίδραση ορισμένων σημαντικών παραμέτρων στη διεργασία της εκχύλισης:

Επιλογή κατάλληλου διαλύτη

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή συστήματος διαλυτών για την ανάκτηση βιοενεργών ουσιών από φυτικές πρώτες ύλες εξαρτάται άμεσα από τα χαρακτηριστικά των βιοδραστικών συστατικών που πρόκειται να ανακτηθούν. Κατά την επιλογή των διαλυτών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η διαλυτότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών στο διαλύτη, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη (πολικότητα, χαμηλή τάση, χαμηλό ιξώδες, χημική αδράνεια), η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του, καθώς και το κόστος ή οι πιθανοί κίνδυνοι. Ιδανικά, ο διαλύτης πρέπει να μην είναι τοξικός, διαβρωτικός ή εύφλεκτος, αλλά να είναι αβλαβής για το περιβάλλον και φθηνός [40].

Μέγεθος σωματιδίων

Η απόδοση της εκχύλισης με διαλύτη εξαρτάται άμεσα από τη μορφολογία της πρώτης ύλης. Συχνά ένα από τα στάδια προεπεξεργασίας που απαιτείται είναι η άλεση της πρώτης ύλης, αφού προάγει την αύξηση της επιφάνειας επαφής μεταξύ του διαλύτη και της στερεής ουσίας. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός μεταφοράς της διαλυμένης ουσίας στον κύριο όγκο του υγρού. Ως εκ τούτου, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα της κονιοποίησης, ένα υπερβολικά μικρό μέγεθος κόκκου μπορεί να προκαλέσει συσσωμάτωση και να δημιουργήσει μεγαλύτερη δυσκολία στη διείσδυση του διαλύτη στο υλικό [40].

Υγρασία στερεού υλικού

Η υγρασία της πρώτης ύλης μπορεί να ανταγωνιστεί το διαλύτη εκχύλισης για τη διάλυση της ουσίας-στόχου, επηρεάζοντας τη μεταφορά μάζας. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις, η υγρασία είναι απαραίτητη για να επιτρέψει τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας (π.χ. εκχύλιση του καφέ). Ωστόσο, συνήθως πριν την εκχύλιση το υλικό πρέπει να ξηραίνεται υπό συνθήκες που δεν προκαλούν αποικοδόμηση των συστατικών της πρώτης ύλης. Η πιο δημοφιλής τεχνική ξήρανσης που εφαρμόζεται στις βιομηχανίες είναι η ξήρανση με χρήση θερμού, αλλά εφαρμόζονται και άλλες τεχνικές, όπως η ξήρανση υπό κενό, η λυοφιλίωση, η ξήρανση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες, η ξήρανση με μικροκύματα, η ξήρανση με υπέρθερμο ατμό κ.α. [40].

Θερμοκρασία

Η διαλυτότητα του προς εκχύλιση υλικού και η διάχυσή του αυξάνεται κανονικά με αύξηση της θερμοκρασίας και έτσι βελτιώνεται ο ρυθμός της εκχύλισης. Ωστόσο, στη βιομηχανία τροφίμων, η υψηλότερη θερμοκρασία ενδέχεται να προκαλέσει την αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Επιπλέον, ο διαλύτης πρέπει να παραμένει σε υγρή κατάσταση [40].

Ρυθμός ανάδευσης

Η ανάδευση του διαλύτη είναι κρίσιμης σημασίας, καθώς αυξάνει την τυρβώδη διάχυση και το ρυθμό μεταφοράς των εκχυλιζόμενων συστατικών από την επιφάνεια των σωματιδίων στον κύριο όγκο του διαλύματος [40].

3.1.2.2 Κίνδυνοι χρήσης οργανικών διαλυτών

Οι οργανικοί διαλύτες, δηλαδή οι διαλύτες με βάση τον άνθρακα, ταξινομούνται σε υδρογονάνθρακες (εξάνιο, οκτάνιο, βενζόλιο, τολουόλιο, ακετόνη), αλκοόλες (αιθανόλη, μεθανόλη), αιθέρες (δισοπροπυλοαιθέρας, δισοπροπυλοαιθέρας) και χλωριωμένους διαλύτες (χλωροφόρμιο, τετραχλωράνθρακας). Λόγω της υψηλής πτητικότητας, δηλαδή της υψηλής τάσης ατμών σε θερμοκρασία δωματίου, οι οργανικοί διαλύτες χαρακτηρίζονται και ως πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile

Organic Compounds ή VOCs). Οι VOCs μπορούν εύκολα να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα μέσω της αναπνοής, ενώ συχνά εμφανίζουν διαβρωτικότητα και ευφλεκτότητα.

Η λιπόφιλη φύση των οργανικών διαλυτών προάγει την απορρόφησή τους, αμέσως μετά την εισπνοή, την επιφανειακή δερματική επαφή ή την έκθεση από το στόμα, και μακροπρόθεσμα οδηγεί σε βιοσυσσώρευση στους ιστούς. Επιπλέον, η τοξικότητα των οργανικών διαλυτών επηρεάζει και το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), λόγω της ταχείας ικανότητας εισόδου τους στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, και συνεπώς οι νευροτοξικοί διαλύτες προκαλούν μη αναστρέψιμη εγκεφαλική δυσλειτουργία. Για παράδειγμα, το n-εξάνιο είναι ένα γνωστό χρόνιο νευροτοξικό για τον άνθρωπο. Αναφορικά με τις αλκοόλες, ο συνήθης όρος «τοξική αλκοόλη» αντιπροσωπεύει συνολικά τη μεθανόλη, την αιθυλενογλυκόλη και την ισοπροπυλική αλκοόλη. Ειδικότερα, η μεθανόλη μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές, όπως οξέωση και βλάβες στον αμφιβληστροειδή. Μάλιστα στο ήπαρ, παρουσία του ενζύμου αλκοολικής αφυδρογονάσης, η μεθανόλη μετατρέπεται σε μυρμηκικό οξύ, το οποίο είναι τοξικό. Τέλος, η ακετόνη είναι ένα άχρωμο, πτητικό και εύφλεκτο υγρό. Η ακετόνη ανήκει στους λιγότερο τοξικούς βιομηχανικούς διαλύτες, ωστόσο η έκθεση στους ατμούς της σε υψηλή συγκέντρωση θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς η ακετόνη μπορεί να προκαλέσει προσωρινή νάρκωση και ερεθισμό των ματιών [41].

3.2 Μη συμβατική εκχύλιση

3.2.1 Αρχές της πράσινης εκχύλισης

Ένας γενικός ορισμός της πράσινης χημείας είναι η εφεύρεση, ο σχεδιασμός και η εφαρμογή χημικών προϊόντων και διεργασιών για τη μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης και της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών. Σε σχέση με την πράσινη εκχύλιση φυσικών προϊόντων, αυτός ο ορισμός μπορεί να τροποποιηθεί ως εξής: *«Η πράσινη εκχύλιση βασίζεται στην ανακάλυψη και στο σχεδιασμό διεργασιών εκχύλισης που θα μειώσουν την κατανάλωση ενέργειας, θα επιτρέπουν τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών και ανανεώσιμων φυσικών προϊόντων και θα διασφαλίζουν ασφαλές και υψηλής ποιότητας εκχύλισμα/προϊόν».*

Η λίστα των «έξι αρχών της πράσινης εκχύλισης φυσικών προϊόντων» θα πρέπει να θεωρηθεί για τη βιομηχανία και τους επιστήμονες ως κατεύθυνση για την εδραίωση ενός καινοτόμου και πράσινου χαρακτήρα όχι μόνο στη διεργασία, αλλά και σε όλες τις πτυχές της εκχύλισης στερεού-υγρού:

- Αρχή 1^η: Καινοτομία στην επιλογή φυτικών ποικιλιών και χρήση ανανεώσιμων φυτικών πρώτων υλών
- Αρχή 2^η: Χρήση εναλλακτικών - πράσινων διαλυτών (κυρίως νερό)
- Αρχή 3^η: Μείωση της ενεργειακής κατανάλωσης μέσω ανάκτησης ενέργειας και χρήσης καινοτόμων τεχνολογιών
- Αρχή 4^η: Παραγωγή συμπληρωματικών προϊόντων αντί αποβλήτων για να τα αξιοποιήσει η βιομηχανία βιοδιυλιστηρίων (co-products instead of waste)
- Αρχή 5^η: Μείωση του αριθμού λειτουργικών μονάδων και προτίμηση ασφαλών και ελεγχόμενων διαδικασιών

- Αρχή 6^η: Παραγωγή ενός μη μετουσιωμένου και βιοαποικοδομήσιμου εκχυλίσματος χωρίς προσμίξεις

Οι αρχές αυτές έχουν προσδιοριστεί και περιγραφεί όχι ως κανόνες, αλλά περισσότερο ως καινοτόμα παραδείγματα προς ακολούθηση, τα οποία ανακαλύφθηκαν από επιστήμονες και εφαρμόστηκαν με επιτυχία από τη βιομηχανία [42].

3.2.2 Μέθοδοι μη συμβατικής εκχύλισης

Την τελευταία δεκαετία, οι τεχνικές «πράσινης» εκχύλισης έχουν έλξει την προσοχή δεδομένου ότι ενθαρρύνουν την εξάλειψη τοξικών ουσιών και πτητικών οργανικών διαλυτών. Σημαντικά μειονεκτήματα της συμβατικής εκχύλισης είναι ότι απαιτείται περισσότερος χρόνος για να ολοκληρωθεί η διαδικασία με αποτέλεσμα την καταστροφή θερμοευαίσθητων ενώσεων και την κατανάλωση ενέργειας, ενώ απαιτεί και τη χρήση δαπανηρών και καθαρών διαλυτών που εξατμίζονται γρήγορα. Οι περιορισμοί αυτοί κατέστησαν αναγκαία την ανάπτυξη αρκετών καινοτόμων και μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης:

- Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (Enzyme-Assisted Extraction, EAE)
- Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)
- Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE)
- Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE)
- Εκχύλιση με Παλμικό Ηλεκτρικό Πεδίο (Pulsed-Electric Field extraction, PEF)
- Εκχύλιση με Ρευστό Υπό Πίεση (Pressurized fluid extraction, PFE)
- Εκχύλιση με Νερό σε Υποκρίσιμες Συνθήκες (Subcritical Water Extraction, SWE)
- Εκχύλιση με Πράσινους Διαλύτες (Green Solvents)
 - Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES)
 - Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids, IL's) [35], [36].

Από τις ανωτέρω μεθόδους, η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση, η οποία θα αποτελέσει στη συνέχεια αντικείμενο διεξοδικότερης μελέτης, μπορεί να συζευχθεί με άλλες τεχνικές προκειμένου να ενισχυθεί η απόδοση της εκχύλισης:

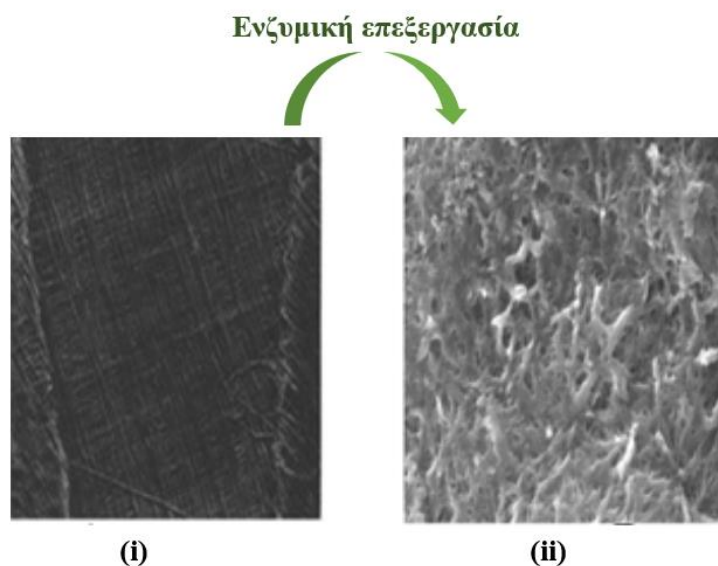
- Ενζυμικά Υποβοηθούμενος Καταμερισμός σε Τρεις Φάσεις (Enzyme-Assisted Three-Phase Partitioning, EATPP)
- Ενζυμική Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted Enzymatic Extraction)
- Ενζυμική Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction)
- Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού Υποβοηθούμενη από Ένζυμα (Enzyme-Assisted Supercritical Fluid Extraction) [39].

Κεφάλαιο 4 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE)

4.1 Γενικά στοιχεία

Αρχή της EYE

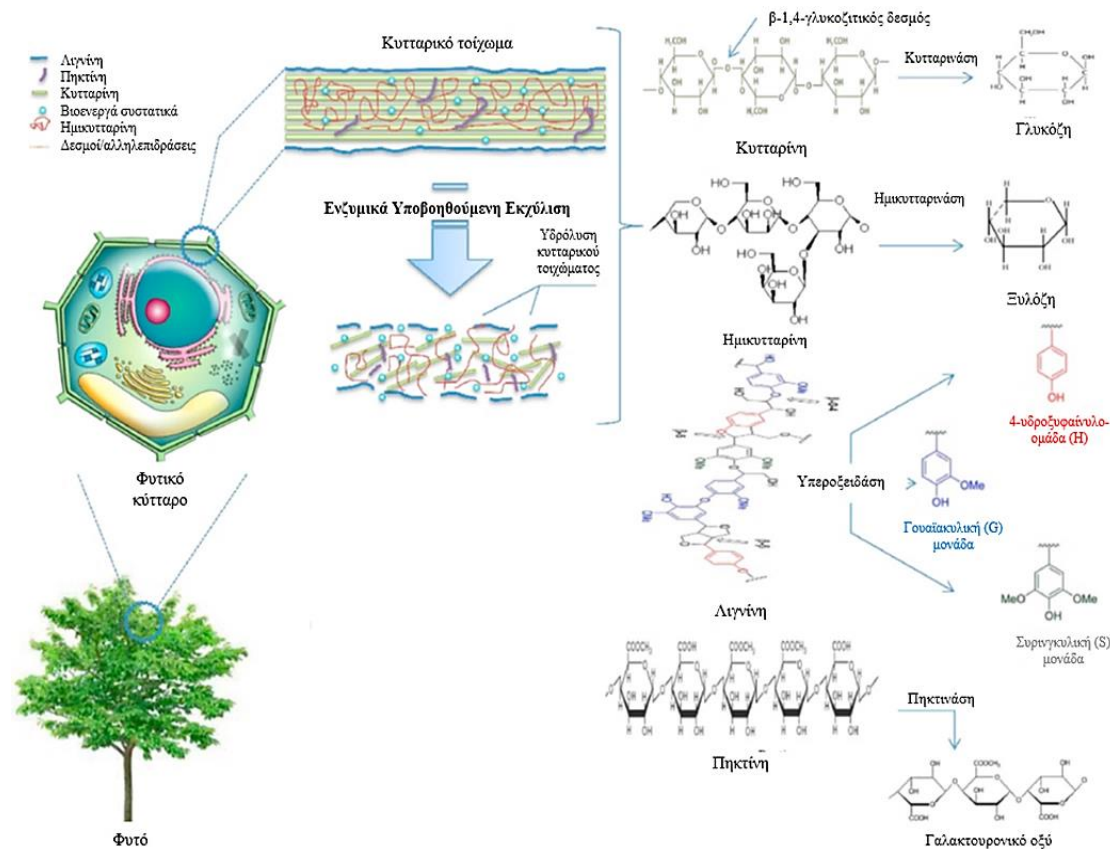
Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες που μπορούν να βοηθήσουν στην εκχύλιση σύνθετων βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης αποικοδομώντας τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες. Κατά συνέπεια, αυξάνουν τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος και έτσι επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων (Εικόνα 16) [43].



Εικόνα 16: Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM): (i) κυτταρικό τοίχωμα φυτού χωρίς επεξεργασία, (ii) κυτταρικό τοίχωμα φυτού που υποβλήθηκε σε ενζυμική επεξεργασία [43]

Ο πιο αποδεκτός μηχανισμός που ακολουθεί οποιαδήποτε ενζυμική εκχύλιση είναι το μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς, το οποίο περιγράφει την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο που προτείνεται από τον Emil Fischer, τα ένζυμα επιδεικνύουν εκλεκτικότητα προς το υπόστρωμα και αυτή η εκλεκτικότητα προκύπτει από τη γεωμετρική συμπληρωματικότητα μεταξύ των ενεργών θέσεων του ενζύμου και του υποστρώματος. Η καταλυτική δράση (π.χ. υδρόλυση) λαμβάνει χώρα σε αυτή τη ενεργή θέση, η οποία τελικά οδηγεί σε διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών. Αυτή η συμπληρωματικότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του φυτικού κυττάρου, και επομένως, απαιτείται επίσης μια λεπτομερής κατανόηση της κυτταρικής δομής της πρώτης ύλης. Λόγω της παρουσίας πολύπλοκων βιομορίων, όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη, οι συμβατικές τεχνικές αποτυγχάνουν να επιτύχουν υψηλό ποσοστό κυτταρικής διάσπασης και, επομένως, υψηλή απόδοση μεταβολιτών. Αντίθετα, τα ένζυμα, λόγω της εκλεκτικότητας και της καταλυτικής τους δράσης, μπορούν να επιτύχουν αυξημένο ρυθμό κυτταρικής διάσπασης και αντίστοιχα

υψηλότερο ρυθμό εκχύλισης [44]. Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 17) παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή της EYE:



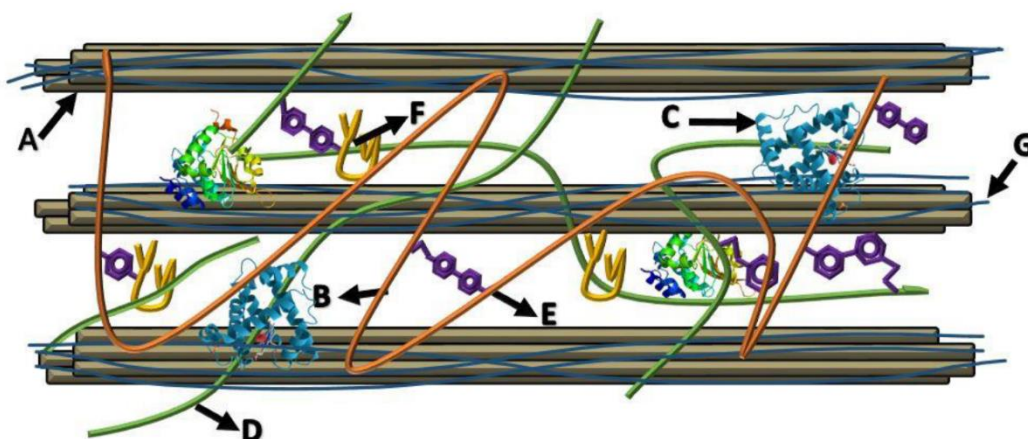
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του κυτταρικού τοιχώματος για την απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων μέσω EYE [45]

Βιοδραστικές ενώσεις στα φυτικά κύτταρα

Τα απλά φαινολικά οξέα και τα флаβονοειδή είναι οι πιο κοινές φαινολικές ενώσεις και εμφανίζονται γενικά σε διαλυτή συζευγμένη (γλυκοζίτες) ή αδιάλυτη μορφή. Στη φύση, τα φαινολικά οξέα εμφανίζονται ως επί το πλείστον σε αδιάλυτες ή δεσμευμένες μορφές, ενώ τα флаβονοειδή υπάρχουν ως γλυκοζίτες συνδεδεμένα με τμήματα σακχάρου μέσω μιας ομάδας OH (O-γλυκοζίτες) ή μέσω δεσμών άνθρακα-άνθρακα (C-γλυκοζίτες). Οι φαινολικές ουσίες στις αδιάλυτες μορφές συνδέονται ομοιοπολικά με τα δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη (π.χ. αραβινοξυλάνες), η λιγνίνη, η πηκτίνη και οι δομικές πρωτεΐνες (Εικόνα 18). Τα φαινολικά οξέα, όπως το υδροξυκιναμικό και το υδροξυβενζοϊκό οξύ, σχηματίζουν αιθερικούς δεσμούς με τη λιγνίνη, μέσω των υδροξυλομάδων τους στον αρωματικό δακτύλιο, και εστερικούς δεσμούς με δομικούς υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, μέσω της καρβοξυλικής τους ομάδας [46]. Οι φαινολικές ενώσεις που δε συνδέονται με το κυτταρικό τοίχωμα μπορούν να εντοπιστούν μέσα στο κυτοσόλιο, μέσα στα κυτταρικά χυμοτόπια ή στον κυτταρικό πυρήνα [47].

Σε πολυάριθμους *in vitro* αντιοξειδωτικούς προσδιορισμούς που πραγματοποιήθηκαν, τα αδιάλυτα δεσμευμένα φαινολικά έχουν δείξει σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα ελεύθερα και διαλυτά

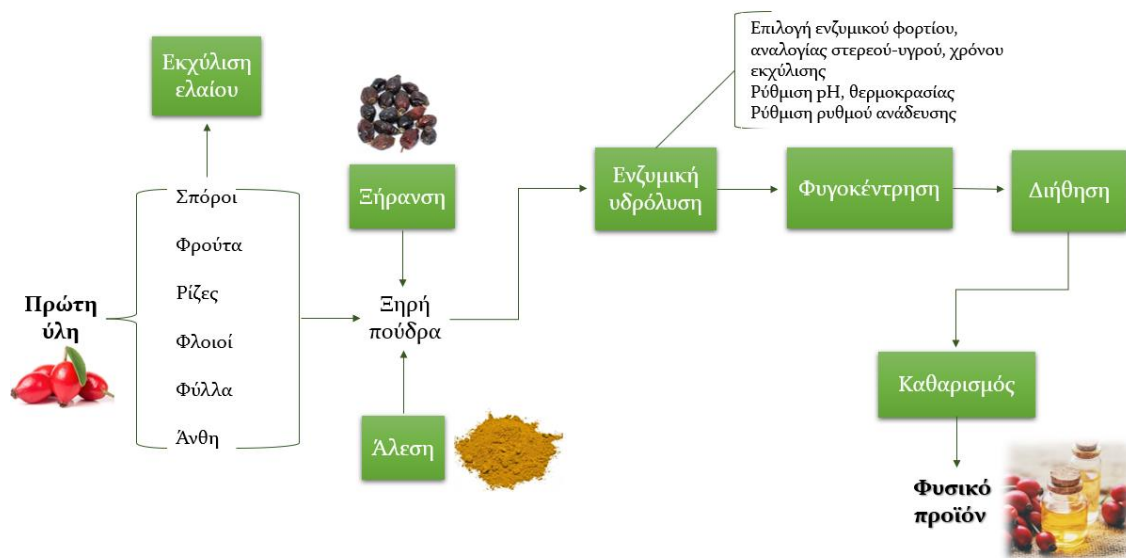
συζευγμένα φαινολικά [46]. Ωστόσο, στη συμβατική εκχύλιση με διαλύτες, μπορούν να ληφθούν μόνο οι πιο προσιτές φαινόλες, δηλαδή αυτές σε διαλυτή μορφή. Όμως, τα ένζυμα μπορούν να βελτιώσουν την εκχύλιση των φαινολών μέσω υδρολυτικής αποικοδόμησης των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος [47]. Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις σε μορφή γλυκοζίτη, η β-γλυκοσιδάση έχει την ικανότητα να σπάει τους β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και συνεπώς να απελευθερώνει τις βιοδραστικές ουσίες [48].



Εικόνα 18: Γραφική απεικόνιση φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, που περιγράφει τις διασυνδεδεμένες φαινολικές ενώσεις, τα πεπτίδια και το δίκτυο πολυσακχαριτών. A: κυτταρίνη από μικροϊνίδια κυτταρίνης, B: ημικυτταρίνες αποτελούμενες από ξυλογλυκάνες, γλυκουρονοαραβινοξυλάνη, (1-3) (1-4)β-γλυκάνες και γλυκομαννάνη, C: δομικές πρωτεΐνες, D: πηκτίνη αποτελούμενη από ομογαλακτουρόνη, ξυλογαλακτουρονάνη και ραμνογαλακτουρονάνες I και II, E: φαινολικές ενώσεις, F: λιγνίνη; G: επίστρωση ξυλάνης και μαννάνης στα μικροϊνίδια κυτταρίνης [49].

Βασικά στάδια EYE

Η EYE περιλαμβάνει τα εξής κύρια βήματα: (I) επιλογή της κατάλληλης πρώτης ύλης, (II) προεπεξεργασία πρώτης ύλης, όπως πλύση, ξήρανση, μείωση κοκκομετρίας με άλεση ώστε να προκύψει ομογενής πούδρα, (III) επιλογή της αναλογίας στερεού-υγρού, προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος με το βέλτιστο pH, ρύθμιση της θερμοκρασίας και του ρυθμού ανάδευσης. (IV) προσθήκη κατάλληλου ενζυμικού φορτίου και επώαση, (V) αδρανοποίηση ενζύμου, ώστε να διακοπεί η εκχύλιση με το πέρας του επιθυμητού χρόνου εκχύλισης (π.χ. με τη μείωση της θερμοκρασίας), (VI) φυγοκέντρωση και/ή διήθηση, ώστε να συλλεχθεί η υδατική φάση του εκχυλίσματος, (VII) περαιτέρω επεξεργασίες καθαρισμού ανάλογα με τις απαιτήσεις του τελικού προϊόντος σε καθαρότητα [35]. Στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 1) απεικονίζονται σχηματικά τα στάδια της EYE [43].



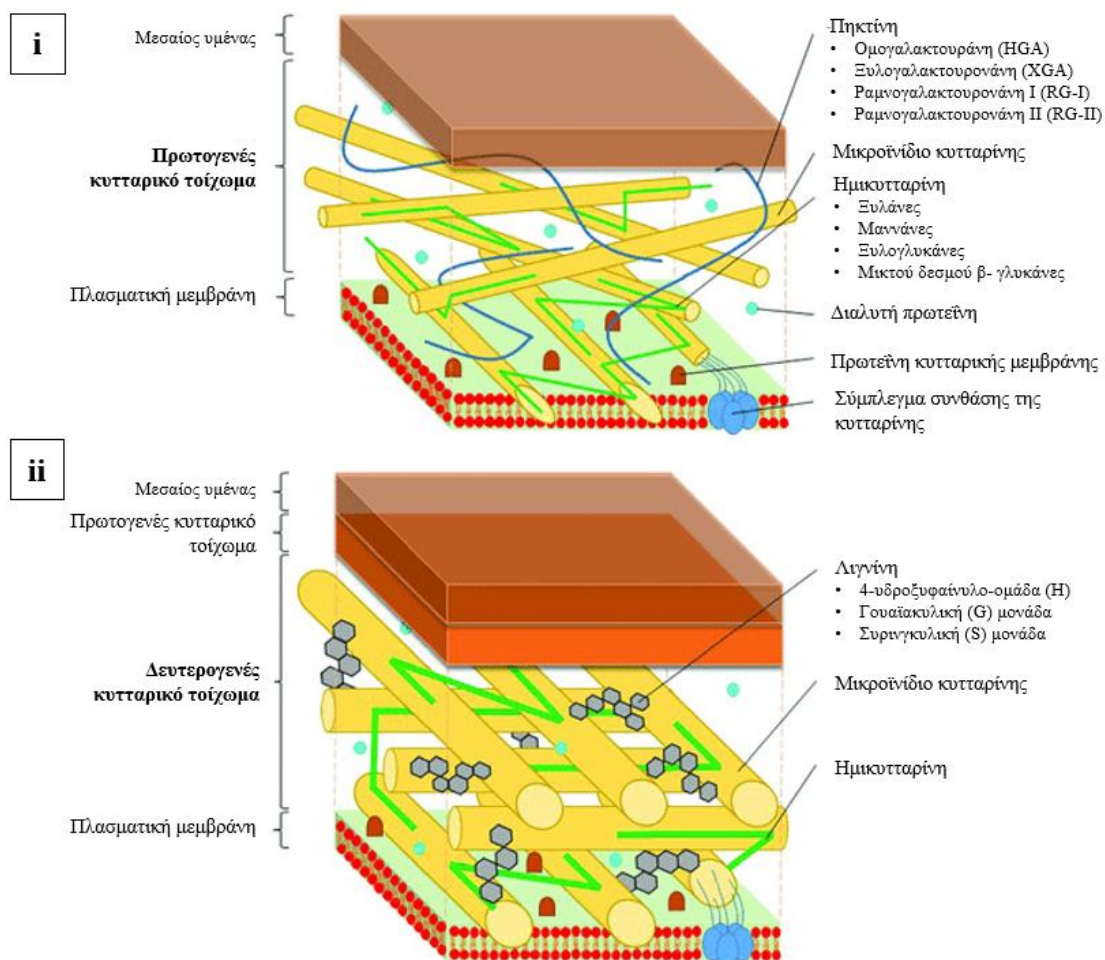
Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής της γενικής διεργασίας της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (EYE) για την παραγωγή φυσικών προϊόντων

Πλεονεκτήματα EYE

Το κεντρικό πλεονέκτημα της EYE είναι ο οικολογικός της χαρακτήρας, καθώς συνιστά μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία, η οποία αξιοποιεί το νερό ως διαλύτη. Το νερό είναι ο ασφαλέστερος, αλλά και ο πιο άφθονος και οικονομικός διαλύτης. Αντίθετα, οι οργανικοί διαλύτες των συμβατικών εκχυλίσεων, όπως αναφέρθηκε, είναι τοξικοί, εύφλεκτοι και ανήκουν στις VOCs. Επιπλέον, τα ένζυμα δρουν σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, οπότε και η EYE λειτουργεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και σε ατμοσφαιρική πίεση. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε σημαντική μείωση του λειτουργικού ενεργειακού κόστους, αλλά και καθιστά τη διεργασία ασφαλέστερη. Μάλιστα, ένα ακόμη βασικό πλεονέκτημα των ήπιων συνθηκών αφορά στην υψηλή ποιότητα των τελικών προϊόντων, αφού έτσι δεν καταστρέφονται οι θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες (καροτενοειδή, βιταμίνη C) που συχνά περιέχονται στο εκχύλισμα. Ακόμη, η απόδοση της διεργασίας είναι αυξημένη, διότι τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Αυτό οδηγεί στη μείωση του χρόνου εκχύλισης, αλλά και στον περιορισμό των σταδίων της διεργασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνται λιγότερα στάδια διαχωρισμού, γιατί δε χρειάζεται να απομακρυνθεί κάποιος επικίνδυνος οργανικός διαλύτης. Με βάση τη νομοθεσία, τα προϊόντα που προέρχονται από ενζυμικές διεργασίες κατατάσσονται στα φυσικά προϊόντα. Μάλιστα, στην περίπτωση της εκχύλισης κάποιου ελαίου, δεδομένου ότι η EYE πραγματοποιείται στην υδατική φάση, αυτό μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί λόγω της μη αναμιξιμότητας. Τέλος, η EYE δεν απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό και συνεπώς μειώνεται και το κόστος κεφαλαίου, ενώ δίνει τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν όλα τα τμήματα του φυτού (π.χ. υδρόλυση υπολειμμάτων φυτικών πρώτων υλών) [44], [50], [51].

4.2 Κυτταρικό τοίχωμα

Τα περισσότερα νεοσχηματισμένα κύτταρα ενός πολυκύτταρου φυτού αρχικά κατασκευάζουν ένα σχετικά λεπτό πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα (primary cell wall) ικανό να εκτείνεται αργά έτσι ώστε να επιτρέπει την κυτταρική αύξηση (Εικόνα 19-i). Μόλις σταματήσει η αύξηση, η επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος δεν είναι πλέον απαραίτητη. Τότε, συχνά παράγεται ένα πιο άκαμπτο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα (secondary cell wall), είτε μ' εναπόθεση νέων στιβάδων με διαφορετική σύσταση, κάτω από τις παλαιές στιβάδες (Εικόνα 19-ii). Όταν εξειδικεύονται τα φυτικά κύτταρα, γενικά παράγουν ειδικά προσαρμοσμένους τύπους τοιχωμάτων, π.χ. κηρώδη, παχιά, ξυλώδη, αδιάβροχα, σκληρά τοιχώματα [52].



Εικόνα 19: Δομή και σύνθεση του (i) πρωτογενούς και (ii) δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτών [53]

Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα δομείται από τέσσερις τύπους πολυμερών που διατάσσονται μεταξύ τους [51].

4.2.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνιστά ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Λόγω του δεσμού αυτού, ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη αποτελεί την επαναλαμβάσιμη δομική μονάδα της αλυσίδας της κυτταρίνης, της οποίας ο βαθμός πολυμερισμού έχει εύρος από 7000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20 nm και μήκος 100 - 40000 nm, ενώ το καθένα περιέχει μέχρι 36 παράλληλες αλυσίδες κυτταρίνης. Γενικά, η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές λόγω των δεσμών υδρογόνου μεταξύ μορίων γλυκόζης της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης, καθώς μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες. Ωστόσο, ένα μέρος της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών [54].

4.2.2 Ημικυτταρίνες

Οι ημικυτταρίνες είναι ένα πολύπλοκο μείγμα ετερογενών υδατανθράκων και ενώσεων προερχόμενων από υδατάνθρακες, τα οποία σχηματίζουν ένα διακλαδισμένο δίκτυο. Περιέχει εξόζες (D-γλυκόζη, D-μαννόζη, D-γαλακτόζη), πεντόζες (L-αραβινόζη, D-ξυλόζη), μεθυλιωμένα παράγωγα (L-ραμνόζη, L-φουκόζη) και οξέα (ουρονικό, οξικό). Οι ημικυτταρίνες είναι άμορφες (μη κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (150-300), είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα. Η κατηγοριοποίηση των ημικυτταρινών συνήθως γίνεται με βάση το κυριότερο μονομερές σάκχαρο. Έτσι, οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γλυκάνες, μαννάνες, αραβινάνες, γαλακτάνες και ξυλάνες. Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Οι ξυλάνες ουσιαστικά λειτουργούν ως συνδετικός ιστός ανάμεσα στην κυτταρίνη και τη λιγνίνη, ώστε να εξασφαλιστεί η συνεκτικότητα και η ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η ξυλάνη αποτελείται από μια υποκατεστημένη κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης ενωμένων μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς [51], [54].

4.2.3 Πηκτίνη

Η πηκτίνη είναι ένας διακλαδισμένος όξινος α-(1,4)-πολυσακχαρίτης που αποτελείται κυρίως από D-γαλακτουρονικό οξύ και από διάφορες αναλογίες άλλων σακχάρων, όπως η L-ραμνόζη, η L-αραβινόζη, η D-γαλακτόζη και η D-ξυλόζη. Τα διαφορετικά πηκτινικά τμήματα, δηλαδή η ομογαλακτουρονάνη, η ξυλογαλακτουρονάνη, η ραμνογαλακτουρονάνη I και η ραμνογαλακτουρονάνη II, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα μεταξύ τους [55]. Όταν συνδέεται με την κυτταρίνη, η πηκτίνη παρέχει ακαμψία και συνοχή στα κυτταρικά τοιχώματα [50].

4.2.4 Γλυκοπρωτεΐνες

Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι πολυπεπίδια που περιέχουν υδροξυπρολίνη και ονομάζονται HRGP (Hydroxyproline-Rich GlycoProtein). Τα μόρια αυτά εμφανίζουν πολλές ιδιαιτερότητες. Αρχικά, διαθέτουν πολυάριθμα αμινοξέα που φέρουν υδροξυλομάδες (υδροξυπρολίνη, σερίνη, τυροσίνη), καθώς επίσης και επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές ακολουθίες (ser hyp hyp hyp hyp). Ειδικότερα, οι πεπτιδικές αλληλουχίες που περιέχουν τυροσίνη, επιτρέπουν το σχηματισμό δεσμών διφαινόλης με ημικυτταρίνες ή πηκτίνες. Τέλος, τα σάκχαρα που συνδέονται με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (γαλακτόζη και αραβινόζη) εμπλέκονται στη δημιουργία δεσμών με πολυπεπίδια για το σχηματισμό συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων [51].

Το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από περίπου 45% (w/w ξ.β.) κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και ένα μικρό μέρος πηκτινικών ενώσεων. Ωστόσο, τα περισσότερα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα αποτελούνται επίσης από λιγνίνη (έως και 35% w/w ξ.β.) [51].

4.2.5 Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας. Η παρουσία της στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη. Αποτελεί ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο πολυμερές με βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο, ενώ είναι άμορφη με πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού (100.000-300.000). Οι δεσμοί στη λιγνίνη είναι αιθερικοί, καθώς και δεσμοί άνθρακα-άνθρακα. Επιπλέον, η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς με τις ημικυτταρίνες και την κυτταρίνη. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι είναι έντονα υδρόφοβη και αδιάλυτη στο νερό, καθώς και ότι προσδίδει στο φυτό υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση [54].

4.3 Ένζυμα που υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα

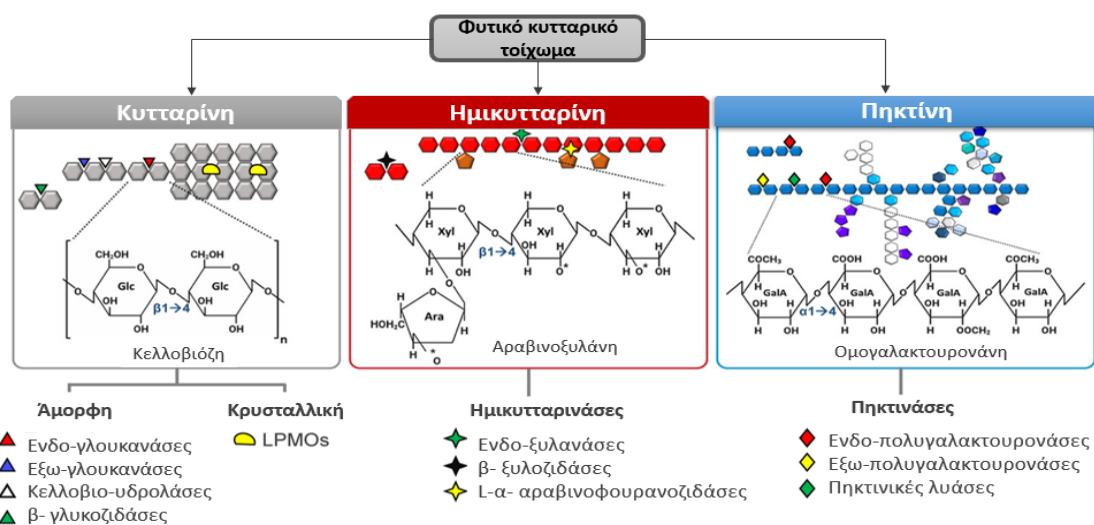
Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, που δρουν ως καταλύτες. Έχει αποδειχθεί ότι κάποια μόρια RNA έχουν επίσης καταλυτική δράση (ριβοένζυμα), αλλά η πλειονότητα των καταλυτικών αντιδράσεων καταλύεται από πρωτεΐνες. Οι βιοκαταλύτες αυτοί δεν συμμετέχουν στα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύουν και συνεπώς η ποσότητά τους παραμένει σταθερή. Μάλιστα, το ίδιο μόριο ενζύμου μπορεί να καταλύσει την ενζυμική μετατροπή χιλιάδων νέων μορίων υποστρώματος σε προϊόν.

Τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης (E_a), χωρίς όμως να μεταβάλλουν τις άλλες παραμέτρους της καταλύμενης αντίδρασης, όπως τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG) ή τη σταθερά ισορροπίας. Επιπλέον, καταλύουν τη βιοχημική αντίδραση με μεγάλη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, ενώ αυξάνουν την ταχύτητα της αντίδρασης από ένα εκατομμύριο (10^6) έως και ένα τρισεκατομμύριο (10^{12}) φορές.

Τα ένζυμα ταξινομούνται στις εξής βασικές κατηγορίες: οξειδοαναγωγάσες (EC.1), τρανσφεράσες (EC.2), υδρολάσες (EC.3), λυάσες (EC.4), ισομεράσες (EC.5) και λιγάσες (EC.6) [56].

Ειδικότερα, οι υδρολάσες καταλύουν την υδρόλυση δεσμών (πχ. γλυκοζιτικών δεσμών) και χρησιμοποιούνται στην ΕΥΕ φυσικών προϊόντων από φυτά. Δεδομένου ότι τα ένζυμα καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις και δρουν σε συγκεκριμένα υποστρώματα, στο πλαίσιο της ΕΥΕ, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη σύνθεση της πρώτης ύλης, προκειμένου να καθοριστούν τα καταλληλότερα ένζυμα για την εκτέλεση της εκχύλισης [51].

Τέσσερις οικογένειες ενζύμων χρησιμοποιούνται συνήθως για την υδρόλυση των φυτικών πρώτων υλών: οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες, οι πηκτινάσες και οι πρωτεάσες. Όλες έχουν την ικανότητα να διασπούν μέρος των συστατικών των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων (Εικόνα 51) [51].



Εικόνα 20: Η δράση των κυτταρινασών, ημικυτταρινασών και πηκτινασών για την υδρόλυση των αντίστοιχων πολυσακχαριτών με στόχο την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος [55]

4.3.1 Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες, μια οικογένεια ενζύμων με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, καταλύουν τη διάσπαση της κυτταρίνης [50]. Αν και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ακόμη πλήρως εδραιωθεί, μια κοινώς αποδεκτή θεωρία επιβεβαιώνει ότι η υδρολυτική τους δράση είναι στην πραγματικότητα ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα που προκύπτει από τρεις διαφορετικούς τύπους ενζύμων [57].

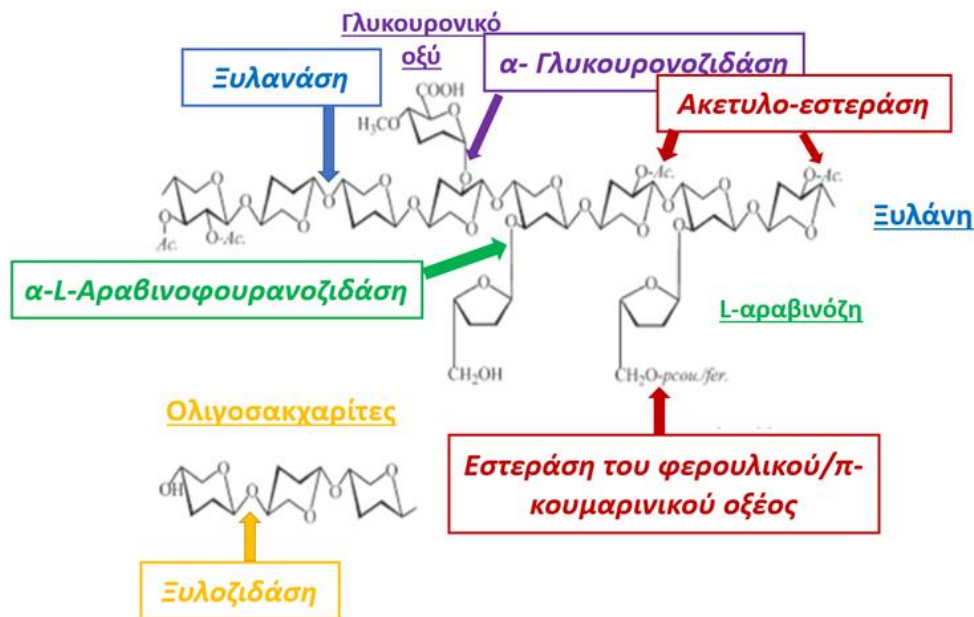
- Οι "ένδο-1,4-β-γλουκανάσες" (EC 3.2.1.4), οι οποίες υδρολύουν τυχαία εσωτερικούς 1,4-β-D-γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης.
- Οι "έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες" (EC 3.2.1.74) που απελευθερώνουν μόρια κελλοβιόζης από τα άκρα της κυτταρίνης.
- Οι "β-γλυκοζιδάσες" (EC 3.2.1.21) οι οποίες δρουν απελευθερώνοντας D-γλυκόζη από την κελλοβιόζη.

Κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς υδρόλυσης (στερεά φάση), οι ενδο και οι εξωγλουκανάσες αποπολυμερίζουν το υπόστρωμα μέχρι να γίνει διαλυτό (βαθμός πολυμερισμού 6). Ειδικότερα, η ενδογλουκανάση δρα τυχαία στις άμορφες περιοχές της κυτταρινικής αλυσίδας, δημιουργώντας νέα «ελεύθερα άκρα», όπου μπορεί να δράσει η εξωγλουκανάση, απελευθερώνοντας μόρια κελλοβιόζης. Η δευτερογενής υδρόλυση, η οποία λαμβάνει χώρα στην υγρή φάση, συνεπάγεται ουσιαστικά την υδρόλυση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη από β-γλυκοσιδάσες. Η δράση της β-γλυκοζιδάσης είναι πολύ σημαντική, καθώς η κελλοβιόζη είναι πολύ ισχυρότερος παρεμποδιστής της εξωγλουκανάσης από την γλυκόζη [51], [54].

Πολύ συχνά συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες χρησιμοποιείται μια οικογένεια κυτταρολυτικών οξειδασών, που ονομάζονται λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMOs). Οι LPMOs χαρακτηρίζονται από μια ευρύτερη εκλεκτικότητα υποστρώματος σε σχέση με τις κυτταρινάσες, καθώς μπορούν επίσης να προσβάλλουν την κρυσταλλική περιοχή της κυτταρίνης, δηλαδή καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση της κρυσταλλικής κυτταρίνης. Η συνεργιστική δράση των LPMOs και των κυτταρινασών χρησιμοποιείται επί του παρόντος εμπορικά για την αύξηση των αποδόσεων σε σάκχαρα στην υδρόλυση της λιγνοκυτταρίνης. [58].

4.3.2 Ημικυτταρινάσες

Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση των ημικυτταρινών και κατ' επέκταση των ξυλανών, απαιτεί μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων τα οποία δρουν συνεργιστικά, όπως συμβαίνει και για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Η μεγαλύτερη ποικιλία ενζυμικών ενεργοτήτων οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία ημικυτταρινών. Οι ημικυτταρίνες δομούνται από πολυάριθμους ολιγοσακχαρίτες, και κατά συνέπεια σχηματίζεται ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών δεσμών. Γενικά, τα ένζυμα είναι εκλεκτικά για έναν τύπο δεσμού. Στην Εικόνα 21 απεικονίζεται το ξυλανολυτικό σύστημα το οποίο είναι αναγκαίο για την πλήρη αποικοδόμηση της ξυλάνης.



Εικόνα 21: Ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης [54]

Συνήθως, οι ημικυτταρινάσες προτιμώνται ως συστατικά ενζυμικών μιγμάτων του εμπορίου, μαζί με τις κυτταρινάσες, επιτρέποντας έτσι την πλήρη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων με οικονομικά συμφέροντα τρόπο [51].

4.3.3 Πηκτινάσες

Η βιοαποικοδόμηση των πηκτινών πραγματοποιείται χάρη στις πηκτινάσες και συγκεκριμένα στις ενδοπολυγαλακτουρονάσες, οι οποίες δρουν μόνο σε όζινες μονάδες (μη εστεροποιημένες). Οι εστεροποιημένες μονάδες αποικοδομούνται από εστεράσες μεθυλοπηκτινής, οι οποίες επιτρέπουν την προσαρμογή του υποστρώματος ώστε να αντιδρά με το προηγούμενο ένζυμο. Στην περίπτωση των πολύ-μεθυλιωμένων πηκτινών, μόνο οι λύασες της πηκτινής από βακτηριακή προέλευση (που δεν ανιχνεύονται στα φυτά) είναι ικανές να τις υδρολύσουν. Επομένως, όπως στις ημικυτταρίνες και στην κυτταρίνη, η πλήρης υδρόλυση των πηκτινών απαιτεί τη συνεργική δράση πολλών πηκτινασών.

Οι πηκτινάσες ήταν τα πρώτα ένζυμα, τα οποία ήταν εμπορικά διαθέσιμα τη δεκαετία του 1930 για τη χρήση τους στην παραγωγή κρασιού και χυμών φρούτων. Όταν η δομή των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων αποσαφηνίστηκε τη δεκαετία του 1960, οι επιστήμονες ήταν σε θέση να συνθέσουν καταλληλότερα μείγματα ενζύμων για βιομηχανικές εφαρμογές [51]. Σήμερα, οι πηκτινάσες εξακολουθούν να αξιοποιούνται στη βιομηχανία χυμού φρούτων για τη συνολική τους αποτελεσματικότητα: αύξηση στις αποδόσεις χυμού, διευκόλυνση φιλτραρίσματος, μείωση ιξώδους και βελτίωση της διαύγειας του χυμού. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την εκχύλιση πολυφαινόλων, ειδικά για την απελευθέρωση ανθοκυανινών από τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους. Άλλες τρέχουσες εφαρμογές περιλαμβάνουν την κλωστοϋφαντουργία, αλλά και τις βιομηχανίες βιοτεχνολογίας [50].

4.3.4 Πρωτεάσες

Η πρωτεάση μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών στο εσωτερικό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση μικρότερων τμημάτων πρωτεΐνης ή πεπτιδίων [47].

Τα τρία προαναφερόμενα ένζυμα (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ή μαζί σε ενζυμικό σκεύασμα προκειμένου να αξιοποιηθεί η συνεργιστική δράση τους για την αποικοδόμηση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Ωστόσο, οι πρωτεάσες πρέπει να δρουν χωριστά για τρεις κύριους λόγους. Είναι ικανές να υδρολύουν τις ενζυμικές πρωτεΐνες και έτσι να μειώνουν δραστικά τις ενεργότητες του υδρολυτικού μείγματος ενζύμων. Επιπλέον, εάν η εκχύλιση χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ελαίου, τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από τη δράση της πρωτεάσης θα σταθεροποιήσουν σε μεγάλο βαθμό τα παραγόμενα γαλακτώματα. Τέλος, εάν ο στόχος είναι η εκχύλιση πρωτεϊνών, οι πρωτεάσες πρέπει να αποφευχθούν για να διατηρηθεί η φυσική τους δομή [51].

4.4 Παράμετροι που επηρεάζουν την EYE

Τυπικά, η ενζυμική υδρόλυση εξαρτάται από παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος, ο όγκος του διαλύτη, η κοκκομετρία της πρώτης ύλης, ο χρόνος εκχύλισης κ.λπ.. Καθένας από αυτούς τους παράγοντες έχει άμεσο αντίκτυπο στην αντίδραση υδρόλυσης, και ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να βρεθεί ένα βέλτιστο σημείο για κάθε έναν από αυτούς τους παράγοντες, αλλά και να διερευνηθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

4.4.1 Είδος ενζυμικού σκευάσματος

Η σύσταση ενός μείγματος ενζύμων συνιστά βασικό παράγοντα στην EYE. Ειδικότερα, η φύση των ενεργοτήτων του ενζυμικού σκευάσματος και οι σχετικές αναλογίες τους καθορίζουν εν συνόλω ή εν μέρει την απόδοση της διεργασίας εκχύλισης. Όπως εξηγήθηκε, για να κατακερματιστεί πλήρως το κυτταρικό τοίχωμα, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές και συμπληρωματικές ενζυμικές ενεργότητες (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες κ.λπ.). Όταν λοιπόν οι ενζυμικές ενεργότητες είναι πολυάριθμες, οι αποδόσεις εκχύλισης είναι καλύτερες, αφού τα αποτελέσματα της δράσης ενός ενζύμου θα προάγουν την απελευθέρωση ενός ευνοϊκού υποστρώματος σε μια άλλη οικογένεια ενζύμων [51]. Για παράδειγμα, σε πειραματικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη ημικυτταρινάσης, η κυτταρίνη έγινε καλύτερα προσβάσιμη στην κυτταρινάση, δεδομένου ότι διασπάστηκε το φυσικό φράγμα της ημικυτταρίνης και αυξήθηκε έτσι η απελευθέρωση ελαίου από τα φύλλα θυμαριού (*Thymus capitatus L.*) [59].

Ωστόσο, το βέλτιστο ενζυμικό μείγμα πρέπει να προσαρμόζεται κατάλληλα σε κάθε είδος φυτικής πρώτης ύλης, δηλαδή σε κάθε υπόστρωμα, λόγω της διακύμανσης της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ διαφορετικών ειδών ή ποικιλιών. Επομένως, είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθεί ένα συγκεκριμένο ενζυμικό μείγμα για όλα τα είδη φυτών.

Βέβαια, για να λειτουργήσει η ενζυμική εκχύλιση με διαφορετικά ένζυμα πρέπει το εύρος μεταξύ των αντίστοιχων τιμών βέλτιστης θερμοκρασίας και pH να είναι στενό. Η ενζυμική εκχύλιση πολλαπλών σταδίων εφαρμόζεται κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα, όχι μόνο επειδή οι ενζυμικές ενεργότητες που έχουν αναγνωριστεί ως απαραίτητες για την υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων δεν λειτουργούν στις ίδιες περιοχές pH ή θερμοκρασίας, αλλά και επειδή συχνά επιδιώκεται η εξαγωγή προϊόντων που είναι ευαίσθητα στα ένζυμα (π.χ. αρχικά εκχύλιση πρωτεΐνης και εν συνεχεία προσθήκη πρωτεάσης για εξαγωγή ελαίου) [51].

4.4.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία εκχύλισης είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει την ΕΥΕ μέσω της επίδρασής της στην ενζυμική ενεργότητα και τις ρεολογικές ιδιότητες των διαλυτοποιημένων βιοδραστικών ενώσεων [50].

Η πρώτη ύλη που πρέπει να υδρολυθεί αποτελείται συνήθως από ένα μείγμα πολυσακχαριτών. Η ρεολογική συμπεριφορά αυτών των πολυμερών σε υδατικό περιβάλλον εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, το ιξώδες ενός μείγματος κυτταρίνης και νερού μπορεί να μειωθεί ελαφρώς όταν η θερμοκρασία αυξάνεται. Αντίθετα, το άμυλο αυξάνει έντονα το ιξώδες του περιβάλλοντος με την αύξηση της θερμοκρασίας, επειδή υφίσταται ζελατινοποίηση, και η πηκτίνη, αν και διαλυτή σε χαμηλή θερμοκρασία, έχει την ικανότητα να σχηματίζει πηκτή κατά τη ψύξη μετά από ένα στάδιο θέρμανσης. Επομένως, το μέσο ιξώδες θα μπορούσε να μεταβληθεί πολύ με τη διακύμανση της θερμοκρασίας [51].

Επιπλέον, η θερμοκρασία της ενζυμικής εκχύλισης είναι μια μεταβλητή που πρέπει να ελέγχεται και εξαιτίας της αστάθειας των βιοκαταλυτών [60]. Γενικά, η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα και σε υψηλότερους ρυθμούς αντίδρασης. Ωστόσο, η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας σε τιμές μεγαλύτερες της βέλτιστης οδηγεί σε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας και η υπερβολική αύξηση σε τιμές μεγαλύτερες της κρίσιμης προκαλεί τη μετουσίωση του ενζύμου. Δεδομένου ότι τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, μπορεί να προκληθεί θερμική μετουσίωση εξαιτίας της διάσπασης των δεσμών που συγκροτούν την τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή, γεγονός που συνεπάγεται την αδρανοποίηση του ενζύμου και την απώλεια της καταλυτικής του δράσης, λόγω της αδυναμίας σύνδεσης του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο [50]. Σημειώνεται ότι η θερμοκρασία μετουσίωσης σχετίζεται με τον οργανισμό παραγωγής του ενζύμου: ένα ζωικό ένζυμο έχει θερμοκρασία μετουσίωσης 40-45 °C, για τα ένζυμα που παράγονται από μικροοργανισμούς είναι μεγαλύτερη από 60-65 °C, ενώ για ορισμένα θερμοανθεκτικά ένζυμα μπορεί να υπερβεί τους 100 °C [51].

Τέλος, κατά τον σχεδιασμό της διεργασίας εκχύλισης, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας θα πρέπει να συνάδει και με το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο τα εκχυλιζόμενα βιοενεργά συστατικά παραμένουν σταθερά, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων [47].

4.4.3 pH

Το pH αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για την EYE, λόγω της επίδρασής του στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και στην ενζυμική ενεργότητα [50].

Αναφορικά με τη δράση του pH στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, έχει παρατηρηθεί ότι η σταθερότητα των δεσμών υδρογόνου εξαρτάται από την τιμή του pH, καθώς πραγματοποιείται διάσπασή τους σε όξινο περιβάλλον. Επιπλέον, το όξινο pH επιτρέπει την κινητικότητα των κατιόντων Ca^{++} , τα οποία εμπλέκονται στην υποστήριξη της πολυουρονικής αλυσίδας και ως εκ τούτου διευκολύνει την ελάττωση της συνοχής της πηκτίνης. Έτσι, το όξινο pH παρέχει αύξηση της πλαστικότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

Η δεύτερη σημαντική επίδραση ενός όξινου pH αφορά στην ενζυμική ενεργότητα. Πράγματι, τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, οπότε αποκτούν διαφορετικό ιονισμό ανάλογα με το pH, όπως επίσης και μερικά από τα υποστρώματά τους. Το pH δηλαδή δύναται να μεταβάλλει την ενζυμική πρωτεϊνική δομή και συνεπώς την ικανότητα δέσμευσης με το υπόστρωμα. Καθώς η καταλυτική ικανότητα του ενζύμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από αυτήν την ικανότητα σύνδεσης μεταξύ πρωτεΐνης και υποστρώματος, ένα ακατάλληλο pH μπορεί να μειώσει σημαντικά την ενζυμική καταλυτική δράση [50], [51]. Μάλιστα, είναι πιθανή η μετουσίωση σε ακραίες τιμές pH και ενδεχομένως να αποβεί μη αναστρέψιμη σε ορισμένα ένζυμα [51]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μέγιστη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται από ένζυμα σε pH πλησίον του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Ωστόσο, σε αυτό το pH, η διαλυτότητα του ενζύμου είναι η ελάχιστη, γεγονός που επηρεάζει άμεσα την υδρόλυση της κυτταρικής μήτρας και συνεπώς μειώνει την απελευθέρωση των βιοενεργών προϊόντων. Ως εκ τούτου, πρέπει να αναζητηθεί ένα κατάλληλο pH για τη διεργασία, έτσι ώστε τα ένζυμα ούτε να μετουσιωθούν, ούτε να είναι αδιάλυτα [45]. Η βέλτιστη τιμή του pH διατηρείται συνήθως σταθερή κατά τη διάρκεια της εκχύλισης από το ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, μόνο το αρχικό pH ελέγχεται και ύστερα μπορεί να μεταβληθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επώασης-εκχύλισης [47].

Αξίζει να σημειωθεί ότι για την αποτελεσματική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων της πρώτης ύλης είναι εξαιρετικά πιθανό να απαιτηθεί μείγμα διαφορετικών ενζύμων, των οποίων οι βέλτιστες τιμές pH δεν θα ταυτίζονται. Οπότε, είναι απαραίτητο να καθορισθεί ένα μέσο pH, το οποίο είναι κατάλληλο για κάθε ενζυμική δράση στο μείγμα [51].

Ομοίως με τη θερμοκρασία, και το pH έχει άμεσο αντίκτυπο στο προϊόν που εκχυλίζεται. Επομένως, πρέπει να εξεταστεί όχι μόνο εάν το προϊόν είναι θερμοευαίσθητο, αλλά και σε ποιο εύρος pH παραμένει σταθερό [44].

4.4.4 Κοκκομετρία- Προεπεξεργασία

Η μηχανική προεπεξεργασία έχει σημαντική επίδραση στη διαδικασία εκχύλισης, καθώς σπάει τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, διευκολύνοντας την προσβασιμότητα του διαλύτη στις εκχυλιζόμενες βιοδραστικές ουσίες, αλλά και την προσβασιμότητα του ενζύμου στο υπόστρωμά του. Πιο συγκεκριμένα, το μικρό

μέγεθος σωματιδίων πρώτης ύλης οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις εκχύλισης, επειδή το μήκος της διαδρομής μεταξύ των ενζύμων και των κυτταρικών συστατικών μειώνεται. Ωστόσο, η υπερβολικά μικρή κοκκομετρία δυσχεραίνει τη διήθηση, που συχνά απαιτείται για την παραλαβή του εκχυλίσματος. Γενικά, η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να προκληθεί με μηχανική ή ενζυμική επεξεργασία ή συνδυασμό και των δύο. Συνήθως, η άλεση προτείνεται για την αύξηση της επιφάνειας επαφής με στόχο την αποτελεσματική ενζυμική επεξεργασία διαφόρων φυτικών υλικών.

Εκτός από την άλεση, και η ξήρανση (αφυδάτωση) επηρεάζει την απόδοση εκχύλισης και τη μεταφορά μάζας στην εκχύλιση πολυφαινολών. Ειδικότερα, η αφυδάτωση περιλαμβάνει την απομάκρυνση του δεσμευμένου νερού από την πρώτη ύλη, αυξάνει το πορώδες της κυτταρικής μήτρας, διευκολύνει τον ρυθμό διάχυσης και προάγει την επαφή με τα ένζυμα [48].

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη υδατική εκχύλιση μπορεί επίσης να συνδυαστεί και με άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας, θερμικές ή φυσικοθερμικές. Για παράδειγμα, η εκβολή (extrusion) συνιστά μια μηχανική διαδικασία που εκθέτει το υλικό σε υψηλή θερμοκρασία, διατμητική τάση και πίεση για σύντομο χρονικό διάστημα, αποσκοπώντας στη ρήξη των φυτικών κυττάρων. Άλλη εναλλακτική αποτελεί η ηλεκτρική προεπεξεργασία με εκκενώσεις υψηλής τάσης, η οποία θεωρήθηκε ότι ενίσχυσε την απόδοση σε εκχυλιζόμενο έλαιο. Τέλος, η προθέρμανση πριν από την ενζυμική επεξεργασία προτάθηκε για την ενίσχυση της ικανότητας εκχύλισης του ελαίου κατά τη διάρκεια της ψυχρής έκθλιψης των σπόρων του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς [33], [51].

4.4.5 Ανάδευση

Η ανάδευση δεν επηρεάζει άμεσα τα ένζυμα ή την πρώτη ύλη. Ωστόσο, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη αυτή η παράμετρος για διάφορους λόγους. Αρχικά, μέσω της επαρκούς ανάδευσης εξασφαλίζεται καλή μεταφορά θερμότητας για την υποστήριξη της δράσης των ενζύμων. Επιπλέον, διευκολύνεται η μεταφορά μάζας, αφού τα ένζυμα βρίσκονται σε ολόκληρο τον όγκο της αντίδρασης και αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμά τους κάθε χρονική στιγμή. Τέλος, στην περίπτωση που η προς επεξεργασία πρώτη ύλη περιέχει ένζυμα, ο ρυθμός ανάδευσης πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε να περιορίζεται η διάτμηση και να αποτρέπεται η γαλακτωματοποίηση [51].

4.4.6 Αναλογία στερεού-υγρού

Η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης στην ΕΥΕ συνιστά κρίσιμο παράγοντα που επιδρά στην υδρολυτική αντίδραση και στην κινητικότητα των ενζύμων και των προϊόντων [47]. Τουτέστιν η αναλογία στερεού-υγρού καθορίζει τον χρόνο εκχύλισης, το απαιτούμενο ενζυμικό φορτίο και το ιξώδες του μέσου [51]. Η χαμηλή αναλογία υγρού προς στερεό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό παχύρρευστων εναιωρημάτων που δυσχεραίνουν την επαφή μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Αντίθετα, η χρήση υψηλών αναλογιών υγρού-στερεού θα μπορούσε να καταστήσει τη διεργασία μη πρακτική, αφού όταν τα προϊόντα είναι πολύ αραιωμένα, παράγονται περισσότερα

υγρά απόβλητα και υπάρχει αυξημένη πιθανότητα γαλακτωματοποίησης. Οπότε, με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται το κόστος επεξεργασίας και απογαλακτωματοποίησης των λυμάτων [47]. Συχνά ο πειραματιστής επιλέγει την κατάλληλη αναλογία στερεού-υγρού, και συνεπώς το αντίστοιχο ιξώδες του μέσου, σύμφωνα με τον διαθέσιμο εργαστηριακό εξοπλισμό για ανάδευση, αλλά και σύμφωνα με το είδος της φυτικής πρώτης ύλης [51].

4.4.7 Ενζυμικό φορτίο

Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου οδηγεί σε υψηλότερους ρυθμούς εκχύλισης λόγω του σχηματισμού περισσότερων συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος. Ο ρυθμός εκχύλισης καθορίζεται ισχυρά από την ενζυμική συγκέντρωση και την συγκέντρωση του υποστρώματος, και ειδικότερα από αυτό που υπάρχει σε περιορισμένη συγκέντρωση μεταξύ των δύο [44]. Όταν δηλαδή η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι χαμηλή, η περαιτέρω προσθήκη ενζύμου δεν θα οδηγήσει σε μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης και ομοίως, όταν προστίθεται περιορισμένη ποσότητα ενζύμου, η περαιτέρω προσθήκη υποστρώματος δεν θα διευκολύνει περισσότερο την εκχύλιση [61].

Το ενζυμικό φορτίο είναι μια βασική μεταβλητή που επηρεάζει σημαντικά το κόστος προμήθειας του ενζύμου και κατ'επέκταση την οικονομική βιωσιμότητα όλης της διεργασίας. Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί τιμές συγκέντρωσης στην περιοχή 0.2%-3.0% για διάφορες εφαρμογές της ΕΥΕ. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί και υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμων (έως 5.0%), όπως στην περίπτωση ανάκτησης των συνολικών φαινολικών ουσιών από φλούδες λεμονιού [62] και από φλούδες γλυκού λάιμ [63]. Γενικά, όταν το υπόστρωμα περιέχει αναστολείς, θα μπορούσε να συνιστάται η χρήση υψηλότερων ενζυμικών φορτίων.

Στην περίπτωση αυξανόμενης συγκέντρωσης ενζύμου, αρχικά σημειώνεται αύξηση της απόδοσης εκχύλισης έως μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια παρατηρείται μείωση. Η συγκέντρωση του ενζύμου που οδηγεί στη μέγιστη απόδοση ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο [64]. Ομοίως και κατά την αξιολόγηση της επίδρασης χρήσης ενζύμου (πηκτινάση ή κυτταρινάση) στην ανάκτηση καροτενοειδών από τα υπολείμματα τομάτας, καταγράφηκε αύξηση στην απόδοση εκχύλισης με τη χρησιμοποιούμενη ενζυμική ενεργότητα ($U/g_{\text{υπολ. τομάτας}}$), ενώ τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με εφαρμογή $70 U/g_{\text{υπολειμμάτων τομάτας}}$ πηκτινάσης και $1225 U/g_{\text{υπολειμμάτων τομάτας}}$ κυτταρινάσης. Για υψηλότερα των βέλτιστων ενζυμικά φορτία, εντοπίστηκε μια ισχυρή μείωση της απόδοσης ανάκτησης καροτενοειδών [65].

Τέλος, η αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου εκχύλισης και συγκέντρωσης ενζύμου, τα οποία θεωρούνται μεγέθη αντιστρόφως ανάλογα, είναι πολύ κρίσιμη και θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο ταυτόχρονης βελτιστοποίησης που θα προτείνει μια συμβιβαστική λύση μεταξύ αυτών των μεταβλητών.

4.4.8 Χρόνος εκχύλισης

Η αποδόμηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος της πρώτης ύλης μπορεί να ενισχυθεί με παράταση του χρόνου εκχύλισης. Μάλιστα, μπορεί να απαιτηθούν διαφορετικοί χρόνοι επώασης ανάλογα με το ένζυμο και τη διαλυμένη ουσία. Ωστόσο, οι περισσότερες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι πέραν του βέλτιστου χρόνου υδρόλυσης, οι αποδόσεις της εκχύλισης είτε παρέμειναν σταθερές, είτε μειώθηκαν [47].

Ο χρόνος υδρόλυσης και η συγκέντρωση του ενζύμου αποτελούν συσχετιζόμενα μεγέθη. Θεωρητικά διπλασιάζοντας την ενζυμική συγκέντρωση επιτυγχάνονται παρόμοιες αποδόσεις για τον μισό χρόνο εκχύλισης. Ή αντίστροφα, μειώνοντας την ποσότητα του ενζύμου και αυξάνοντας τον χρόνο υδρόλυσης με αναλογικό τρόπο, μπορούν να επιτευχθούν συγκριτικά αποτελέσματα. Στην πράξη η ενεργότητα των ενζύμων μειώνεται περισσότερο ή λιγότερο γρήγορα όταν ο χρόνος υδρόλυσης παραταθεί. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας διάφορων ανασταλτικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να προέρχονται από την πρώτη ύλη, από τα προϊόντα αντιδράσεων, από κάποιους παράγοντες της διεργασίας κ.λπ.

Για την εύρεση της βέλτιστης λύσης στην επιλογή του ενζυμικού φορτίου και του χρόνου εκχύλισης πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα δεδομένα. Αρχικά, τα υψηλά ενζυμικά φορτία συνεπάγονται και υψηλό κόστος, καθώς η προμήθεια των ενζύμων είναι συνήθως δαπανηρή. Αντίθετα, τα χαμηλά ενζυμικά φορτία και οι παρατεταμένοι χρόνοι εκχύλισης οδηγούν σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατανάλωση. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να βρεθεί ένας συμβιβασμός μεταξύ της ποσότητας του προστιθέμενου ενζύμου και του χρόνου υδρόλυσης. Άλλος ένας οικονομικός παράγοντας που πρέπει να εξεταστεί είναι η απόδοση της αντίδρασης, ώστε η αντίδραση να είναι επαρκώς αποτελεσματική. Επιπλέον, η επιλογή του συνολικού χρόνου υδρόλυσης πρέπει να συνεκτιμά και τον παράγοντα της μικροβιολογίας, αφού ένα μείγμα νερού και οργανικής ύλης είναι ένα πολύ ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τέλος, πρέπει να διασφαλίζεται η ποιότητα του προϊόντος, μιας και ορισμένα προϊόντα ενδέχεται να είναι ευαίσθητα στην οξείδωση ή στη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, μια υπερβολικής διάρκειας εκχύλιση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του ελαίου ή τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που επιδιώκεται να εξαχθεί [50], [51].

4.4.9 Άλλοι παράγοντες

Η παρουσία ανόργανων κατιόντων (π.χ. Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} κ.λπ.) και ανιόντων (π.χ. Cl^-) επηρεάζει ορισμένα ένζυμα, οδηγώντας είτε στην ισχυρή ενεργοποίησή τους, είτε στην αναστολή τους [44].

4.5 Εφαρμογές της EYE

Το εύρος των εφαρμογών της EYE εκτείνεται από αντιδράσεις σε εργαστηριακή κλίμακα έως βιομηχανικές διεργασίες. Αυτή η τεχνική θεωρείται ως εναλλακτική μέθοδος παραγωγής προϊόντων υψηλής αξίας μέσω ήπιων συνθηκών. Μάλιστα, οι αναδυόμενες εξειδικευμένες αγορές ενθαρρύνουν την ανάπτυξη τέτοιων τεχνικών. Για παράδειγμα, η αγορά καλλυντικών είναι ολοένα και πιο απαιτητική για φυσικά εκχυλίσματα που παράγονται με «πιο πράσινο» τρόπο.

4.5.1 Εργαστηριακή κλίμακα

Η EYE μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα σε εργαστηριακή κλίμακα, καθώς η διαδικασία δεν απαιτεί πολύ εξελιγμένο εξοπλισμό. Επίσης, το γεγονός ότι όλο και περισσότερα ένζυμα είναι πλέον διαθέσιμα, καθιστά ευκολότερη την πειραματική μελέτη. Παράλληλα με τις διεργασίες εκχύλισης πραγματοποιούνται επικουρικές ερευνητικές εργασίες για τη διεύρυνση της τράπεζας δεδομένων των διαθέσιμων ενζύμων. Ο κύριος στόχος είναι να οριστεί ο καλύτερος βιολογικός καταλύτης για την εκτέλεση της εκχύλισης για ένα συγκεκριμένο φυτό ή σε μέρος του φυτού.

Στη βιβλιογραφία τα εξαγόμενα προϊόντα από την EYE κατηγοριοποιούνται συνήθως στις εξής ομάδες: πολυσακχαρίτες, έλαια, πρωτεΐνες, φαινολικές ενώσεις, αρωματικές ύλες και χρωστικές ουσίες [51].

4.5.1.1 Πολυσακχαρίτες

Η συμβατική θερμαινόμενη εκχύλιση με αναροή (Soxhlet) είναι η πιο κοινή μέθοδος για την εκχύλιση πολυσακχαριτών. Γενικά, η απόδοση αυτής της μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χρόνο εκχύλισης και τη θερμοκρασία. Ωστόσο, η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση των πολυσακχαριτών επηρεάζοντας έτσι τη βιολογική τους δραστηριότητα. Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί σχετικά με την ενζυμική εκχύλιση βιοδραστικών βιοπολυμερών. Υπάρχουν δύο πιθανές προσεγγίσεις για την υποβοηθούμενη από ένζυμα εκχύλιση πολυσακχαριτών: α) χρήση ενζύμων που είναι ικανά να διασπούν τους βιολογικούς φραγμούς, δηλαδή κυτταρικό τοίχωμα και μεμβράνες, ώστε να απομονωθεί ο επιθυμητός πολυσακχαρίτης, β) χρήση ενζύμων που αποικοδομούν μερικώς τους επιθυμητούς πολυσακχαρίτες σε μικρότερα μόρια προκειμένου να διευκολυνθεί η εκχύλιση.

Για παράδειγμα, ερευνητές εξήγαγαν καραγενάνη από το *Mastocarpus stellatus* χρησιμοποιώντας το ενζυμικό σκεύασμα Alcalase® (πρωτεάση). Οι εκχυλισμένοι πολυσακχαρίτες εμφάνισαν εξαιρετικές ιδιότητες ζελατινοποίησης. Μάλιστα, η διαδικασία εκχύλισης οδήγησε σε ταυτόχρονη εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών, όπως οι πολυφαινόλες, προσθέτοντας έτσι περαιτέρω αξία στο εκχύλισμα. Ως εκ τούτου, τα ένζυμα δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την επιλεκτική απομόνωση βιοδραστικών πολυσακχαριτών και για την επίτευξη ειδικών ιδιοτήτων ζελατινοποίησης και επιθυμητών φυσικών ιδιοτήτων [48]. Σε άλλη έρευνα

χρησιμοποιήθηκε οξειδάση γλυκόζης για την εκχύλιση πολυσακχαριτών από το φυτό *Astragalus membranaceus*. Η διαδικασία βελτιστοποιήθηκε με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης με αποτέλεσμα 250% αύξηση στην απόδοση και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τη συμβατική διαδικασία [39], [47].

Συμπερασματικά, η τεχνολογία ενζυμικής εκχύλισης έχει αποδειχθεί ότι πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών τεχνικών στη βιώσιμη εκχύλιση πολυσακχαριτών και στη βελτιωμένη φαρμακολογική δράση του εκχυλίσματος. Τα ενζυμικά συμπλέγματα φαίνεται επίσης να έχουν θετική επίδραση στην απόδοση σε πολυσακχαρίτη και στην ποσότητα του εκχυλίσματος. Ένα άλλο πλεονέκτημα της ενζυμικής υποβοηθούμενης εκχύλισης είναι η απαίτηση λιγότερης ποσότητας αλκοόλης για την κατακρήμνιση των επιθυμητών πολυσακχαριτών από το μείγμα αντίδρασης, καθιστώντας τη διαδικασία πιο πράσινη [48].

4.5.1.2 Έλαια

Το έλαιο που βρίσκεται μέσα στα φυτικά κύτταρα περιέχεται σε σφαιρικά ελαιosώματα ή στα κενοτόπια, ενώ τα αιθέρια έλαια σε αδενικά τριχώματα. Συμβατικές τεχνικές, όπως η υδραυλική συμπίεση, η συμπίεση με εκβολή και η εκχύλιση με διαλύτη, χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση ελαίων από σπόρους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το έλαιο εξάγεται απευθείας από τα φρούτα με τη χρήση απλής μηχανικής πρέσας και χρησιμοποιείται άμεσα χωρίς καμία επεξεργασία, π.χ. παρθένο ελαιόλαδο. Συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης στην εκχύλιση ελαίων αποτελεί το εξάνιο, το οποίο ωστόσο είναι τοξικό και μη οικολογικό, με αποτέλεσμα οι ερευνητές να αναζητούν πιθανές εναλλακτικές λύσεις χωρίς να διακυβεύεται η απόδοση και η ποιότητα του ελαίου. Η υδατική ενζυμική εκχύλιση είναι μια ευνοϊκή τεχνική για την απομόνωση ελαίων από ελαιούχους σπόρους. Μια στρατηγική για την απελευθέρωση και ανάκτηση ελαίου κατά την υδατική εκχύλιση είναι η μερική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με τη χρήση κατάλληλων ενζύμων και η υδρόλυση σύνθετων λιποπρωτεϊνών και λιποπολυσακχαριτών σε απλούστερα μόρια. Επίσης, απαιτούνται μέθοδοι απογαλακτωματοποίησης όταν το λάδι σχηματίζει γαλάκτωμα, το οποίο σταθεροποιείται από άλλα κυτταρικά συστατικά, ιδιαίτερα από πρωτεΐνη. Η προσθήκη κατάλληλων ενζυμικών μειγμάτων (πρωτεάση, κυτταρινάση, πηκτινάση κ.α.) στο γαλάκτωμα στοχεύει στην υδρόλυση των διεπιφανειακών πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση των πολυπεπτιδίων υψηλού μοριακού βάρους, ενώ παράλληλα ενισχύεται η απόδοση εκχύλισης σε έλαιο [47], [48].

Μερικές εφαρμογές της ΕΥΕ για την παραλαβή ελαίου αφορούν στην εκχύλιση ελαιόλαδου, καλαμποκέλαιου, φυστικέλαιου, ελαίου καρύδας, ελαίου moringa κ.λπ.. Επίσης, η υδατική εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων κερδίζει έδαφος ως εναλλακτική λύση για την ταυτόχρονη εκχύλιση ελαίου και πρωτεΐνης, π.χ. στην περίπτωση ταυτόχρονης εκχύλισης σησαμέλαιου και πρωτεϊνών σησαμιού. Ακόμη, η ενζυμική επεξεργασία μπορεί να συνδυαστεί με την εκχύλιση ελαίου με οργανικούς διαλύτες, την έκθλιψη και την υδροαπόσταξη [47]. Για παράδειγμα, το έλαιο άγριου τριαντάφυλλου, που αποτελείται κυρίως από λινολενικό, λινολεϊκό και τρανς-

ρετινοϊκό οξύ, έχει εξαιρετικές καλλυντικές ιδιότητες, αλλά η συμβατική εκχύλιση ελαίου με χρήση οργανικών διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνει την περιεκτικότητα σε τρανς-ρετινοϊκό οξύ. Ως λύση έχει προταθεί η ψυχρή συμπίεση σε συνδυασμό με ενζυμική προεπεξεργασία με μείγματα εμπορικών ενζύμων για την ενίσχυση των αποδόσεων, φτάνοντας τιμές συγκρίσιμες με τη βιομηχανική εκχύλιση με εξάνιο [33].

Αιθέρια έλαια

Το αιθέριο έλαιο και τα εκχυλίσματα από καρυκεία και βότανα είναι πολύτιμα προϊόντα, που χρησιμοποιούνται ευρέως για γαστρονομικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Οι παραδοσιακές τεχνικές παραλαβής περιλαμβάνουν την εκχύλιση με διαλύτη, την απόσταξη με ατμό και την υδροαπόσταξη. Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές μπορούν να συνδυαστούν με την ενζυμική επεξεργασία. Για παράδειγμα, μετά την υδροαπόσταξη φύλλων δάφνης που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και ξυλανάση, αναφέρθηκε ο εμπλουτισμός των αιθέριων ελαίων σε οξυγονωμένα μονοτερπένια, γλυκοζιτικά δεσμευμένες πτητικές ουσίες και φαινολικές ενώσεις [66]. Τέλος, η ενζυμική προεπεξεργασία του φλοιού εσπεριδοειδών με σκευάσματα που περιέχουν ημικυτταρολυτικές και πηκτινολυτικές δράσεις παρατηρήθηκε ότι αυξάνει την απόδοση σε αιθέριο έλαιο από δύο έως έξι φορές και οδηγεί σε σημαντική ποσότητα ζυμώσιμων σακχάρων σε σύγκριση με την υδροαπόσταξη χωρίς προκατεργασία [47].

4.5.1.3 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι ένα σημαντικό θρεπτικό και διατροφικό συμπλήρωμα και μπορούν να ληφθούν από φυτικές αλλά και ζωικές πηγές. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια μπορούν να ασκήσουν βιολογική επίδραση τόσο σε συνθήκες *in vivo*, όσο και *in vitro*.

Γενικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι για την εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτά, αλλά η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από παράγοντες όπως η διαλυτότητα, η υδροφοβικότητα, το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών. Η παρουσία του άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος λειτουργεί ως φραγμός στην απελευθέρωση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, η πλήρης διαλυτοποίηση και εκχύλιση των πρωτεϊνών εξαρτάται από τη διάσπαση των κυττάρων. Η διάσπαση των κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με χημικές μεθόδους χρησιμοποιώντας μια ποικιλία διαλυτών (αιθέρας, οξινισμένη αλκοόλη, χλωροφόρμιο) ή με φυσικές μεθόδους, όπως οι υπέρηχοι. Όμως, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε αυτές οι μέθοδοι να μην μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες. Ακόμη, οι φυτικοί ιστοί περιέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεασών, που μπορούν να εμποδίσουν την εκχύλιση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, ενώ η παρουσία ορισμένων άλλων ενώσεων μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση πρωτεϊνών και συνεπώς σε απώλεια της λειτουργικότητάς τους [39], [48].

Τα συμπυκνώματα πρωτεϊνών που παράγονται στο εμπόριο συνήθως αποτελούνται από πρωτεΐνες σε υδατικό διάλυμα, καθιστώντας έτσι το νερό ως διαλύτη επιλογής για την εκχύλιση. Έτσι, η απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών μπορεί περαιτέρω να αυξηθεί χρησιμοποιώντας ενζυμική υδατική εκχύλιση. Διαφορετικές υδρολάσες και πρωτεάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απελευθέρωση πρωτεϊνών από φυτικά υποστρώματα. Για παράδειγμα, η χρήση πηκτινάσης βελτίωσε την ικανότητα εκχύλισης της πρωτεΐνης σόγιας χωρίς αποικοδόμηση πρωτεΐνης, σε εργαστηριακή και πιλοτική κλίμακα. Μάλιστα, η ανάκτηση πρωτεΐνης αυξήθηκε κατά 50% με βελτιωμένη σταθερότητα γαλακτώματος. Επίσης, πρωτεάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή πρωτεϊνών από ελαιόσπορους, όπως κράμβη και σόγια, καθώς και μικροφύκη. Τέλος, η εκχύλιση πρωτεΐνης από φύλλα ελιάς με οργανικούς διαλύτες βελτιστοποιήθηκε με υποβοήθηση από κυτταρινάσες, οπότε και επιτεύχθηκε ταχύτερη εκχύλιση, με υψηλότερη ανάκτηση και μειωμένη χρήση διαλυτών [39], [47].

4.5.1.4 Φαινολικές ενώσεις

Η εκχύλιση με διαλύτη είναι η πιο κοινή συμβατική μέθοδος για την εκχύλιση φαινολικών από φυτά. Χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη και οξικός αιθυλεστέρας, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με διαφορετικές αναλογίες νερού. Συνεχής έρευνα διεξάγεται χρησιμοποιώντας νερό ως μοναδικό διαλύτη εκχύλισης. Όμως, το πρόβλημα της χαμηλότερης απόδοσης παραμένει στην εκχύλιση των φαινολικών σε σύγκριση με αυτή που επιτυγχάνεται με τη χρήση οργανικών διαλυτών, όπως η ακετόνη. Αν και η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, η πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε νερό στον διαλύτη εκχύλισης προκαλεί παράπλευρη εκχύλιση άλλων φυτοχημικών, μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωση των φαινολικών.

Όπως αναφέρθηκε, τα φαινολικά είναι γενικά συνδεδεμένα με άλλα φυτικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, γεγονός που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη ενός παγκόσμιου πρωτοκόλλου για τη φαινολική εκχύλιση. Ωστόσο, τα δεσμευμένα φαινολικά μπορούν να εκχυλιστούν χρησιμοποιώντας πηκτινολυτικά ένζυμα και παρασκευάσματα ενζύμων αποικοδομήσεως του κυτταρικού τοιχώματος. Ο τρόπος δράσης των υδρολυτικών ενζύμων στην εκχύλιση των φαινολικών επιτυγχάνεται με τη διάσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, ευνοώντας έτσι την έκθεση των φαινολικών στον διαλύτη [39].

Σημειώνεται ότι έχει προταθεί μια νέα ενζυμική προσέγγιση για τη βελτίωση της εκχύλισης φλαβονοειδών από το *Ginkgo biloba*, στην οποία το ένζυμο χρησιμοποιείται όχι μόνο για την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, αλλά και για την αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων-στόχων στο εκχυλιστικό μέσο αιθανόλης-νερού [67]. Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται μερικές εφαρμογές της EYE φαινολικών ενώσεων και επισημαίνονται οι βελτιωμένες ιδιότητες που επιτυγχάνονται συγκριτικά με συμβατικές μεθόδους [47].

Πίνακας 2: Παραδείγματα υδατικής EYE φαινολικών ενώσεων [47]

Πρώτη ύλη	Ένζυμο	Ενισχυμένες ιδιότητες
Φρούτα		
Μύρτιλλο, ελιά, μήλο	Κυτταρινάση, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, β-γλυκοζιδάση	Αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές
Δρόγες		
Βάλσαμο λεμονιού, σαφράν (κρόκος)	Κυτταρινάση, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, β-γλυκοζιδάση, ξυλανάση	Αντιοξειδωτικές
Σπόροι και φλοιοί		
Λινάρι, κινόα	Κυτταρινάση, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, β-γλυκοζιδάση, ξυλανάση, πρωτεάση, αραβινοφουρανοζιδάση	Αντιοξειδωτικές
Υπολείμματα		
Μήλο, κίτρο, γλυκό λάιμ, σταφύλι, μαύρη σταφίδα	Κυτταρινάση, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, πρωτεάση, ραμνογαλακτουρονάση	Αντιοξειδωτικές

4.5.1.5 Αρωματικές και χρωστικές ύλες

Αρωματικές ύλες

Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν ενζυμική προεπεξεργασία για την εξαγωγή αρωματικών υλών από διάφορα φυτικά υλικά έχουν δείξει βελτίωση στην ανάκτηση αρώματος. Για παράδειγμα, μια νέα μέθοδος εφαρμογής κυτταρολυτικών ενζύμων από το *Trichoderma resei* έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στη μουστάρδα και βρέθηκε ότι αυξάνει σημαντικά την απόδοση του πτητικού ελαίου μουστάρδας (20-30%). Έχει αναφερθεί επίσης δράση ενζύμων στην εκχύλιση αρωματικών ενώσεων από ρίγανη. Η εκχύλιση διεξήχθη χρησιμοποιώντας ένα παρασκεύασμα υδρολυτικών ενζύμων και η αποσύνθεση του φυτικού ιστού βελτίωσε την εκχύλιση του αρώματος, της γεύσης, καθώς και των αιθέριων ελαίων της ρίγανης. Αναφορικά με τον μούστο και τα κρασιά, οι αρωματικές ενώσεις τους εμφανίζονται κυρίως ως γλυκοζίτες, δηλαδή δεσμευμένες με σάκχαρα, και ως συνέπεια δεν αξιοποιείται πλήρως το αρωματικό τους δυναμικό. Το μόριο που συνδέεται με το σάκχαρο ονομάζεται αγλυκόνη. Στην EYE, λόγω της παρουσίας β-γλυκοζιδασών, α-1-ραμνοζιδάσης, α-L-

αραβινοζιδάσης, β-D-απιοζιδάσης ή συνδυασμού αυτών, αυξήθηκε σημαντικά η συγκέντρωση της ελεύθερης αγλυκόνης και παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του αρώματος. Τέλος, η βανιλίνη, η κύρια αρωματική ύλη των κόκκων βανίλιας, είναι μία από τις πιο ακριβές αρωματικές ενώσεις. Παραδοσιακά, οι κόκκοι βανίλιας υπόκεινται σε διαδικασία ωρίμανσης, στη διάρκεια της οποίας το χαρακτηριστικό άρωμα και η γεύση αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα βιοχημικών αντιδράσεων. Ωστόσο, ο ενζυμικός μετασχηματισμός των γλυκοζιτών δεν είναι πολύ αποτελεσματικός κατά την παραδοσιακή διαδικασία ωρίμανσης και εκχύλισης. Όμως, υπάρχουν αναφορές για αύξηση της περιεκτικότητας των κόκκων βανίλιας σε βανιλίνη έως και 24% μετά από επεξεργασία με εξωγενή ένζυμα β-γλυκοζιδάσης [68].

Έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μια διαδικασία για την παραγωγή ροδέλαιου από την εκχύλιση φρέσκου άνθους τριαντάφυλλου ή υπολειμμάτων του με χρήση ενζύμων. Τα άνθη της τριανταφυλλιάς επεξεργάζονται σε υδατικό μέσο (αναλογία δείγματος προς νερό 1:1.5 έως 3) με παρασκεύασμα ενζύμου από *Trichoderma* ή *Geotrichum*, το οποίο περιέχει κυρίως β-γλυκοσιδάσες και υδρολάσες πολυσακχαριτών, είτε χωριστά είτε σε συνδυασμό σε συγκέντρωση 0.1 έως 0.5% επί της πρώτης ύλης για 2–4 ώρες σε εύρος θερμοκρασίας 40–45°C ακολουθούμενη από υδροαπόσταξη για την ανάκτηση του ελαίου [68].

Χρωστικές ουσίες

Επί του παρόντος υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για χρωστικές ύλες από φυσικές πηγές. Δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα απαγόρευσης των συνθετικών χρωμάτων λόγω των καρκινογόνων ιδιοτήτων τους και ήδη έχει σημειωθεί μείωση του αριθμού των επιτρεπόμενων συνθετικών χρωμάτων από 13 σε 8, η ζήτηση για φυσικά χρώματα είναι εμφανής. Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται οι εφαρμογές της ΕΥΕ στην παραλαβή χρωστικών από φυτική πρώτη ύλη, ενώ αναγράφεται και η επί τοις εκατό αύξηση της απόδοσης εκχύλισης συγκριτικά με τη συμβατική μέθοδο [68].

Πίνακας 3: Εφαρμογή ενζύμων για την εκχύλιση χρωστικών υλών

Πρώτη ύλη	Χρωστική ουσία	Ένζυμο	% αύξηση της απόδοσης συγκριτικά με τη συμβατική μέθοδο
Ταγέτης (κατηφές)	Λουτεΐνη (καροτενοειδές)	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες	2-5 φορές αύξηση
Τσίλι	Καροτενοειδή και καψαϊκίνη	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες	Καροτενοειδή: 11 Καψαϊκίνη: 7
Κόκκινο σταφύλι	Ανθοκυανίνες	Πηκτινάσες	10-30
Φράουλα	Ανθοκυανίνες	Πηκτινάσες και πρωτεάση	28

Αποξηραμένα αρόνια	Ανθοκυανίνες	Κυτταρινάσες και πηκτινάσες	25
Τομάτα	Λυκοπένιο	Κυτταρινάσες και πηκτινάσες	20
Καρότο	Καροτένια	Κυτταρινάσες και πηκτινάσες	41-49

4.5.2 Πιλοτική/ Βιομηχανική κλίμακα

4.5.2.1 Βιοκαύσιμα

Ορισμένοι βιομηχανικοί κλάδοι χρησιμοποιούν ήδη την EYE σε μεγάλη κλίμακα. Το πιο αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι η εξαγωγή υλικών με βάση την κυτταρίνη στοχεύοντας στην παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων για τις βιομηχανίες βιοκαυσίμων. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το εργοστάσιο FUTUROL στη Γαλλία, όπου αναπτύσσονται νέες ενεργειακές λύσεις συμπεριλαμβανομένης της EYE βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλη). Ο κύριος στόχος είναι η παραγωγή αποτελεσματικών εναλλακτικών λύσεων για την παραγωγή ενέργειας αξιοποιώντας τα γεωργικά παραπροϊόντα [51].

4.5.2.2 Βιοδιυλιστήρια

Νέες εταιρείες αναπτύσσουν την EYE ακολουθώντας την αρχή του βιοδιυλιστηρίου. Το βιοδιυλιστήριο ορίζεται ως μια μονάδα επεξεργασίας, όπου οι πρώτες ύλες βιομάζας μετατρέπονται και εξάγεται ένα φάσμα προϊόντων υψηλής αξίας. Αυτή η αρχή οδηγεί στη μείωση του κόστους παραγωγής, αφού κάθε φάση που παράγεται από την εκχύλιση είναι πολύτιμη (υδατικό εκχύλισμα, ελαιώδης φάση, μη υδρολυμένο υπολειμματικό υλικό, γαλάκτωμα). Για παράδειγμα, η γαλλική εταιρεία βιοτεχνολογίας BIOLIE έχει αναπτύξει μια νέα τεχνολογία που βασίζεται σε αυτήν την ιδέα. Η εκχύλιση της φυτικής βιομάζας πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας κατάλληλα διαμορφωμένα κοκτέιλ ενζύμων και οδηγεί στην παραγωγή ελαίων και ενεργών συστατικών. Αυτή η εφαρμογή της EYE επί του παρόντος ελάχιστα αξιοποιείται, αλλά οι δυνατότητές της είναι πολλά υποσχόμενες [51].

4.5.2.3 Τρόφιμα φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα, αλλά κυρίως ως βιοκαταλύτες για τη σύνθεση ή τις τροποποιήσεις μορίων. Για παράδειγμα, οι εταιρείες Roquette και Cargill χρησιμοποιούν ενζυμικές διεργασίες για την παραγωγή συστατικών που προέρχονται από πολυσακχαρίτες (άμυλο, ολιγοσακχαρίτες). Ειδικότερα, από τη δεκαετία του 1960, η Roquette εφάρμοσε την πρώτη ενζυμική βιομηχανική αντίδραση για τη βιομετατροπή του αμύλου και την παραγωγή σιροπιών

ζάχαρης. Επίσης, η EYE μπορεί να αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή φυτικών πρωτεϊνών και την αντικατάσταση των πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης. Επί παραδείγματι, η πρωτεΐνη RuBisCO (ριμπουλόζη-1,5-διφωσφορική καρβοξυλάση/οξυγενάση), της οποίας η κύρια λειτουργία είναι να καταλύει το πρώτο βήμα της δέσμευσης του CO₂ στους περισσότερους αυτότροφους οργανισμούς, θεωρείται ως η πιο άφθονη φυτική πρωτεΐνη στη Γη και είναι στο επίκεντρο των ερευνών για τα υποκατάστατα πρωτεΐνης κρέατος. Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα NIZO (Ολλανδία) χρησιμοποιεί πρωτεάσες για την παραγωγή και εξαγωγή υψηλής αξίας πεπτιδίων από πρωτεΐνες για τη βιομηχανία τροφίμων. Η EYE αξιοποιείται επίσης βιομηχανικά ως ένα βήμα προεπεξεργασίας των φυτικών υλικών για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των μορίων-στόχων και επιτρέπει τη μείωση του χρόνου αντίδρασης [51].

Η υποβοηθούμενη από ένζυμα εκχύλιση επιτρέπει την παραγωγή μιας ευρείας ποικιλίας βιοδραστικών ενώσεων. Στον Πίνακα 4 παρατίθεται μια σύντομη λίστα βιοδραστικών ενώσεων που παράγονται με διαδικασίες ενζυμικής εκχύλισης [37].

Πίνακας 4: Κατάλογος βιοδραστικών ενώσεων βιομηχανικής σημασίας που λαμβάνονται με EYE από φυτά

Τύπος Προϊόντος	Προϊόν	Φυτική πρώτη ύλη	Ένζυμο
Έλαια και καροτενοειδή	Έλαια	Σπόρος σταφυλιού	Κυτταρινάση, πρωτεάση, ξυλανάση, πηκτινάση
	Καροτενοειδή	Ταγέτης	Viscozyme, Pectinex κ.α.
	Καροτένιο	Υπολείμματα καρότου	Pectinex
	Λυκοπένιο	Ντομάτα	Κυτταρινάση, πηκτινάση
	Καψαϊκίνη	Τσίλι	Κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες πηκτινάσες
	Ανθοκυανίνες	Φλοιός σταφυλιού	Pectinex
Γλυκοσίδια	Σακχαρόζη	Υπολείμματα φλούδας γκρέιπφρουτ	Κυτταρινάσες, πηκτινάσες
	Ολιγοσακχαρίτες	Πίτουρο ρυζιού	Κυτταρινάσες
	Άμυλο	Κασάβα	Πηκτινάση
	Πηκτίνη	Κολοκύθα	Ξυλανάση, β-γλυκοσιδάση, ενδοπολυγαλακτουρονάση & πηκτινестεράση
Λοιπά	Βανιλίνη	Πράσινοι λοβοί βανίλιας	β-γλυκοσιδάση, πηκτινάση

	Φλαβονοειδή	Φλοιός μανταρινιού	Ανασυνδυασμένη ραμνοσιδάση
	Φαινολικά	Φλοιός κίτρου	Celluzyme MX
	Πρωτεΐνες	Φακές και λευκά φασόλια	Γλυκοαμυλάσες
	Πολυφαινόλες	Υπολείμματα σταφυλιού	Πηκτινάση
	Κατεχίνες	Τσάι	Πεψίνη

Κεφάλαιο 5 Υλικά και μέθοδοι

5.1 Αντιδραστήρια, πρώτη ύλη, ενζυμικό σκεύασμα & εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και οι αντίστοιχες εταιρείες από τις οποίες προμηθεύτηκαν, αναγράφονται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Κατάλογος αντιδραστηρίων, τυποποιημένων χημικών παρασκευασμάτων και αντίστοιχων εταιρειών

A/A	Όνομασία αντιδραστηρίου	Εταιρεία
1	Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	CARLO ERBA Reagents GmbH
2	Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3)	Acros Organics (Thermo Scientific)
3	Γαλλικό οξύ	Sigma Life Science (Sigma-Aldrich)
4	Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2)	Merck KGaA
5	Χλωριούχο Αργίλιο (AlCl_3)	Acros Organics (Thermo Scientific)
6	Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)	Sigma-Aldrich
7	Κατεχίνη	Sigma-Aldrich
8	DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλιο)	Sigma-Aldrich
9	Μεθανόλη, HPLC grade (MeOH)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
10	Μεταφωσφορικό οξύ	Thermo Scientific
11	Υπερκάθαρο νερό, HPLC grade	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
12	Ασκορβικό οξύ	Merck KGaA
13	Οξαλικό οξύ	Merck KGaA
14	D-(-)- ισοασκορβικό οξύ	Fisher Scientific
15	Δεϋδροασκορβικό οξύ	Fluorochem
16	Κιτρικό οξύ, άνυδρο ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	PENTA chemicals
17	Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο (Na_2HPO_4)	CARLO ERBA Reagents GmbH
18	Αιθανόλη, HPLC grade (EtOH)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
19	Πυκνό Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
20	3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS)	Sigma-Aldrich
21	Εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα για μέτρηση της γλυκόζης (Kit, GOPOD Format)	BIOTEXNOΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΠΕ
22	Πυκνό Θειικό οξύ (H_2SO_4)	PanReac AppliChem ITW Reagents
23	Ανθρακικό Ασβέστιο (CaCO_3)	Sigma-Aldrich
24	Χλωροφόρμιο (CHCl_3)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
25	Αζίδιο του νατρίου (NaN_3)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)

Το ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι το **Cellic[®] CTec3 HS** της εταιρείας Novozymes, το οποίο συνιστά σύμπλεγμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών. Το είδος του ενζύμου, η σύστασή του, η ενεργότητά του, καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του συνοψίζονται στον Πίνακα 6:



Εικόνα 22: Ενζυμικό σκεύασμα Cellic[®] CTec3 HS της Novozymes

Πίνακας 6: Στοιχεία του ενζυμικού σκευάσματος Cellic[®] CTec3 HS της Novozymes [69]

Εμπορική ονομασία	Είδος ενζύμου	Σύσταση	Βέλτιστες συνθήκες δράσης (T, pH)	Ενεργότητα (FPU/ mL σκευάσματος)
Cellic [®] CTec3 HS (Novozymes)	Κυτταρινολυτικό	Κυτταρινάσες Ημικυτταρινάσες	50-55°C 4.75-5.25	134.2

Η πρώτη ύλη, που χρησιμοποιήθηκε στη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν το **αποξηραμένο περικάρπιο του καρπού (rosehip) του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.*** Σημειώνεται ότι η πρώτη ύλη προμηθεύτηκε από τον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό-Δήμητρα (ΕΛΓΟ-Δήμητρα) και ήταν κοινή σε όλα τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Πρώτη ύλη του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.*

Το αποξηραμένο περικάρπιο του καρπού *R. canina L.* αλέστηκε και διήλθε από κόσκινο, έτσι ώστε να προκύψουν 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας (<500 μm , 500-600 μm και 850-1000 μm), και εν συνεχεία αποθηκεύτηκε σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Τα όργανα και οι συσκευές του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων και των μετρήσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7:

Πίνακας 7: Κατάλογος οργάνων και συσκευών

A/A	Είδος οργάνου/ συσκευής	Μοντέλο/ Εταιρεία
1	Επιδαπέδιος Επωστήρας	ZHWY-211C, ZHICHENG [®]
2	Επιδαπέδιος Επωστήρας	ZWY-211B, ZHICHENG [®]
3	Επωστήρας	ZHWY-100B, ZHICHENG [®]
4	Θερμοστατούμενος ηλεκτρικός αναδευτήρας	Thermomixer comfort with 2ml Block, Eppendorf [®]
5	Φωτόμετρο UV-Vis	S-22 UV-Vis Spectrophotometer, BOECO
6	Φωτόμετρο microplate reader	SpectraMax [®] ABS Plus, MOLECULAR DEVICES
7	Φωτόμετρο UV-Vis	UV-1280, Shimadzu
8	Φυγόκεντρος	TJ-6, Beckman Coulter
9	Μικροφυγόκεντρος πάγκου	3200 Microcentrifuge, Eppendorf [®]
10	Μικροφυγόκεντρος πάγκου	Prism [™] Laboratory mini centrifuge 6 000 rpm, Labnet International
11	Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	ABS 80-4N, KERN & SOHN GmbH
12	Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	M6202, Bel Engineering [®]
13	Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο	(-)
14	Συσκευή μέτρησης pH	pH 537, WTW
15	Συσκευή διήθησης υπό κενό	MASTER JET, Heto
16	Αντλία κενού	Vacuum / Pressure Pumps, PALL [®]
17	Ηλεκτρικός μύλος άλεσης καφέ, 180W	TSM6A013B, Bosch
18	Μαγνητικός αναδευτήρας – Θερμαντική πλάκα (1600 rpm, 180 °C)	Nahita-Blue 692, Auxilab S.L.
19	Vortex σωληναρίων ρυθμιζόμενο	RSLAB-6PRO, RS Lab
20	Αυτόκαυστο	Labo Autoclave MIs-3020U, Sanyo
21	Ξηραντήρας	BED 53, WTB Binder

5.2 Περιγραφή πειραμάτων

5.2.1 Ανάλυση σύστασης περικαρπίου του καρπού της *Rosa canina L.*

Η υγρασία του περικαρπίου, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, τα λιπαρά και η τέφρα προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους της Association of Official Analytical Chemists-AOAC [70]. Ειδικότερα, η υγρασία προσδιορίστηκε μετά από ξήρανση του δείγματος για 16 h σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C. Ακολουθεί ψύξη του δείγματος σε ξηραντήρα και ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό. Η πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldhal ($N \times 6.25$) και η τέφρα με καύση του δείγματος στους 550°C. Τα λιπαρά προσδιορίστηκαν σταθμικά μετά από εκχύλιση 6 ωρών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το χλωροφόρμιο σε συσκευή Soxhlet. Οι υδατοδιαλυτές ουσίες προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο του NREL [71].

Υδατικό αιώρημα της πρώτης ύλης συγκέντρωσης 5% (β/ο) εκχυλίζεται για 60 λεπτά στους 50°C. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, το στερεό υπόλειμμα (Σ.Υ.) εκπλένεται με νερό και ακολουθεί ξήρανση για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύξη σε ξηραντήρα και ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό (Σ.Υ.1). Το Σ.Υ.1 υπόκειται σε απομάκρυνση πρωτεϊνικών συστατικών. Τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M pH=7.5 στο οποίο περιέχεται 0.02% (β/ο) αζιδίου του νατρίου και 2.5 mg/γ δείγματος του πρωτεολυτικού ενζύμου Pronase (τρυσίνη). Πραγματοποιείται επώαση σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα στους 40°C για 6 ώρες [72]. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται διαδοχικά με νερό, αιθανόλη και αιθέρα. Τέλος, το ελεύθερο πρωτεϊνών υλικό ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (Σ.Υ.2).

Το Σ.Υ.2 τοποθετείται σε απιονισμένο νερό (100 ml νερού/γ δείγματος) και υποβάλλεται σε ήπιο βρασμό για 2 ώρες. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται με νερό θερμοκρασίας βρασμού. Τέλος, το υλικό ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (Σ.Υ.3).

Η απομάκρυνση της πηκτικής πραγματοποιείται με χρήση υδατικού διαλύματος 0.25% (β/ο) οξαλικού αμμωνίου. Χρησιμοποιούνται 50 ml διαλύματος/ γ δείγματος του προηγούμενου σταδίου (Σ.Υ.3), και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 85°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση σε γυάλινο, ξηρό, προζυγισμένο ηθμό και έκπλυση του στερεού πρώτα με νερό, στη συνέχεια δύο φορές με 95% αιθανόλη και τέλος με αιθέρα [73]. Τέλος, το υλικό ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται (Σ.Υ.4).

Το Σ.Υ.4 τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη, προστίθεται αιθανόλη (100 ml αιθανόλης/1.5 γ δείγματος) και τίθεται σε θερμοκρασία βρασμού παρουσία κάθετου ψυκτήρα για 3 ώρες. Το στερεό υπόλειμμα ανακτάται με διήθηση υπό κενό και εκπλένεται δύο φορές με αιθανόλη και νερό [72]. Τέλος, το υλικό ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (Σ.Υ.5).

Στο Σ.Υ.5 προστίθεται διάλυμα NaOH (10%, β/ο σε νερό) (20 ml διαλύματος/γδείγματος) ακολουθεί επώαση 30°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια το στερεό διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με νερό έως η τιμή του pH να γίνει ίση με 7.0. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνεται η ημικυτταρίνη. Τέλος, το εναπομείναν υλικό (Σ.Υ.6) ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό.

Ακολουθεί όξινη υδρόλυση (Σ.Υ.6) της κυτταρίνης. Αρχικά, προστίθεταιθειικό οξύ, 72% στο γυάλινο ηθμό που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο. Το δείγμα παραμένει παρουσία του θειικού οξέος για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση του εναπομείναντος στερεού με νερό έως η τιμή του pH να γίνει ίση με 7.0. Τέλος, το εναπομείναν υλικό ξηραίνεται για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται [74].

Προσδιορισμός σακχάρων

Τα ελεύθερα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη) προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), με το σύστημα LC-20AD της εταιρείας Shimadzu. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Aminex HPX 87P (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, Η.Π.Α.) σε θερμοκρασία 85°C (Εικόνα 24). Ο διαλύτης έκλουσης ήταν υπερκάθαρο νερό, η στήλη εκλούονταν με ροή 0.6 mL/min και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν δείκτης διάθλασης.



Εικόνα 24: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

5.2.2 Συμβατική εκχύλιση

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με υδροαιθανολικό διάλυμα (αιθανόλη/νερό, 70/30 ο/ο) σε συγκεντρώσεις πρώτης ύλης στο εύρος 2-8% (β/ο), θερμοκρασία 40°C για 1 h σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (thermomixer) στις 1300 rpm. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *R. canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm) σε τελικό όγκο εκχύλισης 1mL, ενώ ως διαλύτης εκχύλισης

χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5. Με το πέρας της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Το εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolics Content, TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC) και την αντιοξειδωτική δράση.

5.2.3 Ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας εξετάστηκαν ορισμένες παράμετροι, οι οποίες επηρεάζουν την απόδοση της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου, όπως η αναλογία στερεού-υγρού, ο χρόνος εκχύλισης, η κοκκομετρία πρώτης ύλης και το ενζυμικό φορτίο. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, σε κάθε ένα από τα οποία εξετάστηκε μία παράμετρος σε συνδυασμό με τον χρόνο εκχύλισης, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι ήταν σταθερές. Η επιλογή της θερμοκρασίας εκχύλισης ήταν κατάλληλη (50°C), έτσι ώστε να βρίσκεται στο θερμοκρασιακό εύρος της βέλτιστης δράσης του ενζύμου Cellic CTec3, ενώ η τιμή του pH επιλέχθηκε έτσι ώστε να βρίσκεται πλησίον του βέλτιστου εύρους, αλλά και για να υπάρχει η δυνατότητα μελέτης της συνεργιστικής δράσης του Cellic CTec3 με άλλο ένζυμο σε μελλοντική έρευνα. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στο σύνολο των πειραμάτων είναι το ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5.5) υδατικού διαλύματος κιτρικού οξέος 50mM και υδατικού διαλύματος όξινου φωσφορικού νατρίου 50mM. Οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα σε επωαστήρες με σταθερό ρυθμό ανάδευσης ρυθμισμένο στις 180 rpm και παράλληλα πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες από όλο τον όγκο του συστήματος εκχύλισης (υγρή και στερεή φάση) σε διάφορες χρονικές στιγμές. Σημειώνεται ότι ο όγκος εκχύλισης και οι όγκοι δειγματοληψιών ήταν κατάλληλοι ώστε να μη διαταραχθεί το σύστημα εκχύλισης. Με το πέρας κάθε δειγματοληψίας ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού. Ύστερα, τα εκχυλίσματα αποθηκεύονταν σε συνθήκες κατάψυξης με στόχο να κατασταλεί η δράση του ενζύμου, έως ότου να χαρακτηριστούν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolics Content, TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC) και την αντιοξειδωτική δράση τους.

5.2.3.1 Μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού

Εξετάστηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της στερεής πρώτης ύλης για σταθερή αναλογία στερεού-υγρού (3% β/ο) και σταθερό ενζυμικό φορτίο (10 FPU/g πρώτης ύλης) του σκευάσματος Cellic CTec3. Το αποξηραμένο περικάρπιο του καρπού *R. canina L.* αλέστηκε και διήλθε από κόσκινο, έτσι ώστε να προκύψουν 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας: <500 μm, 500-600 μm και 850-1000 μm (Εικόνα 25). Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5, ενώ η θερμοκρασία εκχύλισης και ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ρυθμίστηκαν στους 50°C και στις 180 rpm αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος κάθε εκχύλισης ήταν 50mL και ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 48 ώρες, στη διάρκεια του οποίου

έγιναν πέντε δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 2, 4, 6, 24 και 48h). Το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν για κάθε κοκκομετρία.



Εικόνα 25: Κοσκίνιση αποξηραμένου περικαρπίου του καρπού *R. canina L.* και 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας: <500 μm , 500-600 μm και 850-1000 μm .

Οι συνθήκες του πειράματος για τη μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού περικαρπίου του καρπού *R. canina L.* συνοψίζονται στον Πίνακα 8:

Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού περικαρπίου του καρπού *R. canina L.*

Κοκκομετρία	<500 μm , 500-600 μm και 850-1000 μm
Αναλογία στερεού-υγρού	3% β/ο
Ένζυμο	Cellic CTec3
Ενζυμική ενεργότητα	10 FPU/g πρώτης ύλης
Διαλύτης εκχύλισης	Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού
Τελικός όγκος εκχύλισης	50 mL
pH	5.5
Θερμοκρασία	50°C
Ρυθμός ανάδευσης	180 rpm
Διάρκεια εκχύλισης	48 ώρες
Δειγματοληψίες	2, 4, 6, 24 και 48h

5.2.3.2 Μελέτη επίδρασης αναλογίας στερεού - υγρού

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση της αναλογίας στερεού – υγρού σε σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g πρώτης ύλης του σκευάσματος Cellic CTec3. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 2, 4, 6 και 8% β/ο. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *R. canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm) σε τελικό όγκο εκχύλισης 50mL. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5, ενώ η θερμοκρασία εκχύλισης και ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ρυθμίστηκαν στους 50°C και στις 180 rpm αντίστοιχα. Τέλος, ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 48 ώρες, στη διάρκεια του οποίου έγιναν έξι δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 2, 4, 6, 8, 24 και 48h). Σημειώνεται ότι το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν για κάθε αναλογία στερεού-υγρού.

Οι συνθήκες του πειράματος για τη μελέτη επίδρασης της αναλογίας στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού *R. canina L.* συνοψίζονται στον Πίνακα 9:

Πίνακας 9: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης της αναλογίας στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*

Κοκκομετρία	Πούδρα (<500 μm)
Αναλογία στερεού-υγρού	2, 4, 6 και 8% β/ο
Ένζυμο	Cellic CTec3
Ενζυμική ενεργότητα	2.5 FPU/g πρώτης ύλης
Διαλύτης εκχύλισης	Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού
Τελικός όγκος εκχύλισης	50 mL
pH	5.5
Θερμοκρασία	50°C
Ρυθμός ανάδευσης	180 rpm
Διάρκεια εκχύλισης	48 ώρες
Δειγματοληψίες	2, 4, 6, 8, 24 και 48h

5.2.3.3 Μελέτη επίδρασης υψηλών αναλογιών στερεού - υγρού (High Solid)

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού (High Solid) υπό σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο του σκευάσματος Cellic CTec3. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 20, 25, 33 και 50% β/ο ή εναλλακτικά οι αναλογίες στερεού-υγρού 1:5, 1:4, 1:3 και 1:2 αντίστοιχα. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *R. canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm) σε τελικό όγκο εκχύλισης 20mL. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5, ενώ η θερμοκρασία εκχύλισης και ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ρυθμίστηκαν στους 50°C και στις 180 rpm αντίστοιχα. Τέλος, ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 48 ώρες, στη διάρκεια του οποίου έγιναν τρεις δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 6, 24 και 48h). Σημειώνεται ότι το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν για κάθε αναλογία στερεού-υγρού.

Οι συνθήκες του πειράματος για τη μελέτη επίδρασης των υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού *R. canina L.* συνοψίζονται στον Πίνακα 10:

Πίνακας 10: Πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης των υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού για το στερεό περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*

Κοκκομετρία	Πούδρα (<500 μm)
Αναλογία στερεού-υγρού	1:5, 1:4, 1:3 και 1:2
Ένζυμο	Cellic CTec3
Ενζυμικό φορτίο	1% ο/ο
Διαλύτης εκχύλισης	Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού
Τελικός όγκος εκχύλισης	20 mL
pH	5.5
Θερμοκρασία	50°C
Ρυθμός ανάδευσης	180 rpm
Διάρκεια εκχύλισης	48 ώρες
Δειγματοληψίες	6, 24 και 48h

Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*) για την αντίστοιχη αναλογία στερεού-υγρού παρουσιάζεται στον Πίνακα 11:

Πίνακας 11: Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*) για την αντίστοιχη αναλογία στερεού-υγρού

Αναλογία στερεού-υγρού	Ενζυμική ενεργότητα (FPU/ g πρώτης ύλης)
1:5	6.71
1:4	5.37
1:3	4.02
1:2	2.68

5.2.3.4 Μελέτη επίδρασης ενζυμικού φορτίου

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου του σκευάσματος Cellic CTec3 για σταθερή αναλογία στερεού-υγρού (1:4). Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα εξής ενζυμικά φορτία: 0.5%, 1%, 1.5% και 2% ο/ο. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *R. canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm) σε τελικό όγκο εκχύλισης 20mL. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5, ενώ η θερμοκρασία εκχύλισης και ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ρυθμίστηκαν στους 50°C και στις 180 rpm αντίστοιχα. Τέλος, ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 48 ώρες, στη διάρκεια του οποίου έγιναν τρεις δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 6, 24 και 48h). Σημειώνεται ότι το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν για κάθε ενζυμικό φορτίο.



Εικόνα 26: Πειράματα μελέτης επίδρασης στην EYE αναλογίας στερεού-υγρού και ενζυμικού φορτίου

Οι συνθήκες του πειράματος για τη μελέτη επίδρασης του ενζυμικού φορτίου στην εκχύλιση του στερεού περικάρπιου του καρπού *R. canina L.* συνοψίζονται στον Πίνακα 12:

Πίνακας 12: Οι πειραματικές συνθήκες για τη μελέτη επίδρασης του ενζυμικού φορτίου στην εκχύλιση του στερεού περικάρπιου του καρπού *R. canina L.*

Κοκκομετρία	Πούδρα (<500 μm)
Αναλογία στερεού-υγρού	1:4
Ένζυμο	Cellic CTec3
Ενζυμικό φορτίο	0.5%, 1%, 1.5% και 2% ο/ο
Διαλύτης εκχύλισης	Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού
Τελικός όγκος εκχύλισης	20 mL
pH	5.5
Θερμοκρασία	50°C
Ρυθμός ανάδευσης	180 rpm
Διάρκεια εκχύλισης	48 ώρες
Δειγματοληψίες	6, 24 και 48h

Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*) για το αντίστοιχο ποσοστό % ο/ο ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 13:

Πίνακας 13: Η ενζυμική ενεργότητα του Cellic CTec3 εκφρασμένη ανά g στερεής πρώτης ύλης (περικάρπιο του καρπού *R. canina L.*) για το αντίστοιχο ποσοστό % ο/ο ενζύμου

Ποσότητα ενζύμου (% ο/ο)	Ενζυμική ενεργότητα (FPU/ g πρώτης ύλης)
0.5	2.68
1	5.37
1.5	8.05
2	10.74

5.3 Πειραματικός Σχεδιασμός (Central Composite Design)

Η επιλογή ενός πειραματικού σχεδιασμού εξαρτάται από τους στόχους που επιδιώκονται και τον αριθμό των εξεταζόμενων παραγόντων. Μερικοί από τους κυριότερους πειραματικούς σχεδιασμούς είναι ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (full factorial design), ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (fractional factorial design), οι σχεδιασμοί επιφανειών απόκρισης (response surface design), στους οποίους υπάγονται ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (central composite design) και ο σχεδιασμός Box- Behnken, κ.α. [75].

Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) αποτελείται από (α) το παραγοντικό τμήμα (factorial portion), δηλαδή ένας πλήρης ή κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, όπου τα επίπεδα των παραγόντων είναι κωδικοποιημένα στις τιμές -1, +1, (β) το αξονικό τμήμα, δηλαδή ένας πρόσθετος σχεδιασμός, όπου τα σημεία προκύπτουν από τα πειράματα που βρίσκονται σε απόσταση α από το κέντρο τους (αξονικά σημεία), και (γ) το κεντρικό σημείο (central point). Ο CCD διακρίνεται σε τρία είδη: στον περιγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Circumscribed design – CCC), στον εδροκεντρωμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Face Centred Central composite design- FCC) και στον εγγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Inscribed – CCI) [75], [76].

Όπως προαναφέρθηκε, διεξήχθησαν τέσσερις πειραματικές σειρές, στις οποίες μελετήθηκε η επίδραση ενός παράγοντα τη φορά (αναλογία στερεού-υγρού, κοκκομετρία ενζυμικό φορτίο) σε συνδυασμό με την επίδραση του χρόνου. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε ένα τελικό πείραμα, στο οποίο διερευνήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση τριών παραμέτρων, δηλαδή η αναλογία στερεού-υγρού, ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο. Το συνδυαστικό αυτό πείραμα βασίστηκε στη μέθοδο του περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων. Η μήτρα του πειραματικού σχεδιασμού CCC για τρεις παράγοντες και τρία επίπεδα παρουσιάζεται στον Πίνακα 14:

Πίνακας 14: Μήτρα περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων και τριών επιπέδων [77]

	Παράγοντες		
Επαναλήψεις	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
1	1	-1	-1
1	-1	1	-1
1	1	1	-1

1	-1	-1	1
1	1	-1	1
1	-1	1	1
1	1	1	1
1	-1.682	0	0
1	1.682	0	0
1	0	-1.682	0
1	0	1.682	0
1	0	0	-1.682
1	0	0	1.682
6	0	0	0
Σύνολο πειραμάτων = 20			

Η αντιστοίχιση των παραγόντων (ή ανεξάρτητες μεταβλητές) X_1 , X_2 και X_3 με τις πειραματικές παραμέτρους, καθώς και η αντιστοίχιση των επιπέδων ± 1.682 , ± 1 και 0 με τις πειραματικές τιμές συνοψίζεται στον Πίνακα 15:

Πίνακας 15: Αντιστοίχιση των παραγόντων και των επιπέδων του περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) με τις πειραματικές συνθήκες

		<i>Επίπεδα</i>				
		-1.628	-1	0	1	1.628
<i>Παράγοντες</i>						
X_1	Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)	6.6	10	15	20	23.4
X_2	Χρόνος εκχύλισης (h)	0.6	2	4	6	7.4
X_3	Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	0.2	0.5	1	1.5	1.8

Τελικά, η μήτρα περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων και τριών επιπέδων αντικαθιστώντας τις πειραματικές τιμές διαμορφώνεται ως εξής (Πίνακας 16):

Πίνακας 16: Μήτρα περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC) τριών παραγόντων και τριών επιπέδων με πειραματικές τιμές

Επαναλήψεις	Παράγοντες		
	Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)	Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)
1	10	2	0.5
1	20	2	0.5
1	10	6	0.5
1	20	6	0.5
1	10	2	1.5
1	20	2	1.5
1	10	6	1.5
1	20	6	1.5
1	6.6	4	1
1	23.4	4	1
1	15	0.6	1
1	15	7.4	1
1	15	4	0.2
1	15	4	1.8
6	15	4	1
Σύνολο πειραμάτων = 20			

Ως μεταβλητές απόκρισης ή εξαρτημένες μεταβλητές (Y_1 , Y_2 και Y_3) του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού επιλέχθηκαν το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolics Content, TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC) και η αντιοξειδωτική δράση (δείκτης IC_{50}).

Επομένως, με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό CCC πραγματοποιήθηκαν είκοσι πειράματα εις διπλούν. Ειδικότερα, μελετήθηκαν συνδυασμοί στα εξής εύρη: (α) αναλογία στερεού υγρού 6.6-23.4 % β/ο, (β) χρόνος εκχύλισης 0.6-7.4 ώρες, και (γ) ενζυμικό φορτίο 0.2-1.8 % ο/ο. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του

καρπού *R. canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm) σε τελικό όγκο εκχύλισης 1mL. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωσφορικού με pH=5.5, ενώ η θερμοκρασία εκχύλισης και ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ρυθμίστηκαν στους 50°C και στις 1300 rpm αντίστοιχα. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (thermomixer).



Εικόνα 27: Θερμοστατούμενος αναδευτήρας (thermomixer)

Τέλος, σημειώνεται ότι τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόστηκαν είτε σε γραμμικό μοντέλο είτε σε δευτεροβάθμιο μοντέλο.

Το δευτεροβάθμιο μοντέλο περιγράφεται από την Εξίσωση 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

όπου:

Y : η εξαρτημένη μεταβλητή

β_0 : η σταθερά του μοντέλου

X_1 και X_2 : οι ανεξάρτητες μεταβλητές

β_1 και β_2 : οι συντελεστές των γραμμικών όρων

β_{11} και β_{22} : οι συντελεστές των τετραγωνικών όρων και

β_{12} : ο συντελεστής αλληλεπίδρασης των δύο όρων

Το γραμμικό μοντέλο περιγράφεται από την Εξίσωση 2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (2)$$

όπου:

Y : η εξαρτημένη μεταβλητή

β_0 : η σταθερά του μοντέλου

X_1 και X_2 : οι ανεξάρτητες μεταβλητές

β_1 και β_2 : οι συντελεστές των γραμμικών όρων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και η μοντελοποίηση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Design-Expert (Stat-Ease Inc.)

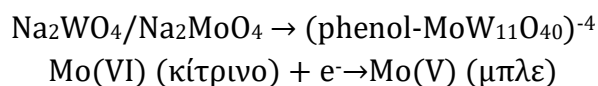
5.4 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

5.4.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)

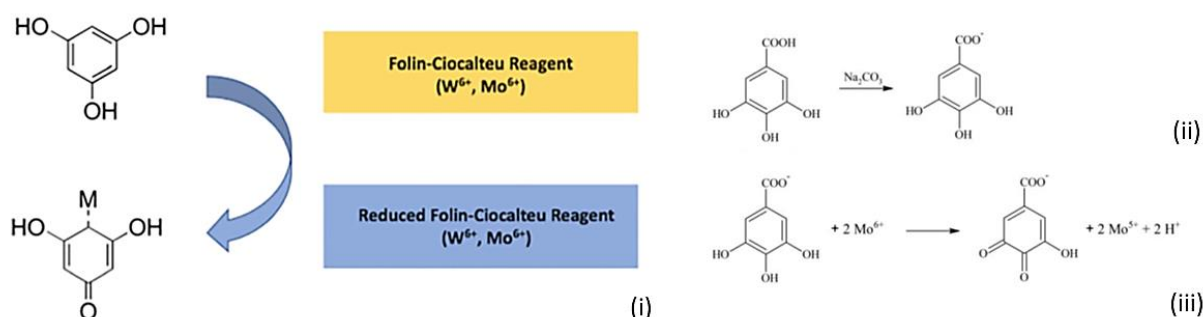
Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα *Rosa canina L.*, πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε αλκαλικό περιβάλλον.

Οι Folin και Denis αρχικά πρότειναν ένα ετεροπολικό φωσφοβολφραμικό-μολυβδαινικό αντιδραστήριο με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της τυροσίνης στις πρωτεΐνες, μέσω της έντασης του μπλε χρώματος που σχηματίζεται κατά την αντίδραση. Στη συνέχεια, οι Folin και Ciocalteu βελτιστοποίησαν το αντιδραστήριο και το 1927 πρότειναν την αντίστοιχη μέθοδο προσδιορισμού, η οποία πλέον εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων στα φυσικά προϊόντα [78], [79].

Η ανάλυση F-C είναι κατά βάση μια οξειδοαναγωγική μέθοδος, αφού βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις φαινολικές ενώσεις στα σύμπλοκα φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού οξέος σε αλκαλικές συνθήκες. Ειδικότερα, το φαινολικό ιόν ανάγει το Mo^{6+} σε Mo^{5+} και αντίστοιχα το μολυβδαίνιο οξειδώνει την υδροξυ-ομάδα στις ενώσεις των φαινολικών ιόντων (Εικόνα 28-i,iii). Η μεταφορά αυτών των ηλεκτρονίων προκαλεί αλλαγή χρώματος, η οποία στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευθεί στα 760 nm. Το μπλε χρώμα που εμφανίζεται κατά την αναγωγή του αντιδραστηρίου F-C πιστεύεται ότι οφείλεται σε ένα συντονισμένο είδος μολυβδαινίου (V), αν και ο πλήρης χαρακτηρισμός της δομής είναι ακόμα άγνωστος [79]–[81]:



Η παραπάνω αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH και ταχύτερη σε βασικό περιβάλλον, οπότε προστίθεται στο μείγμα ανθρακικό ασβέστιο (Na_2CO_3) και δημιουργούνται φαινολικά ιόντα (Εικόνα 28-ii) [82].



Εικόνα 28: (i),(iii) Οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της φαινόλης και του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, (ii) Ιοντισμός της φαινόλης σε αλκαλικό περιβάλλον Na_2CO_3 [80], [81]

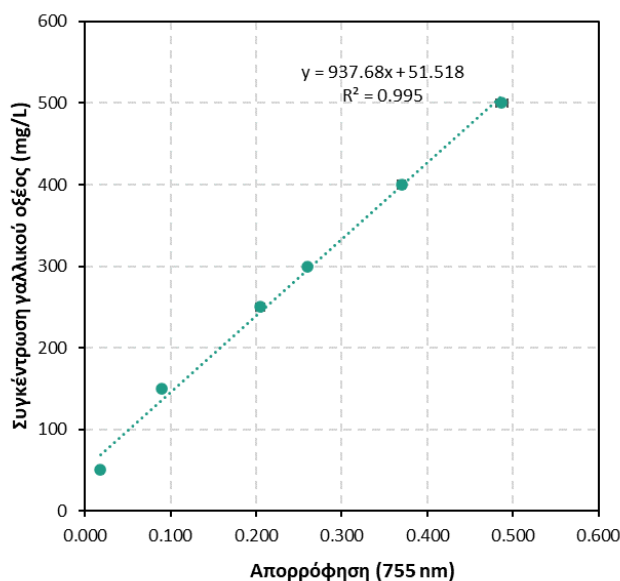
Χρησιμοποιώντας τον νόμο Lambert-Beer, η απορρόφηση στα 760 nm μπορεί στη συνέχεια να βαθμονομηθεί χρησιμοποιώντας μια πρότυπη ένωση, συνήθως το γαλλικό οξύ. Επομένως, περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις υπολογίζεται ως ισοδύναμα του προτύπου.

Γενικά, η μέθοδος F-C είναι απλή, ευαίσθητη και ακριβής, αλλά η εκλεκτικότητά της αμφισβητείται λόγω παρεμβολών από άλλα υποστρώματα στη φυτική μήτρα, όπως διαλυτά σάκχαρα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες και ορισμένες ανόργανες ουσίες, που μπορούν να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο F-C, προκαλώντας τεχνητά υψηλές τιμές απορρόφησης. Επομένως, η αντίδραση F-C δεν είναι εκλεκτική αποκλειστικά στις φαινόλες, αλλά μετρείται οιαδήποτε ουσία στη μήτρα μπορεί να ανάγει, και επομένως να η ίδια να οξειδώνεται. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι η πλειονότητα της αναγωγικής ισχύος σε μια φυτική μήτρα οφείλεται σε φαινολικές ουσίες και επομένως η ανάλυση F-C δύναται να δώσει μια ικανοποιητική και αποδεκτή προσέγγιση της περιεκτικότητας σε φαινολικά [79], [81].

Μάλιστα, για την λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων έχουν διατυπωθεί κάποιοι υποχρεωτικοί κανόνες στην εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu, όπως η σωστή αναλογία όγκου αλκαλίου και αντιδραστηρίου F-C, ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης και η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη χρώματος, η παρακολούθηση της οπτικής πυκνότητας στα 765 nm, καθώς και η χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπη φαινολική ένωση αναφοράς [79].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων *R. canina L.* σε φαινολικά περιλαμβάνει αρχικά τη λήψη 50 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος και την προσθήκη 3 mL απιονισμένου H_2O . Στη συνέχεια, προστίθενται 250 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ακολουθεί ανάδευση και αναμονή για 3 λεπτά. Έπειτα, γίνεται η προσθήκη 750 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (22%) και 950 μL απιονισμένου H_2O , το μείγμα αναδεύεται σε vortex και ακολουθεί αναμονή για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 50 μL εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 50 μL απιονισμένου νερού. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 755 nm [78], [83].

Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις υπολογίζεται μέσω της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 2), χρησιμοποιώντας ως ουσία αναφοράς το γαλλικό οξύ:



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (mg/L) για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι: $y = 937.68 * x + 51.518$ με $R^2 = 0.995$, όπου y η συγκέντρωση γαλλικού οξέος σε mg/L και x οι τιμές απορρόφησης στα 755 nm.

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 3:

$$TPC \left(\frac{mg \text{ γαλλικού οξέος}}{g} \right) = \frac{C_{gal} \left(\frac{mg \text{ γαλλικού οξέος}}{L} \right) * V_{εκχ}(L) * D}{m_{π.υ.}(g)} \quad (3)$$

όπου:

C_{gal} : η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/ L

$V_{εκχ}$: ο όγκος εκχυλίσματος σε L

$m_{π.υ.}$: η μάζα πρώτης ύλης (κονιοποιημένο περικάρπιο *R. canina L.*) σε g

D: ο παράγοντας αραίωσης (Dilution factor)

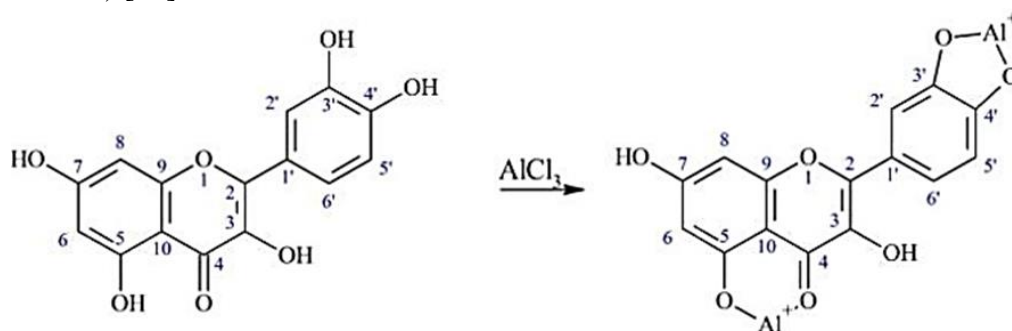


Εικόνα 29: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

5.4.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content)

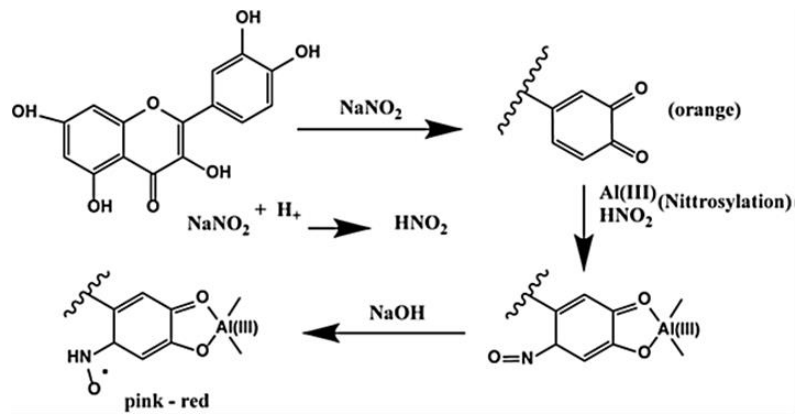
Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή στα εκχυλίσματα *Rosa canina L.*, πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο $AlCl_3$ και στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου των φλαβονοειδών με το Al^{3+} . Λόγω των πολλών καρβονυλίων και υδροξυλίων τους, τα φλαβονοειδή έχουν μεγάλη συγγένεια να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα όπως το τρισθενές Al^{3+} , κυρίως σε αναλογία 1:1, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες συμπεριλαμβανομένης της τιμής του pH και του χρόνου της αντίδρασης [84].

Το $AlCl_3$ σχηματίζει, σταθερά σε όξινο pH, σύμπλοκα με την καρβονυλομάδα στο άτομο C-4 και με την ομάδα υδροξυλίου στα γειτονικά άτομα C-3 ή C-5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επίσης, σχηματίζει συμπλέγματα, ασταθή σε όξινο περιβάλλον, με τις ορθο-διϋδροξυλομάδες στον δακτύλιο A ή B των φλαβονοειδών (Εικόνα 30) [80].



Εικόνα 30: Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της κερσετίνης (φλαβονοειδής) και του Al^{3+} [80]

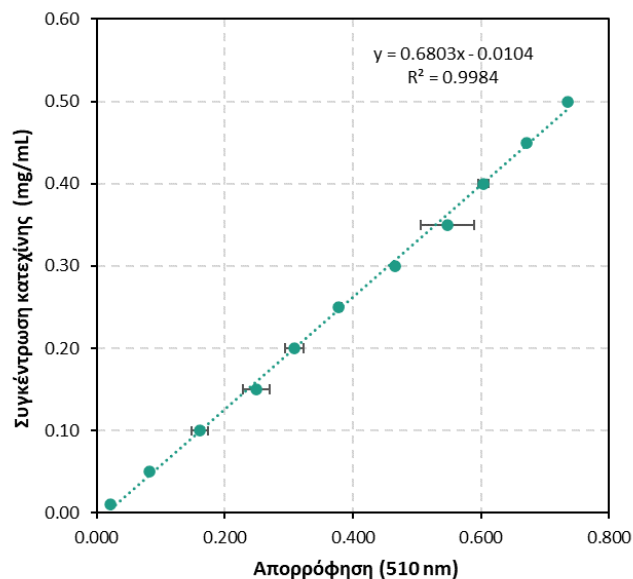
Ο προσδιορισμός με χλωριούχο αργίλιο προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Christ and Muller το 1960 για τον προσδιορισμό των παραγώγων φλαβονόλης στα φάρμακα. Με την πάροδο του χρόνου, η αρχική μέθοδος υπέστη αρκετές τροποποιήσεις, όπως η εισαγωγή νιτρώδους νατρίου ($NaNO_2$) πριν από την προσθήκη του $AlCl_3$. Το νιτρώδες νάτριο χρησιμεύει ως παράγοντας νιτροποίησης, ο οποίος είναι εκλεκτικός για τους αρωματικούς δακτυλίους που διαθέτουν κατεχολική δομή, για την παραγωγή ενός παραγώγου φλαβονοειδούς-νιτροξυλίου που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μιας νέας ζώνης απορρόφησης στα 510 nm περίπου. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο μεταξύ των φλαβονοειδών και του τρισθενούς ιόντος αργιλίου έχει αρχικά κίτρινο χρώμα, το οποίο μετατρέπεται σε ροζ-ερυθρό με την προσθήκη αλκαλικού διαλύματος καυστικού νατρίου ($NaOH$) (Εικόνα 31) [84], [85].



Εικόνα 31: Συμπλοκοποίηση Al³⁺ και φλαβονοειδών (κερσετίνη) παρουσία NaNO₂ [84]

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων *R. canina L.* σε φλαβονοειδή περιλαμβάνει αρχικά τη λήψη 100 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος και την προσθήκη 60 μL διαλύματος NaNO₃ (5%), ακολουθώντας ανάδευση και αναμονή για 6 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 120 μL διαλύματος AlCl₃ (10%) και ακολουθεί ανάδευση και αναμονή για 5 λεπτά. Έπειτα, γίνεται η προσθήκη 600 μL διαλύματος NaOH (1M) και 120 μL απιονισμένου H₂O, το μείγμα αναδεύεται σε vortex και ακολουθεί αναμονή για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 100 μL εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 100 μL απιονισμένου νερού. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 510 nm [85], [86].

Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή υπολογίζεται μέσω της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 3), χρησιμοποιώντας ως ουσία αναφοράς την κατεχίνη:



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (mg/mL) για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι: $y = 0.6803 * x - 0.0104$ με $R^2 = 0.9984$, όπου y η συγκέντρωση κατεχίνης σε mg/mL και x οι τιμές απορρόφησης στα 510 nm.

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε ολικά φλαβονοειδή (TFC) υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 4:

$$TFC \left(\frac{mg \text{ κατεχίνης}}{g} \right) = \frac{C_{cat} \left(\frac{mg \text{ κατεχίνης}}{mL} \right) * V_{εκχ} (mL) * D}{m_{π.υ.} (g)} \quad (4)$$

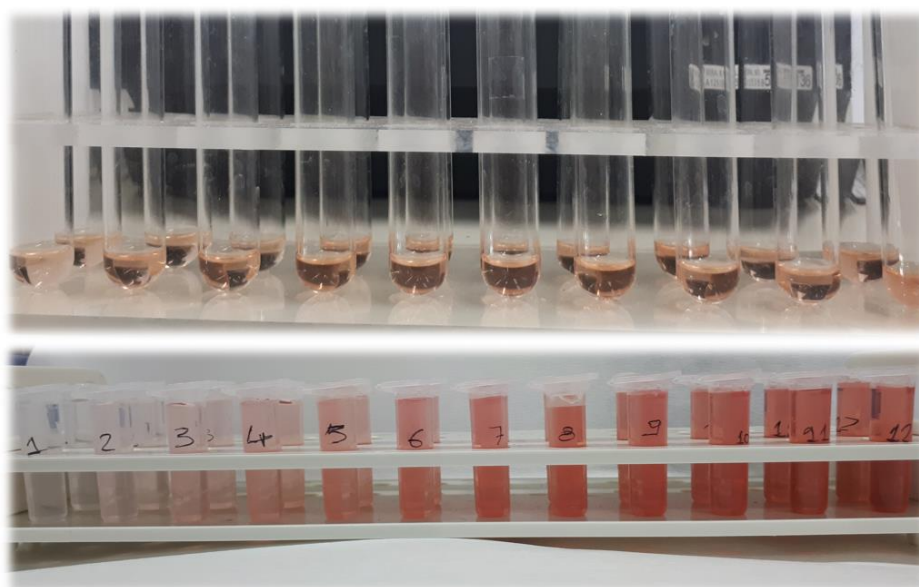
όπου:

C_{cat} : η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/ mL

$V_{εκχ}$: ο όγκος εκχυλίσματος σε mL

$m_{π.υ.}$: η μάζα πρώτης ύλης (κονιοποιημένο περικάρπιο *R. canina L.*) σε g

D: ο παράγοντας αραίωσης (Dilution factor)



Εικόνα 32: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου

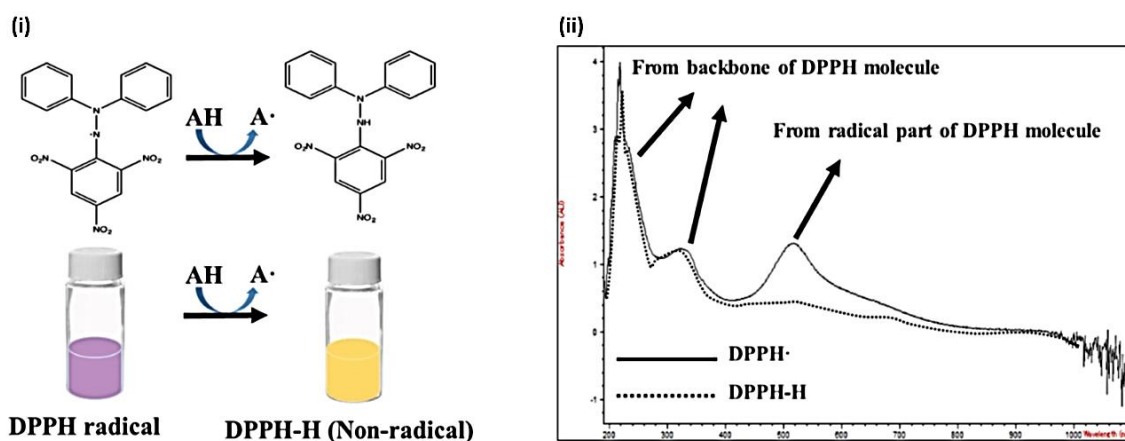
5.4.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμησης της ρίζας DPPH

Πληθώρα φασματομετρικών μεθόδων χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, με τις βασικότερες εξ αυτών να είναι η μέθοδος DPPH, η μέθοδος ABTS, η μέθοδος FRAP, η μέθοδος ORAC, η μέθοδος TRAP και η μέθοδος TBARS. Ωστόσο, οι μέθοδοι DPPH και ABTS είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι, καθώς αξιοποιούν σταθερές ρίζες, είναι ευαίσθητες, γρήγορες, απλές και δεν απαιτούν υψηλό κόστος [87].

Αυτή η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1958 από τον Blois με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας τη σταθερή ελεύθερη ρίζα α , α -διφαινυλ- β -πικρυλυδραζύλιο (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M_r=394.33$).

Έκτοτε η αρχική διαδικασία ανάλυσης DPPH έχει υιοθετηθεί από διαφορετικά εργαστήρια, αλλά με τροποποιήσεις για λόγους ευκολίας [88], [89].

Η ρίζα του DPPH διαθέτει έντονο ιώδες χρώμα, εμφανίζει μεγάλη απορρόφηση στα 515 nm και μεγάλη σταθερότητα λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού. Κατά την αντίδραση με το δείγμα, το οποίο ελέγχεται ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, η ρίζα DPPH αποσπά άτομα H και παράγεται η αντίστοιχη υδραζίνη. Η υδραζίνη φέρει κίτρινο χρώμα και απορροφά ελάχιστα στο ορατό φάσμα (Εικόνα 33). Ανάλογα με το πλήθος των φαινολικών υδρογόνων και την επιδεκτικότητά τους στην απόσπαση, η αντίδραση του κάθε αντιοξειδωτικού με το DPPH διαφοροποιείται στοιχειομετρικά και κινητικά. Κατά κανόνα ένα αντιοξειδωτικό θεωρείται αποτελεσματικό όταν ολοκληρώνει τη δράση του σε βραχύ χρονικό διάστημα και μπορεί να δεσμεύσει μεγάλο πλήθος ριζών [90].



Εικόνα 33: Οι αλλαγές της χημικής δομής (i) του χρώματος (ii) και του φάσματος απορρόφησης της ρίζας DPPH μετά από αναγωγή από ένα αντιοξειδωτικό

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς, επειδή η ρίζα DPPH μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες ρίζες, καθώς και επειδή είναι ευαίσθητη σε ορισμένες βάσεις κατά Lewis και στο οξυγόνο. Επίσης, η ρίζα DPPH μπορεί να είναι διαλυτή μόνο σε οργανικούς διαλύτες και η παρεμβολή της απορρόφησης από τις ενώσεις του δείγματος θα μπορούσε να αποτελέσει πρόβλημα για την ποσοτική ανάλυση. Τέλος, η απορρόφηση της ρίζας DPPH στη μεθανόλη και την ακετόνη μειώνεται υπό το φως [89].

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH από τα εκχυλίσματα *R. canina L.* εφαρμόστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που έχουν προτείνει οι Brand-Williams (1995) με μερικές τροποποιήσεις. Αρχικά, ζυγίζονται 2.5 mg DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Έπειτα, προστίθεται μικρή ποσότητα μεθανόλης και ακολουθεί έντονη ανακίνηση, μέχρι πλήρους διάλυσης του αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια, γίνεται πλήρωση με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή της φιάλης και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση. Παράλληλα, τα δείγματα των εκχυλισμάτων αραιώνονται κατάλληλα με απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση C_0 , και πραγματοποιούνται περαιτέρω οι υδατικές αραιώσεις: $0.8C_0$, $0.6C_0$, $0.4C_0$ και $0.2C_0$. Έπειτα, σε 100 μ L από κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος ($C_0, 0.8C_0, 0.6C_0, 0.4C_0$

και 0.2C₀) προστίθενται 3.9mL διαλύματος DPPH και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα επωάζονται σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα μετρείται η απορρόφησή τους σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 515 nm. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για την παρασκευή δύο τυφλών δειγμάτων, στα οποία αντί για 100 μL αραιωμένου εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 100 μL απιονισμένου νερού [91].

Μετά την καταγραφή των απορροφήσεων, σχεδιάστηκε το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυπελίδων (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος). Η % αναστολή ορίζεται με την Εξίσωση 5:

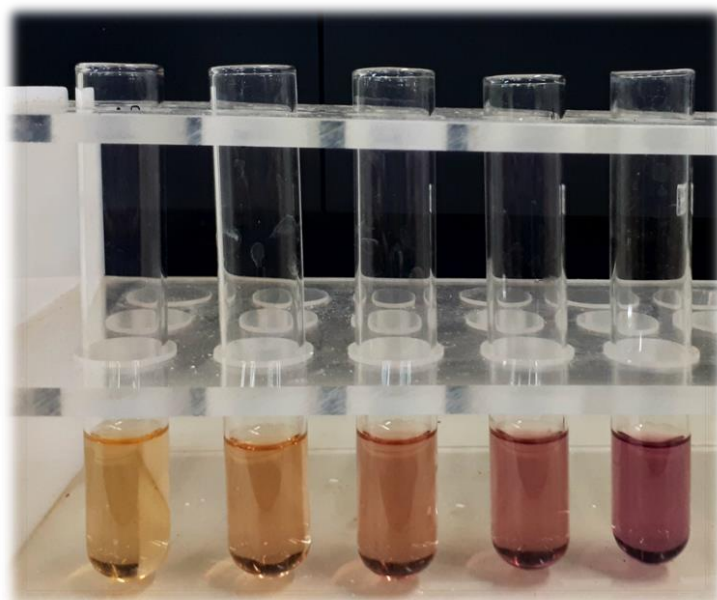
$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100\% \quad (5)$$

Όπου A_{blank} η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων μεθανόλης με DPPH και A_{sample} η απορρόφηση των διαλυμάτων που περιέχουν εκχύλισμα.

Έπειτα, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης υπολογίζεται ο δείκτης IC₅₀, ο οποίος υποδηλώνει την απαιτούμενη ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για να δεσμεύσει το 50% της ρίζας DPPH. Ο δείκτης IC₅₀ προκύπτει από την Εξίσωση 6:

$$IC_{50} \left(\frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \right) = \frac{50-b}{a} \quad (6)$$

Όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση του διαγράμματος της επί τοις εκατό αναστολής ρίζας DPPH (% Inhibition) συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυπελίδων.



Εικόνα 34: Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

5.4.4 Μέθοδος ελέγχου αντιμικροβιακών ιδιοτήτων

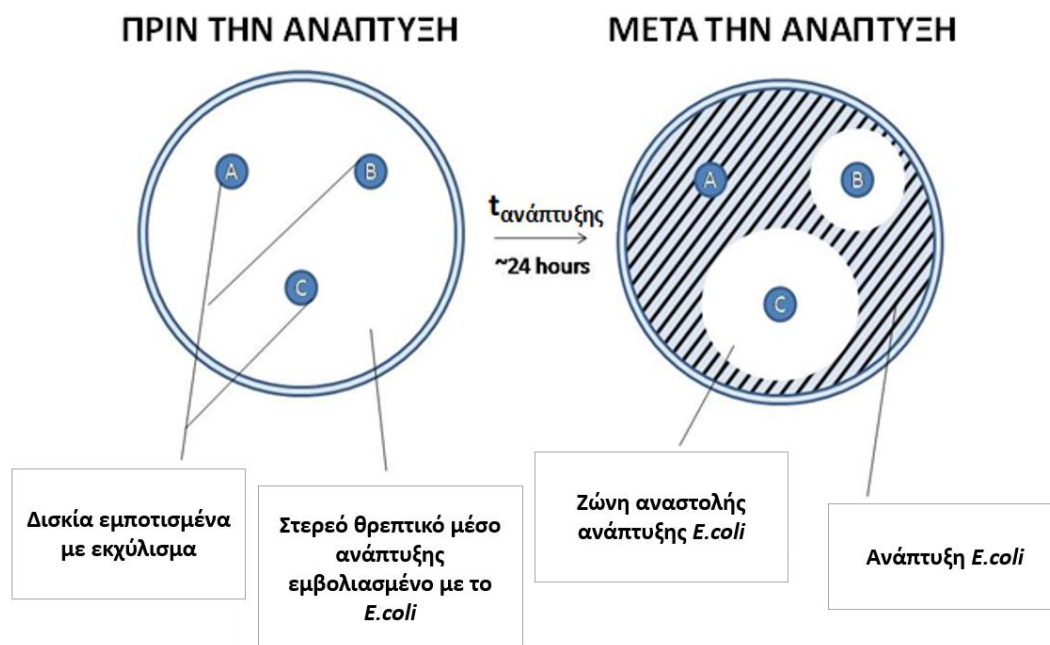
5.4.4.1 Υγρό και στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. coli*

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων ήταν το βακτήριο *E. coli*. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου ήταν το Luria-Bertan (LB), το οποίο αποτελείται από 1% (β/ο) τρυπτόνη, 1% (β/ο) NaCl και 0.5% (β/ο) εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract) σε απιονισμένο νερό. Το pH του μέσου καλλιέργειας ρυθμίστηκε στο 7.4 με τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH). Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C, 30 min). Ακολούθησε εμβολιασμός με κύτταρα του βακτηρίου *E. coli*. Η ανάπτυξη του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε στους 37°C και 180 rpm για 24 ώρες. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm.

Για την παρασκευή του στερεού υποστρώματος ανάπτυξης του βακτηρίου στο υγρό μέσο ανάπτυξης προστίθεται 1.5% (β/ο) άγαρ. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C, 30 min). Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωση τρυβλίων και κάθε τρυβλίο περιείχε περίπου 25 mL θρεπτικού μέσου.

5.4.4.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method) για την εκτίμηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων

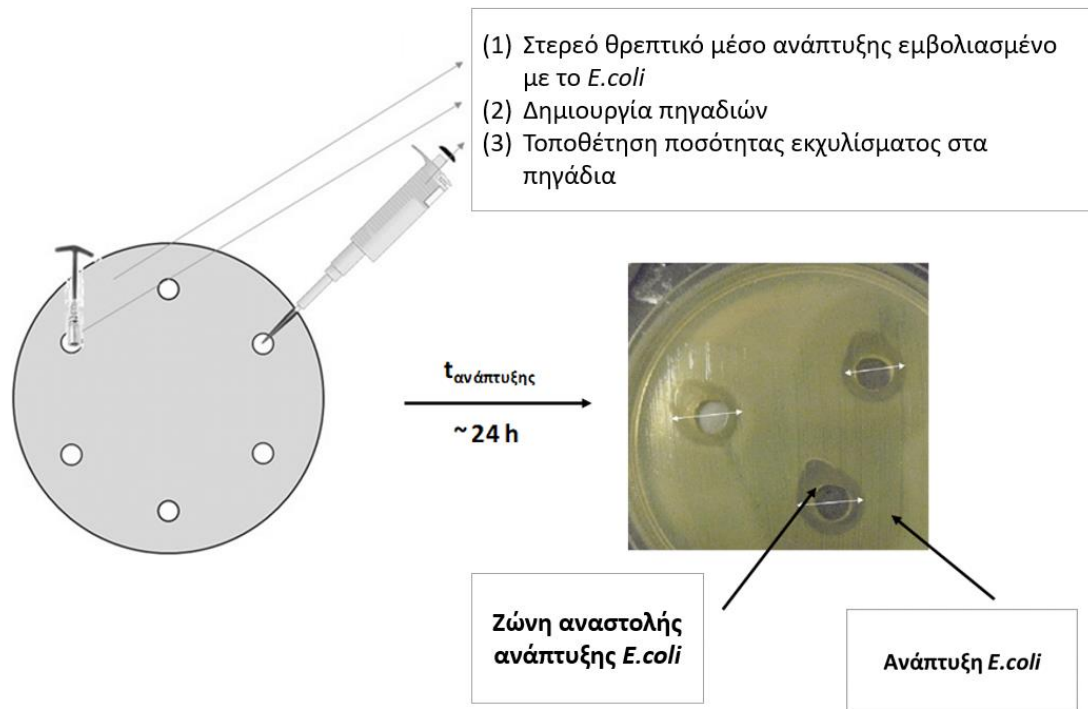
Χρησιμοποιήθηκαν δισκία διαμέτρου 5 mm από φίλτρο Whatman No.1. Τα δισκία εμποτίστηκαν με 250 μ L δείγματος εκχυλισμάτων και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων, τα οποία είχαν εμβολιαστεί με 100 μ L υγρής καλλιέργειας *E. coli* (συγκέντρωση κυττάρων: 10^6 κύτταρα/mL) [92]. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και παρατηρήθηκε εάν εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method)

5.4.4.3 Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method) για την εκτίμηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων

Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 100 μL υγρής καλλιέργειας *E. coli* (συγκέντρωση κυττάρων: 10^6 κύτταρα/ mL). Στη συνέχεια, στην επιφάνεια των τρυβλίων δημιουργήθηκαν πηγάδια (οπές) διαμέτρου περίπου 6 mm. Στα πηγάδια τοποθετήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και παρατηρήθηκε εάν εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method)

Κεφάλαιο 6 Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.1 Σύσταση περικαρπίου του καρπού της *Rosa canina L.*

Η σύσταση του περικαρπίου (υπανθίου) του καρπού της *Rosa canina L.* παρουσιάζεται στον Πίνακα 17. Η υγρασία της πρώτης ύλης προσδιορίστηκε στο $6.7 \pm 0.3\%$ (β/β). Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκε άμυλο στην πρώτη ύλη.

Πίνακας 17: Σύσταση περικαρπίου του καρπού της *R. canina L.*

Συστατικό	Περιεκτικότητα (% , β/β , ξηρή βάση)
Υδατοδιαλυτές ενώσεις	40.3 ± 1.2
Λιπαρά	5.4 ± 0.1
Πηκτίνη	11.8 ± 1.9
Κυτταρίνη	9.9 ± 0.7
Ημικυτταρίνη	10.9 ± 0.3
Πρωτεΐνη	7.5 ± 0.2
Λιγνίνη	9.5 ± 4.4
Τέφρα	2.1 ± 0.2

Τα ελεύθερα σάκχαρα που ανιχνεύθηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα ήταν γλυκόζη σε συγκέντρωση 2.3 ± 0.4 g/100 g πρώτης ύλης και φρουκτόζη σε συγκέντρωση 3.3 ± 0.1 g/100 g πρώτης ύλης. Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες τα κύρια ελεύθερα σάκχαρα που ανιχνεύθηκαν στους καρπούς της *R. canina L.* (Σμόλιαν, οροσειρά Ροδόπης, Βουλγαρία) είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη (80% του συνόλου των ελεύθερων σακχάρων), ενώ σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν η γαλακτόζη και η ξυλόζη [93].

Βιβλιογραφικά, η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη των καρπών άγριου τριαντάφυλλου διαφόρων ποικιλιών από γεωγραφικά διαφορετικές περιοχές κυμαίνεται από 2.1% έως 9.7% [93], [94], ενώ το περιεχόμενο σε λιπαρά βρίσκεται στο εύρος 0.7-5.4% [94]–[97].

Το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη βρίσκεται στο εύρος 2.3% -8.45% [94], [97]. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, τις κλιματικές συνθήκες και συσχετίζεται ακόμα και με το υψόμετρο στο οποίο αναπτύσσονται/φύονται τα φυτά [94]. Τέλος, η περιεχόμενη πηκτίνη εκφρασμένη ως ουρονικά οξέα βρίσκεται στο εύρος 9.6% -10.5% [93], [94]. Γενικά, οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύσταση των καρπών της *R. canina L.* αποδίδονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες (περιοχή που φύτεται το φυτό), καθώς και στην περίοδο συγκομιδής και τις συνθήκες αποθήκευσης.

6.2 Συμβατική εκχύλιση

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με υδροαιθανολικό διάλυμα (αιθανόλη/νερό, 70/30 ο/ο) σε συγκεντρώσεις πρώτης ύλης στο εύρος 2-8% (β/ο), θερμοκρασία 40°C, χρόνο εκχύλισης 1 ώρα και σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (thermomixer) στις 900 rpm.

Στον Πίνακα 18 συνοψίζονται τα αποτελέσματα μέτρησης της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχόμενου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) και σε φλαβονοειδή (TFC):

Πίνακας 18: Συγκέντρωση και απόδοση σε TPC και TFC κατά την εκχύλιση του περικαρπίου των καρπών της *R. canina L.* κοκκομετρίας <500 μm με υδροαιθανολικό διάλυμα (αιθανόλη/νερό, 70/30 ο/ο)

Συγκέντρωση του περικαρπίου των καρπών <i>R. canina L.</i> (% β/ο)	Απόδοση TPC, mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης (Συγκέντρωση TPC, mg γαλλικού οξέος/L εκχυλίσματος)	Απόδοση TFC, mgκατεχίνης/g πρώτης ύλης (Συγκέντρωση TPC, mgκατεχίνης/L εκχυλίσματος)
2	83.82 ± 1.3 (1777.2 ± 13.3)	60.86 ± 2.4 (1266.2 ± 24.1)
4	74.87 ± 0.2 (2388.0 ± 6.6)	57.23 ± 0.8 (2177.9 ± 24.1)
6	63.13 ± 0.0 (3434.6 ± 0.0)	55.04 ± 0.8 (3229.0 ± 38.5)
8	48.86 ± 0.6 (4767.2 ± 39.8)	52.73 ± 3.1 (4396.8 ± 216.5)

Στα Διαγράμματα 4 και 6 απεικονίζονται οι τιμές απόδοσης TPC και TFC αντίστοιχα των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων, ενώ στα Διαγράμματα 5 και 7 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TPC και TFC αντίστοιχα συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.*.

Από το Διάγραμμα 5 προκύπτουν μέσω γραμμικής παρεμβολής οι εξισώσεις που εκφράζουν την συγκέντρωση (C) και την απόδοση (Y) σε TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

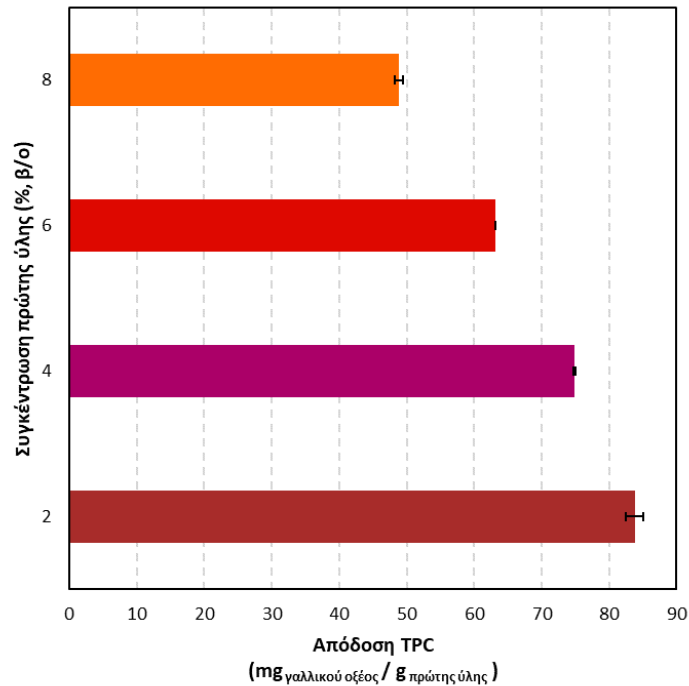
$$C_{TPC}(\text{mg/L}) = 500.84 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 587.58 \quad (R^2=0.9745)$$

$$Y_{TPC}(\text{mg/g}) = -5.8309 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 96.824 \quad (R^2=0.9897)$$

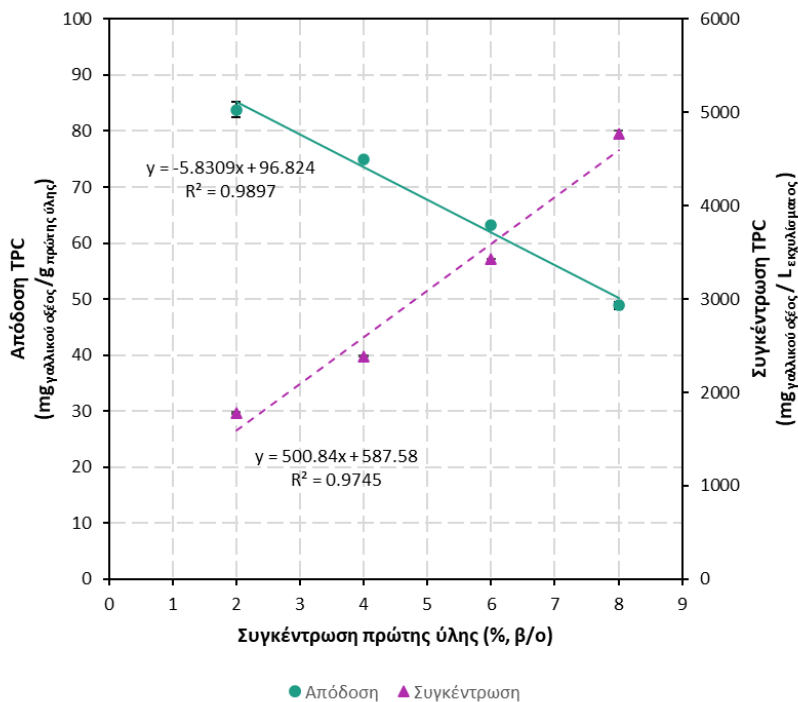
Ομοίως από το Διάγραμμα 7 προκύπτουν μέσω γραμμικής παρεμβολής οι εξισώσεις που εκφράζουν την συγκέντρωση (C) και την απόδοση (Y) σε TFC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

$$C_{TFC}(\text{mg/L}) = 522.15 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 156.74 \quad (R^2=0.997)$$

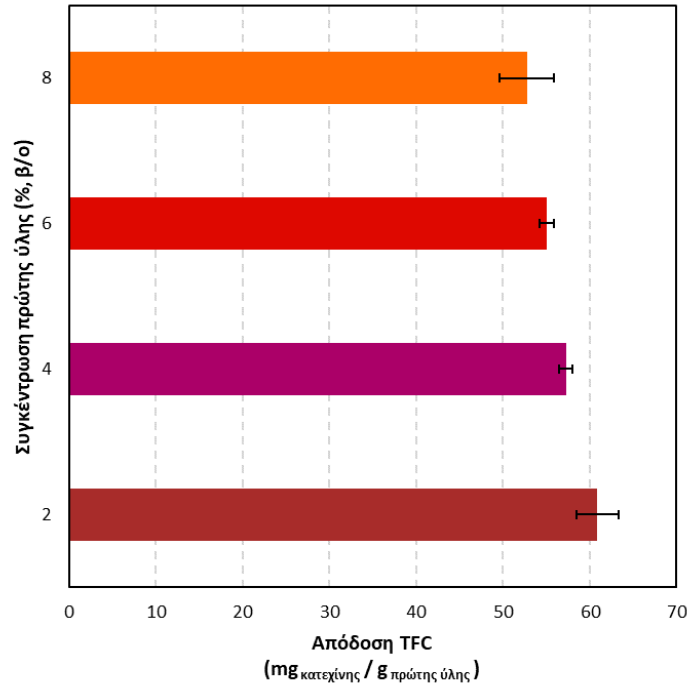
$$Y_{TFC}(\text{mg/g}) = -1.3287 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 63.109 \quad (R^2=0.9844)$$



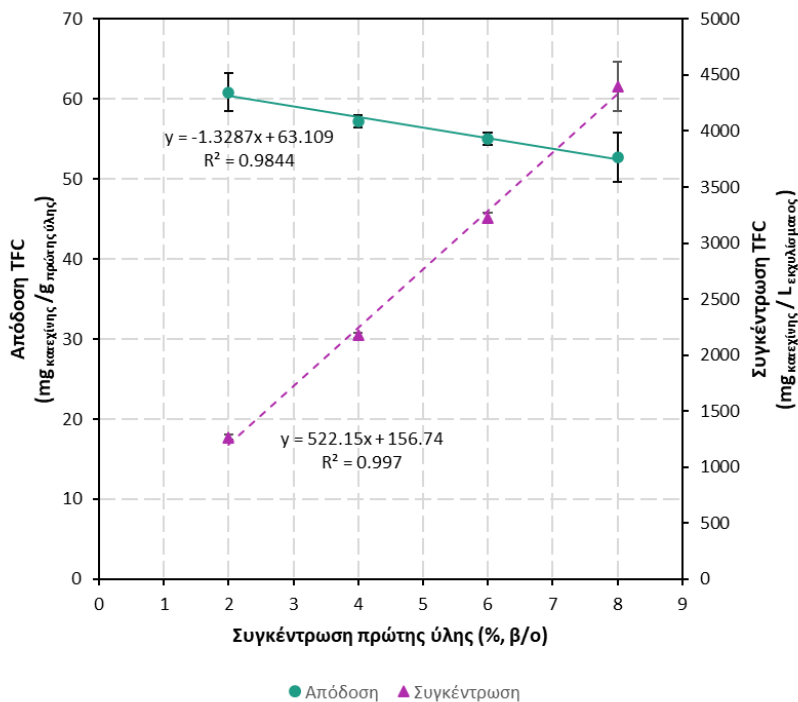
Διάγραμμα 4: Οι τιμές απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm.



Διάγραμμα 5: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm.



Διάγραμμα 6: Οι τιμές απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <math><500 \mu\text{m}</math>.



Διάγραμμα 7: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <math><500 \mu\text{m}</math>.

Όπως προκύπτει από τα ανωτέρω διαγράμματα οι συγκεντρώσεις TPC και TFC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος αυξάνονται σχεδόν ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*, γεγονός που υποδεικνύεται από τον υψηλό συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Αντίθετα, όπως είναι αναμενόμενο, οι αποδόσεις TPC και TFC μειώνονται σχεδόν αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί μαθηματικά από τις Εξισώσεις (3) και (4) (βλ. 5.4.1 και 5.4.2.), αφού η αύξηση της μάζας της πρώτης ύλης που βρίσκεται στον παρονομαστή οδηγεί στη μείωση του λόγου της απόδοσης TPC ή TFC. Η φυσική σημασία αυτής της μείωσης οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς.

Γενικά, παρατηρείται ότι οι αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή στα εκχυλίσματα, τα οποία παράγονται με βάση τη συμβατική διεργασία, είναι σχετικά χαμηλές και συνεπώς θα επιχειρηθεί η αύξησή τους μέσω της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC_{50} για τις διάφορες συγκεντρώσεις της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*.

Πίνακας 19: Δείκτης IC_{50} των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση διαφορετικών συγκεντρώσεων περικαρπίου *R. canina L.* κοκκομετρίας <500 μm .

Συγκέντρωση περικαρπίου <i>R. canina L.</i> (%, β/ο)	IC_{50} (μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος)
2	2.63 \pm 0.00
4	1.50 \pm 0.00
6	1.08 \pm 0.01
8	0.85 \pm 0.01

Όπως αναμένεται, η αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης οδηγεί σε εκχυλίσματα με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC_{50} .

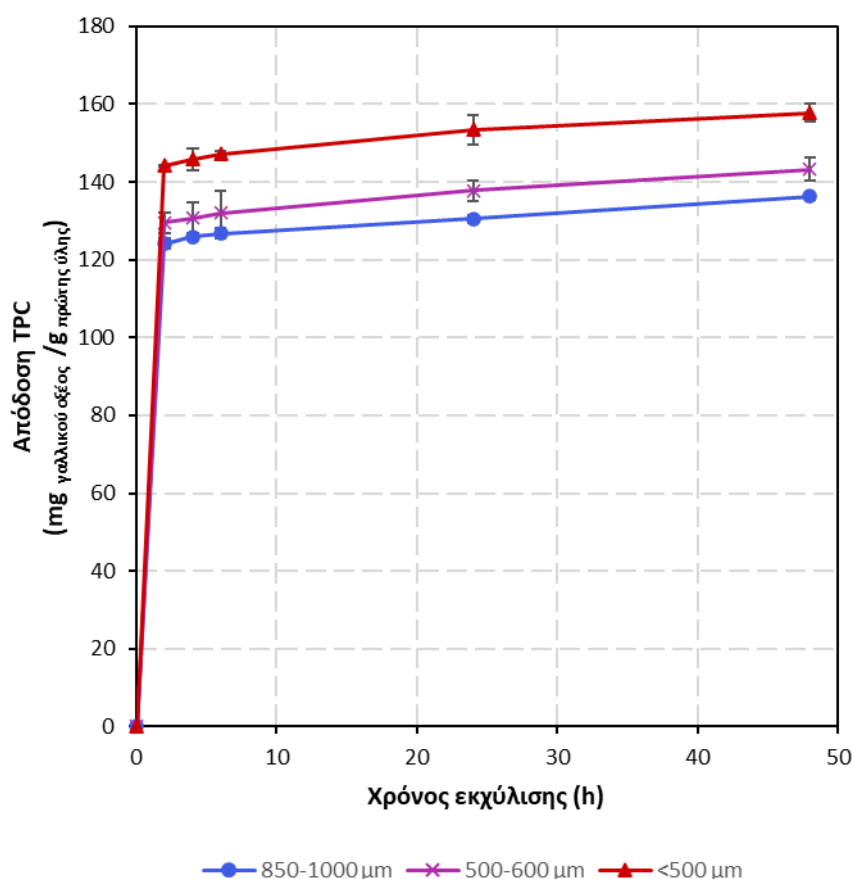
6.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενες Εκχυλίσεις

6.3.1 Μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού

Μελετήθηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης για σταθερή αναλογία στερεού-υγρού (3% β/ο) και σταθερό ενζυμικό φορτίο (10 FPU/g π.υ.) του σκευάσματος Cellic CTec3 στην εκχύλιση του αποξηραμένου περικαρπίου του καρπού *Rosa canina L.* Ειδικότερα, εξετάστηκαν 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας: <500 μm, 500-600 μm και 850-1000 μm, ενώ έγιναν πέντε δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 2, 4, 6, 24 και 48h). Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση.

6.3.1.1 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC)

Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τα τρία εύρη κοκκομετρίας:

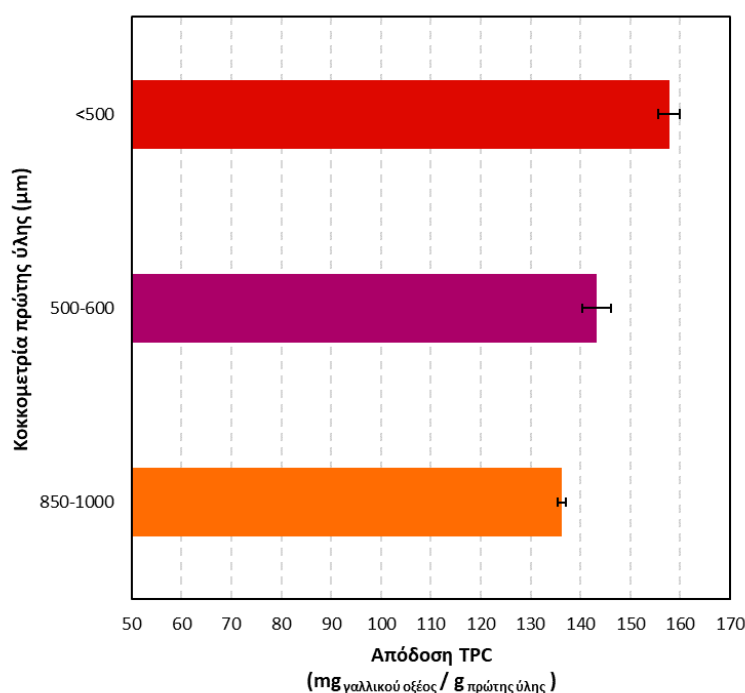


Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.

Από το Διάγραμμα 8 προκύπτει μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TPC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι αποδόσεις φαίνεται να σταθεροποιούνται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 2 και 4 ωρών. Για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης παρατηρήθηκαν μικρές μόνο αυξήσεις στην απόδοση. Ειδικότερα, η αύξηση της απόδοσης TPC μεταξύ των 2 και 4 h είναι 1.5, 0.9 και 1.1 % για εύρη κοκκομετρίας 850 μm –1 mm, 500–600 μm και <500 μm αντίστοιχα. Αυτό υποδεικνύει ότι οι χρόνοι εκχύλισης διάρκειας 4–6h είναι αρκετοί, αφού οι αυξήσεις στην απόδοση TPC έως τις 48 h είναι μικρές.

Γενικά, η επιμήκυνση του χρόνου εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των αποδόσεων εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων, αφού ο διαλύτης δύναται να εισχωρήσει καλύτερα από τους πόρους της στερεής μήτρας και να διαλυτοποιήσει τις στοχευμένες ουσίες. Επίσης, η παράταση του χρόνου εκχύλισης συχνά επιτρέπει στο ένζυμο να επιδράσει αποτελεσματικότερα στο υπόστρωμα και έτσι να ενισχυθεί η αποδόμηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος της φυτικής πρώτης ύλης [47], [98].

Στο Διάγραμμα 9 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές της απόδοσης TPC των εκχυλισμάτων για τις τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες:



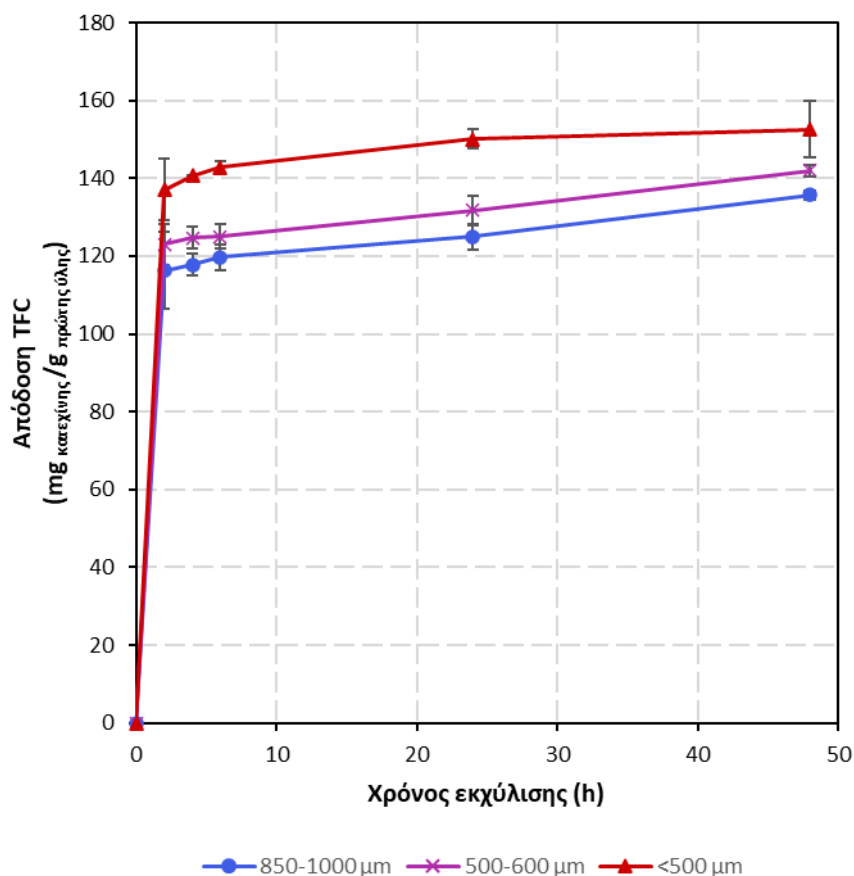
Διάγραμμα 9: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm –1 mm, 500–600 μm , <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC στο εκχύλισμα για κάθε εύρος κοκκομετρίας επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48h. Ειδικότερα, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν 136.2, 143.3 και 157.8 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. για τις κοκκομετρίες 850 μm –1 mm, 500–600 μm και <500 μm αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι φανερό ότι όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των

κόκκων της πρώτης ύλης, τόσο περισσότερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων εκχυλίζεται. Η διαπίστωση αυτή ανταποκρίνεται στα βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η καλύτερη άλεση της πρώτης ύλης αυξάνει τη διεπιφάνεια στερεάς μήτρας-διαλύτη και συνεπώς ενισχύει τον ρυθμό μεταφοράς της διαλυμένης ουσίας στον κύριο όγκο του υγρού και την απόδοση της εκχύλισης. Η μηχανική προεπεξεργασία που οδηγεί σε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων του περικαρπίου *R. canina* έχει σημαντική επίδραση στη διαδικασία εκχύλισης, καθώς σπάει τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, διευκολύνοντας την προσβασιμότητα του διαλύτη στις εκχυλιζόμενες βιοδραστικές ουσίες, αλλά και την προσβασιμότητα του ενζύμου στο υπόστρωμά του [40], [48].

6.3.1.2 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)

Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τα τρία εύρη κοκκομετρίας:

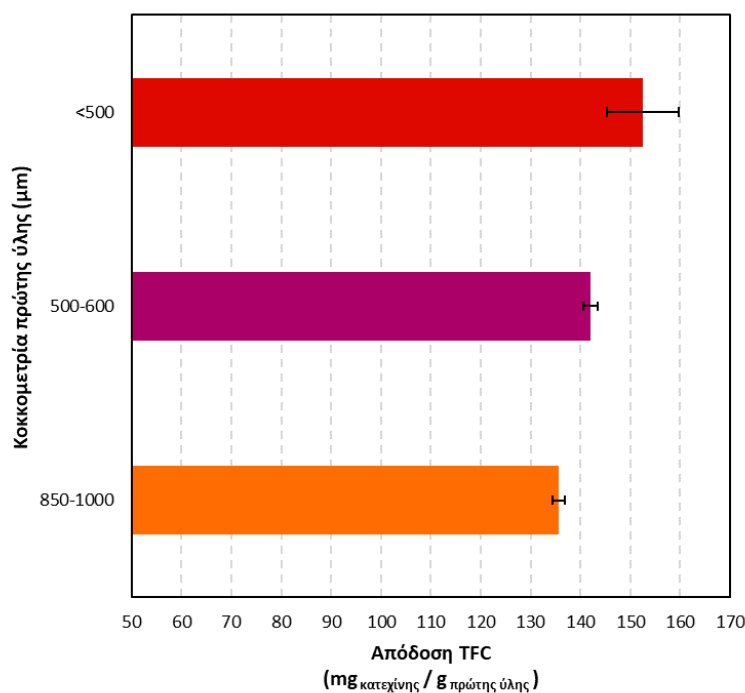


Διάγραμμα 10: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500–600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.

Από το Διάγραμμα 10 προκύπτει μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TFC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι αποδόσεις φαίνεται να

σταθεροποιούνται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 2 και 6 ωρών. Για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης παρατηρήθηκαν σημαντικότερες αυξήσεις στην απόδοση TFC συγκριτικά με τις αυξήσεις στην απόδοση TPC, που προαναφέρθηκαν. Ειδικότερα, εάν θεωρηθεί η απόδοση που επιτυγχάνεται στις 48 h ως η μέγιστη δυνατή, τότε η αύξηση της απόδοσης TFC μεταξύ των 24 και 48 h είναι 7.9, 7.2 και 1.6 % για εύρη κοκκομετρίας 850 μm –1 mm, 500-600 μm και <500 μm αντίστοιχα. Στην περίπτωση της εκχύλισης των φλαβονοειδών λοιπόν διαπιστώνεται εντονότερη συσχέτιση μεταξύ της κοκκομετρίας και του χρόνου εκχύλισης, δηλαδή η μικρότερη μέση ακτίνα κόκκων της αλεσμένης πρώτης ύλης οδηγεί σε ταχύτερη απελευθέρωση των εκχυλιζόμενων συστατικών και συνεπώς σε μικρότερους απαιτούμενους χρόνους εκχύλισης. Έτσι, η καμπύλη της απόδοσης TFC συναρτήσεως του χρόνου εμφανίζει ταχύτερα σταθεροποίηση στην περίπτωση της κοκκομετρίας <500 μm .

Στο Διάγραμμα 11 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές της απόδοσης TFC των εκχυλισμάτων για τις τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες:



Διάγραμμα 11: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm –1 mm, 500-600 μm , <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 3% β/ο και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ.

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC στο εκχύλισμα για κάθε εύρος κοκκομετρίας επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48h. Ειδικότερα, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή μετρήθηκαν 135.7, 142.0 και 152.5 mg κατεχίνης/g π.υ. για τις κοκκομετρίες 850 μm –1 mm, 500-600 μm και <500 μm αντίστοιχα. Επομένως, και σε αυτή την περίπτωση εξάγεται το συμπέρασμα ότι όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των κόκκων της πρώτης ύλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση των εκχυλιζόμενων φλαβονοειδών ενώσεων στον κύριο όγκο του υγρού. Όπως προαναφέρθηκε, η εντονότερη μηχανική προεπεξεργασία σπάει τα κυτταρικά τοιχώματα και επομένως

διευκολύνεται η πρόσβαση του διαλύτη και του ενζύμου στο φυτικό υπόστρωμα οδηγώντας σε αυξημένους ρυθμούς μεταφοράς.

6.3.1.3 Αντιοξειδωτική δράση

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC₅₀ για τα διάφορα εύρη κοκκομετρίας της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*. Οι τιμές των δεικτών IC₅₀ έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 1, 2 και 3 του Παραρτήματος για χρόνους δειγματοληψίας 2, 6 και 48 h αντίστοιχα.

Πίνακας 20: Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων για τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες (850 μm–1 mm, 500-600 μm, <500 μm) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 3% β/ο, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g π.υ. και για t=2, 6 & 48h.

Κοκκομετρία πρώτης ύλης (μm)	IC ₅₀ (μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος)		
	2h	6h	48h
850-1000	1.16 ± 0.03	1.09 ± 0.00	1.08 ± 0.14
500-600	1.09 ± 0.01	0.91 ± 0.08	0.84 ± 0.05
<500	0.98 ± 0.01	0.87 ± 0.03	0.83 ± 0.02

Σημειώνεται ότι όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία της στερεής πρώτης ύλης παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀. Τέλος, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, απελευθερώνονται περισσότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις και ως εκ τούτου μειώνεται ο δείκτης IC₅₀.

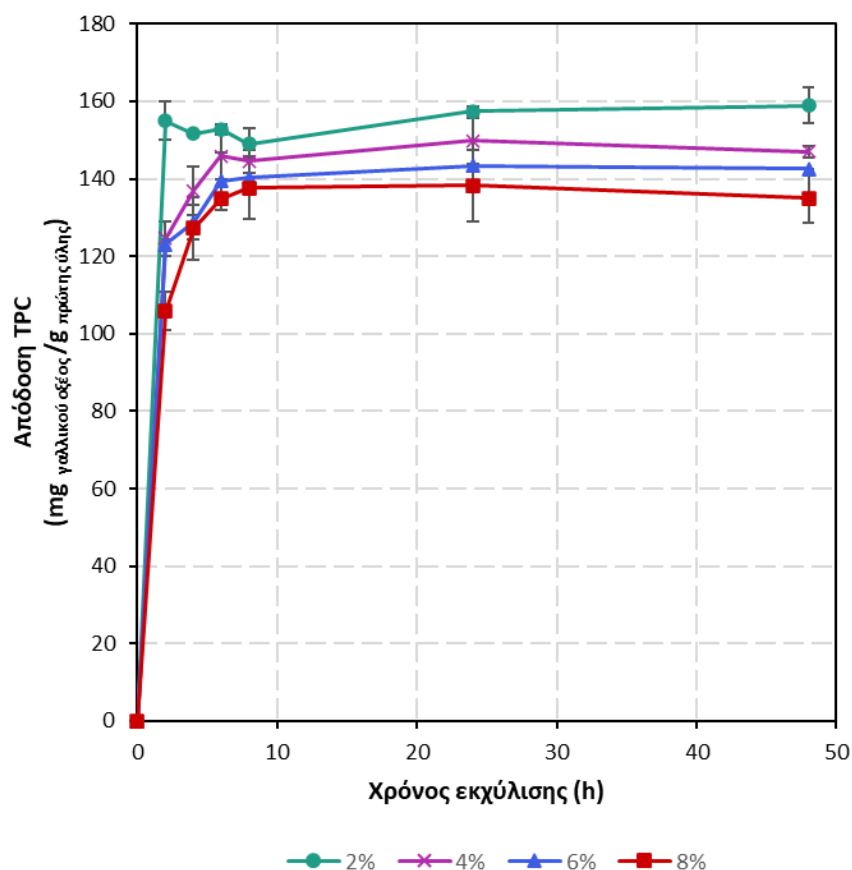
Συνοψίζοντας, όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία της πρώτης ύλης, τόσο περισσότερο αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών, καθώς και παρουσιάζεται εντονότερη αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, για μικρότερους κόκκους στερεού περικαρπίου της *R. canina* L. απαιτείται λιγότερος χρόνος εκχύλισης. Ως συνέπεια όλων των παραπάνω επιλέγεται ως βέλτιστο εύρος κοκκομετρίας το <500 μm και έτσι τα επόμενα πειράματα διεξάγονται με άλεση της πρώτης ύλης σε μορφή πούδρας.

6.3.2 Μελέτη επίδρασης αναλογίας στερεού – υγρού

Μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας στερεού – υγρού σε σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. του σκευάσματος Cellic CTec3. Ειδικότερα, εξετάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 2, 4, 6 και 8% β/ο. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *Rosa canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm), ενώ έγιναν έξι δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 2, 4, 6, 8, 24 και 48h). Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση.

6.3.2.1 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC)

Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τις τέσσερις συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης:

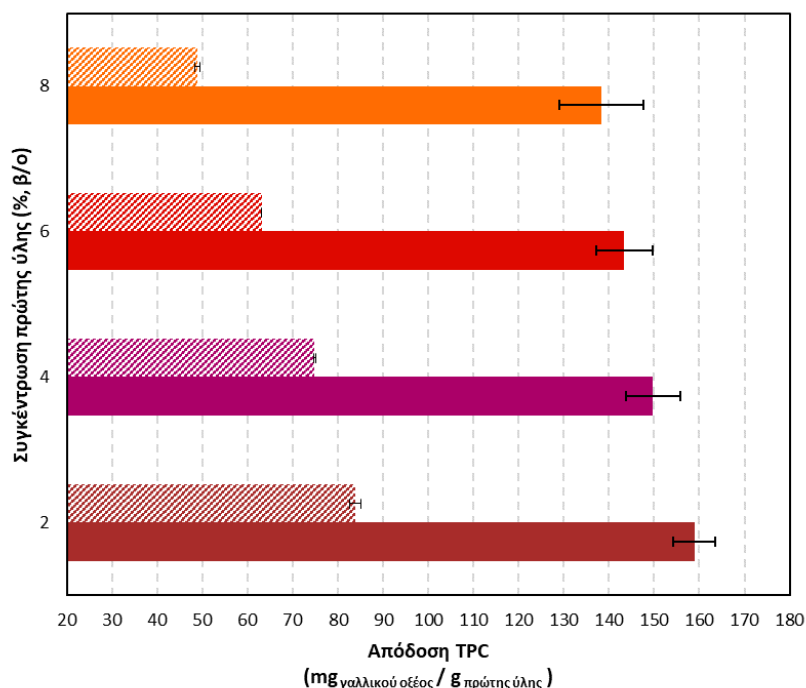


Διάγραμμα 12: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ.

Από το Διάγραμμα 12 παρατηρείται μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TPC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι αποδόσεις φαίνεται να σταθεροποιούνται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 6 και 8 ωρών. Για

μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης εμφανίζονται μικρές αυξομειώσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι η εκχύλιση έχει πρακτικά τερματιστεί και έχει απελευθερωθεί σχεδόν η μέγιστη δυνατή ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Εξάιρεση αποτελεί η συγκέντρωση 2% β/ο, στην οποία η καμπύλη της απόδοσης παρουσιάζει ταχύτερα σταθεροποίηση στις 2h και έπειτα παρατηρούνται μικρές διακυμάνσεις.

Στο Διάγραμμα 13 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC για κάθε διαφορετική συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης και οι αντίστοιχες τιμές απόδοσης TPC των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων της συμβατικής διεργασίας:



Διάγραμμα 13: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. (οι γραμμοσκιασμένες ράβδοι αντιστοιχούν στις αποδόσεις TPC της συμβατικής εκχύλισης)

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC στο εκχύλισμα για κάθε συγκέντρωση πρώτης ύλης επιτεύχθηκαν σε δείγματα των 24 και 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 13, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν 158.9, 149.8, 143.4 και 138.3 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. για τις συγκεντρώσεις περικαρπίου του καρπού *R. canina* 2, 4, 6 και 8% β/ο αντίστοιχα. Από τα ανωτέρω συμπεραίνεται ότι η απόδοση TPC εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης, δηλαδή η αύξηση της % β/ο συγκέντρωσης οδηγεί σε μείωση της απόδοσης TPC. Αντίθετα, από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις προέκυψε ότι η αύξηση της % β/ο συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης προφανώς οδηγεί και σε αύξηση της συγκέντρωσης TPC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος.

Επιπλέον, είναι φανερό ότι η EYE στις δεδομένες συνθήκες είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματική συγκριτικά με την διεργασία της συμβατικής εκχύλισης. Αναλυτικότερα, από το Διάγραμμα 13 προκύπτουν τα εξής:

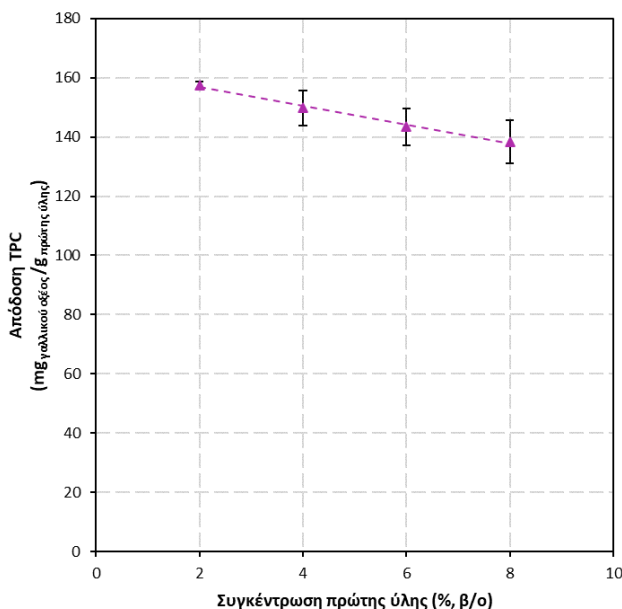
- 90% αύξηση της απόδοσης TPC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 2% β/ο
- 2 φορές (100%) αύξηση της απόδοσης TPC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 4% β/ο
- 127% αύξηση της απόδοσης TPC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 6% β/ο
- 183% αύξηση της απόδοσης TPC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 8% β/ο.

Τέλος, παρατηρείται ότι για αυξανόμενη συγκέντρωση πρώτης ύλης, παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση στην απόδοση TPC στην EYE σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση, γεγονός που δηλώνει την ικανότητα των ενζύμων να δρουν και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος και να αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της διεργασίας εκχύλισης.

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.*

Από το Διάγραμμα 14 προκύπτει μέσω γραμμικής παρεμβολής η εξίσωση που εκφράζει την απόδοση (Y) σε TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

$$Y_{TPC} (mg/g) = -3.1955 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 163.21 \quad (R^2=0.9919)$$



Διάγραμμα 14: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=24h.

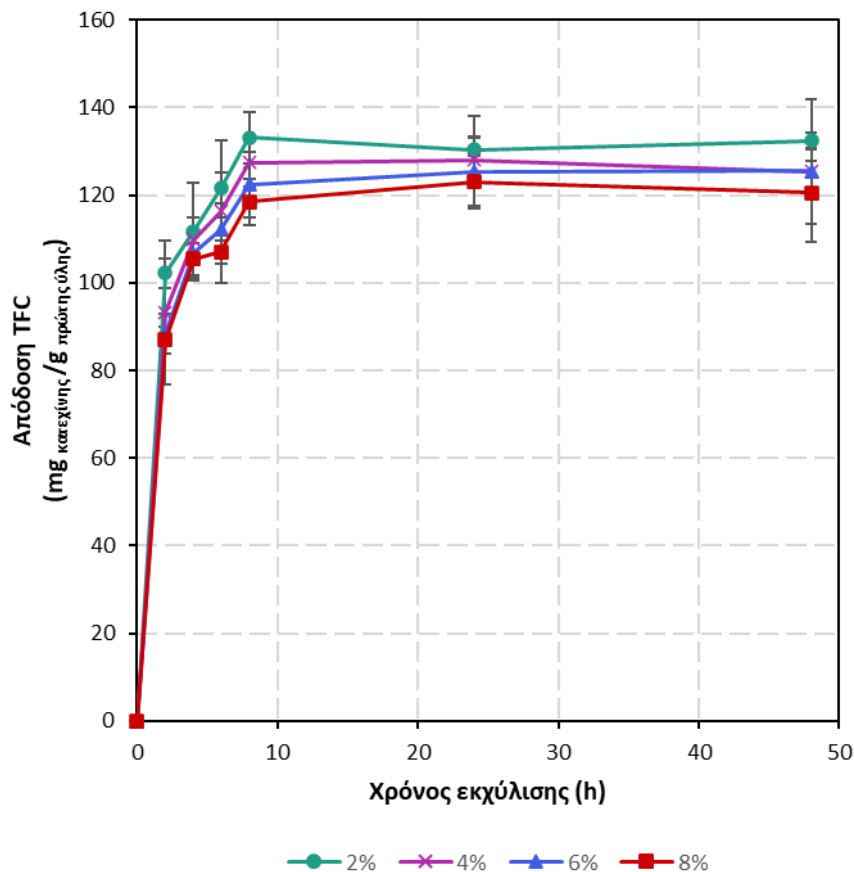
Όπως φαίνεται από το ανωτέρω διάγραμμα οι αποδόσεις TPC ανά μονάδα μάζας στερεού μειώνονται σχεδόν ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*, γεγονός που υποδεικνύεται από τον

υψηλό συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Αυτή η πτωτική τάση μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τα φαινόμενα μεταφοράς που καθορίζουν το σύστημα εκχύλισης υγρού-στερεού. Ειδικότερα, η χαμηλή αναλογία υγρού προς στερεό (ή οι υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης) έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιξωδών εναιωρημάτων που δυσχεραίνουν την επαφή μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Εκτός από την δυσκολία μεταφοράς του ενζύμου προς την πρώτη ύλη, δυσχεραίνεται και η μεταφορά του διαλύτη από τον κύριο όγκο του υγρού προς τη στερεή μήτρα, αλλά και οι διαλυτοποιημένες βιοδραστικές ενώσεις δύνανται να εγκλωβιστούν στην παχύρρευστη ιλύ της πρώτης ύλης και να μη προχωρήσουν στον κύριο υγρό του εκχυλίσματος.

Αντίθετα, από τις μετρήσεις προέκυψε ότι οι συγκεντρώσεις TPC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος αυξάνονται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης, γεγονός αναμενόμενο. Επομένως, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση του συστήματος, ώστε να βρεθεί μια συμβιβαστική τομή μεταξύ της προστιθέμενης πρώτης ύλης στο σύστημα, η αύξηση της οποίας προφανώς και θα οδηγήσει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις TPC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος, και του ιξώδους του συστήματος, η υψηλή τιμή του οποίου εμποδίζει τη μέγιστη αξιοποίηση της πρώτης ύλης και οδηγεί σε μείωση της ποσότητας των εκχυλιζόμενων ουσιών ανά μονάδα μάζας στερεού.

6.3.2.2 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)

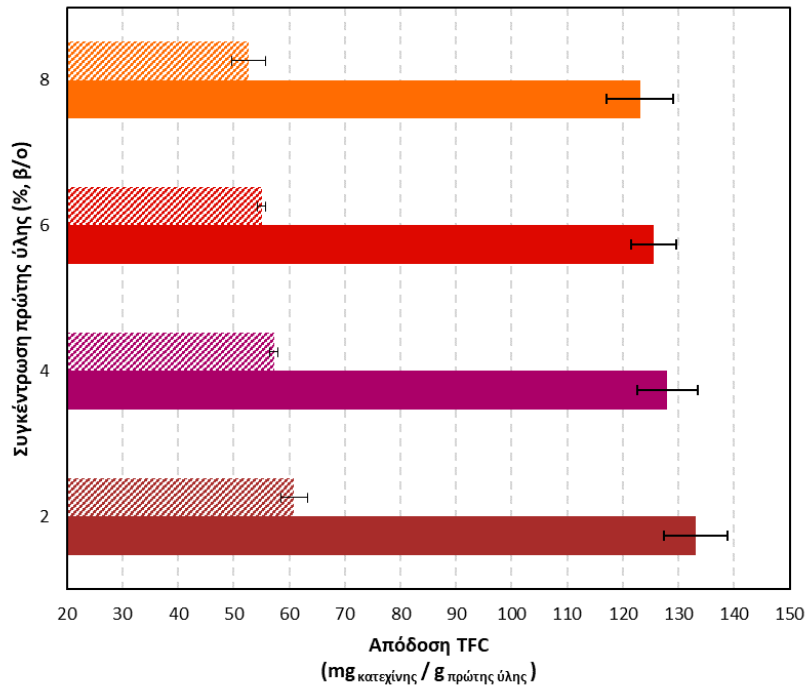
Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τις τέσσερις συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης:



Διάγραμμα 15: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ.

Από το Διάγραμμα 15 παρατηρείται μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TFC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι καμπύλες απόδοσης TFC φαίνεται να σταθεροποιούνται και οι αποδόσεις να παραμένουν περίπου ίδιες μετά τις 8h. Για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης εμφανίζονται μικρές αυξομειώσεις, γεγονός που υποδεικνύει ότι η εκχύλιση έχει πρακτικά τερματιστεί και έχει απελευθερωθεί σχεδόν η μέγιστη δυνατή ποσότητα φλαβονοειδών.

Στο Διάγραμμα 16 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC για κάθε διαφορετική συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης και οι αντίστοιχες τιμές απόδοσης TFC των υδροαιθανολικών εκχυλισμάτων της συμβατικής διεργασίας:



Διάγραμμα 16: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. (οι γραμμοσκιασμένες ράβδοι αντιστοιχούν στις αποδόσεις TFC της συμβατικής εκχύλισης)

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC στο εκχύλισμα για κάθε συγκέντρωση πρώτης ύλης επιτεύχθηκαν σε δείγματα των 8, 24 και 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 16, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή μετρήθηκαν 133.1, 128.0, 125.6 και 123.1 mg κατεχίνης /g π.υ. για τις συγκεντρώσεις περικαρπίου του καρπού *R. canina* 2, 4, 6 και 8% β/ο αντίστοιχα. Συνεπώς, όπως παρατηρήθηκε και στην απόδοση σε φαινολικές ενώσεις, με αύξηση της % β/ο συγκέντρωσης προκύπτει μείωση της απόδοσης TFC ανά μονάδα μάζας στερεού.

Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι η EYE στις δεδομένες συνθήκες είναι πολύ περισσότερο αποτελεσματική συγκριτικά με την διεργασία της συμβατικής εκχύλισης. Αναλυτικότερα, από το Διάγραμμα 16 προκύπτουν τα εξής:

- 119% αύξηση της απόδοσης TFC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 2% β/ο
- 124% αύξηση της απόδοσης TFC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 4% β/ο
- 128% αύξηση της απόδοσης TFC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 6% β/ο
- 133% αύξηση της απόδοσης TFC στην EYE συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 8% β/ο.

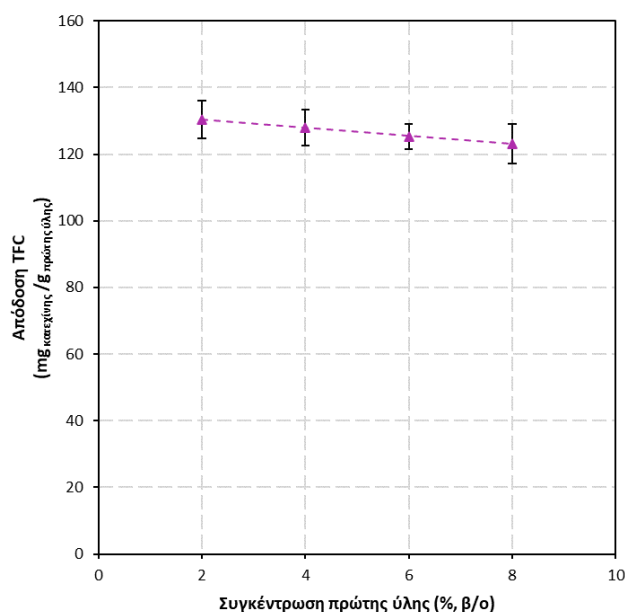
Ομοίως με την απόδοση σε φαινολικές ενώσεις, παρατηρείται ότι για αυξανόμενη συγκέντρωση πρώτης ύλης, αυξάνεται επίσης και η διαφορά στην απόδοση TFC μεταξύ της EYE και της συμβατικής εκχύλισης. Γενικά, τα επίπεδα

αύξησης των αποδόσεων TFC, ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα αύξησης των αποδόσεων TPC συγκριτικά με τις αποδόσεις της συμβατικής εκχύλισης.

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TFC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.*.

Από το Διάγραμμα 17 προκύπτει μέσω γραμμικής παρεμβολής η εξίσωση που εκφράζει την απόδοση (Y) σε TFC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

$$Y_{TFC} (mg/g) = -1.23 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 132.88 \quad (R^2=0.9991)$$



Διάγραμμα 17: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=24h.

Όπως φαίνεται από το ανωτέρω διάγραμμα οι αποδόσεις TFC ανά μονάδα μάζας στερεού μειώνονται σχεδόν ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τον υψηλό συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Αυτή η πτωτική τάση μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τα φαινόμενα μεταφοράς που καθορίζουν το σύστημα εκχύλισης υγρού-στερεού, όπως αυτά εξηγήθηκαν στην Παράγραφο 6.3.2.1.

6.3.2.3 Αντιοξειδωτική δράση

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC_{50} για τις διάφορες συγκεντρώσεις της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*. Οι τιμές των δεικτών IC_{50} έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 4, 5 και 6 του Παραρτήματος για χρόνους δειγματοληψίας 2, 6 και 8 h αντίστοιχα.

Πίνακας 21: Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. (2, 4, 6, 8% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για t=2, 6 & 8h.

Συγκέντρωση του περικαρπίου των καρπών <i>R. canina</i> L. (% β/ο)	IC ₅₀ (μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος)		
	2h	6h	8h
2	1.58 ± 0.02	1.55 ± 0.02	1.48 ± 0.00
4	0.85 ± 0.00	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.02
6	0.72 ± 0.00	0.38 ± 0.00	0.36 ± 0.01
8	0.64 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.01

Σημειώνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης επιφέρει αύξηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀. Επίσης, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, απελευθερώνονται περισσότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις και ως εκ τούτου μειώνεται ο δείκτης IC₅₀. Γενικά, οι τιμές IC₅₀ είναι πολύ χαμηλές, γεγονός που σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

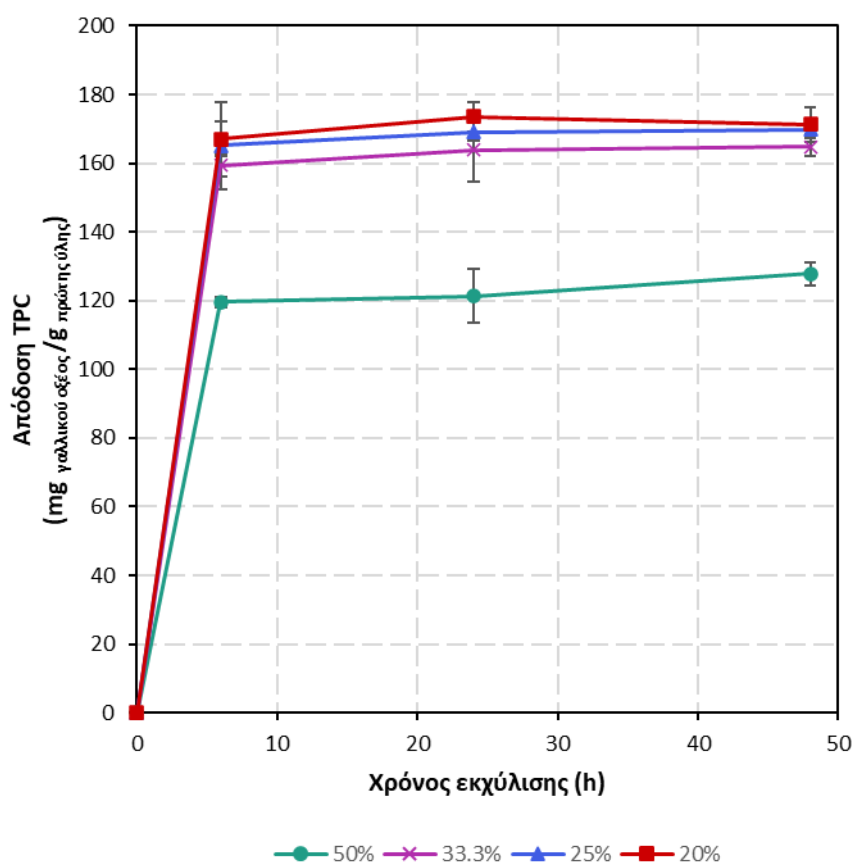
Συνοψίζοντας, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος των εκχυλιζόμενων φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών, αλλά και παράλληλα ενισχύεται και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Αντίθετα, η αύξηση της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης οδηγεί σε ανάλογη πτώση της ποσότητας των εκχυλιζόμενων βιοδραστικών ενώσεων ανά μονάδα μάζας στερεού (αποδόσεις TPC & TFC) εξαιτίας των περιορισμών που προκαλεί το υψηλό ιξώδες στα φαινόμενα μεταφορά μάζας. Τέλος, οι αποδόσεις TPC και TFC που επιτυγχάνονται μέσω της EYE είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες αποδόσεις της συμβατικής διεργασίας, γεγονός που αποτελεί προοπτική για την εφαρμογή της EYE σε βιομηχανική κλίμακα.

6.3.3 Μελέτη επίδρασης υψηλών αναλογιών στερεού - υγρού (High Solid)

Μελετήθηκε η επίδραση υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού (High Solid) υπό σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο του σκευάσματος Cellic CTec3. Ειδικότερα, εξετάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης: 20, 25, 33 και 50% β/ο (ή αναλογίες στερεού-υγρού 1:5, 1:4, 1:3 και 1:2). Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *Rosa canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm), ενώ έγιναν τρεις δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 6, 24 και 48h). Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση.

6.3.3.1 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC)

Στο Διάγραμμα 18 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τις τέσσερις υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης:



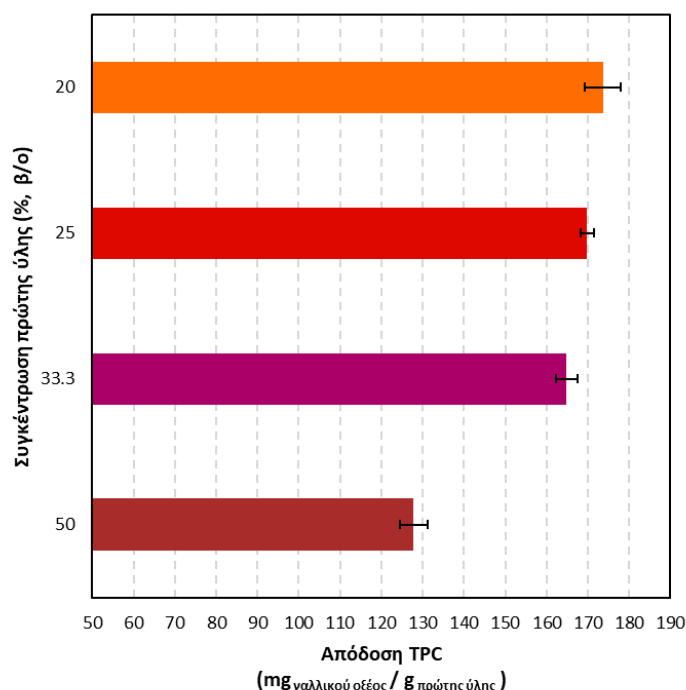
Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.

Από το Διάγραμμα 18 παρατηρείται μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TPC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι καμπύλες απόδοσης TPC φαίνεται να σταθεροποιούνται και οι αποδόσεις να παραμένουν περίπου ίδιες μετά

τις 6h. Επειδή για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης η απόδοση της διεργασίας σε φαινολικές ενώσεις παρουσιάζει ήπια ανοδική τάση μπορεί να γίνει η θεώρηση ότι η εκχύλιση έχει πρακτικά ολοκληρωθεί.

Εάν θεωρηθεί η απόδοση που επιτυγχάνεται στις 48 h ως η μέγιστη δυνατή, τότε η αύξηση της απόδοσης TPC μεταξύ των 6 και 48 h είναι 6.4, 3.3, 2.8 και 2.5 % για συγκεντρώσεις πρώτης ύλης 50, 33.3, 25 και 20% β/ο αντίστοιχα. Επομένως, η μείωση της συγκέντρωσης στερεού, μειώνει και τον χρόνο που χρειάζεται προκειμένου να εκχυλιστεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα φαινολικών ενώσεων.

Στο Διάγραμμα 19 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC για κάθε διαφορετική υψηλή συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης:



Διάγραμμα 19: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.

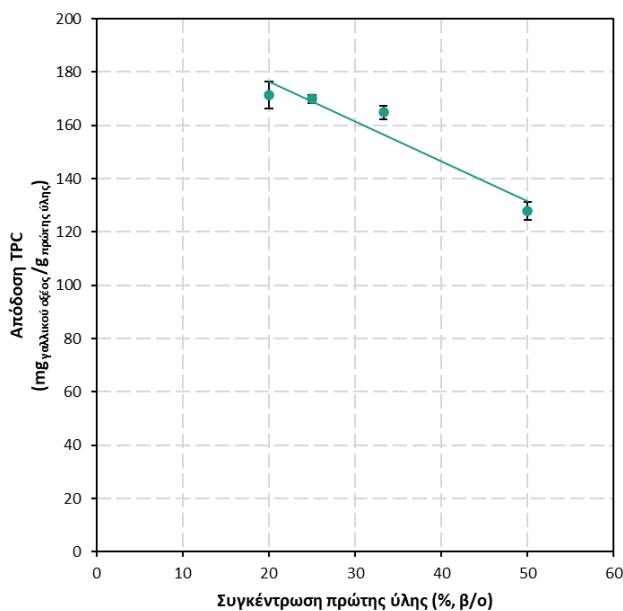
Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC στο εκχύλισμα για κάθε συγκέντρωση πρώτης ύλης επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 19, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν 171.3, 169.9, 164.9 και 127.8 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. για τις συγκεντρώσεις περικαρπίου του καρπού *R. canina* 20, 25, 33.3 και 50% β/ο αντίστοιχα.

Ομοίως με όσα παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στερεού (Παράγραφος 6.3.2.1), η αύξηση και των υψηλών % β/ο συγκεντρώσεων στερεού οδηγούν σε μείωση της απόδοσης TPC και αύξηση της συγκέντρωσης TPC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος.

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 20 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.*

Από το Διάγραμμα 20 προκύπτει μέσω γραμμικής παρεμβολής η εξίσωση που εκφράζει την απόδοση (Y) σε TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

$$Y_{TPC} (mg/g) = -1.4997 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 206.56 \quad (R^2=0.9133)$$



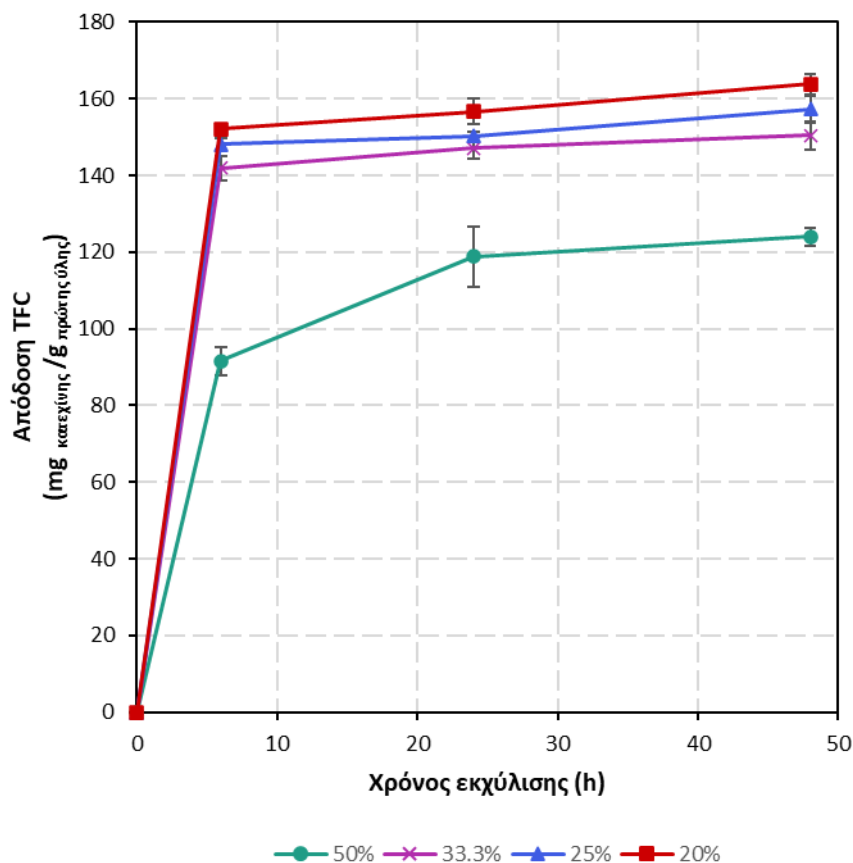
Διάγραμμα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=48h.

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 20 οι αποδόσεις TPC ανά μονάδα μάζας στερεού μειώνονται περίπου ανάλογα αυξανόμενης της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου του καρπού της *R. canina*. Ωστόσο, δεν προκύπτει τόσο υψηλός συντελεστής προσδιορισμού (R^2) συγκριτικά με το πείραμα με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στερεού. Αυτό οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση στερεού (50% β/ο), η οποία οδήγησε σε ένα εξαιρετικά παχύρρευστο διάλυμα, γεγονός που αφενός εμπόδιζε την υδρόλυση του στερεού υποστρώματος και αφετέρου δυσχέραινε τους πειραματικούς χειρισμούς.

Γενικά, όπως αναφέρθηκε και στο πείραμα με τις χαμηλές αναλογίες στερεού-υγρού (Παράγραφος 6.3.2.1), η μειούμενη τάση της απόδοσης TPC αυξανόμενης της συγκέντρωσης στερεού μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τα φαινόμενα μεταφοράς που διέπουν το σύστημα εκχύλισης υγρού-στερεού.

6.3.3.2 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)

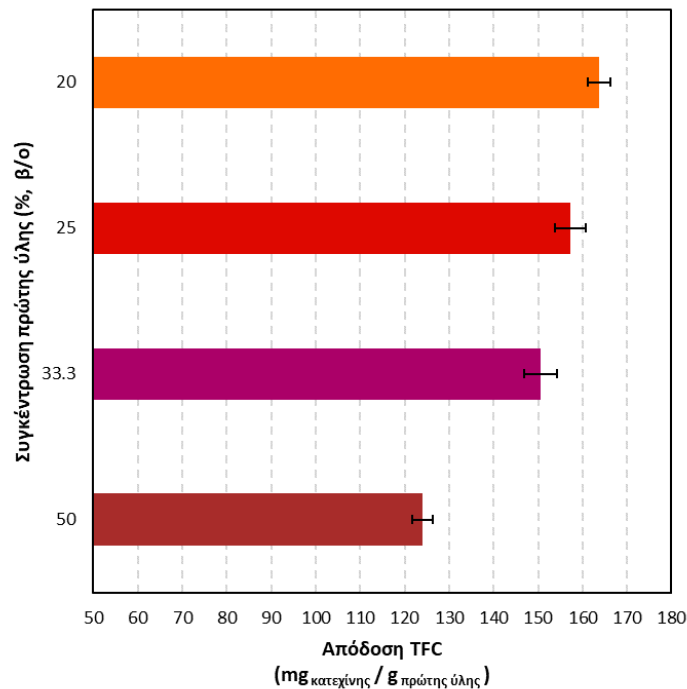
Στο Διάγραμμα 21 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τις τέσσερις υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης:



Διάγραμμα 21: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.

Από το Διάγραμμα 21 παρατηρείται μια έντονη αυξητική τάση της απόδοσης TFC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι καμπύλες απόδοσης TFC φαίνεται να σταθεροποιούνται και οι αποδόσεις να είναι πρακτικά ίδιες μετά τις 6h. Ωστόσο, στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης στερεού (50% β/ο) η καμπύλη απόδοσης παρουσιάζει σταθεροποίηση μετά τις 24 ώρες εκχύλισης. Ως εκ τούτου, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στερεού απαιτούν αρκετά μεγαλύτερη χρονική διάρκεια εκχύλισης, ώστε να απελευθερωθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα φλαβονοειδών. Πιο συγκεκριμένα, εάν θεωρηθεί η απόδοση που επιτυγχάνεται στις 48 h ως η μέγιστη δυνατή, τότε η αύξηση της απόδοσης TFC μεταξύ των 6 και 48 h είναι 26.1, 7.6, 5.8 και 7.0 % για συγκεντρώσεις πρώτης ύλης 50, 33.3, 25 και 20% β/ο αντίστοιχα.

Στο Διάγραμμα 22 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC για κάθε διαφορετική υψηλή συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης:



Διάγραμμα 22: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο.

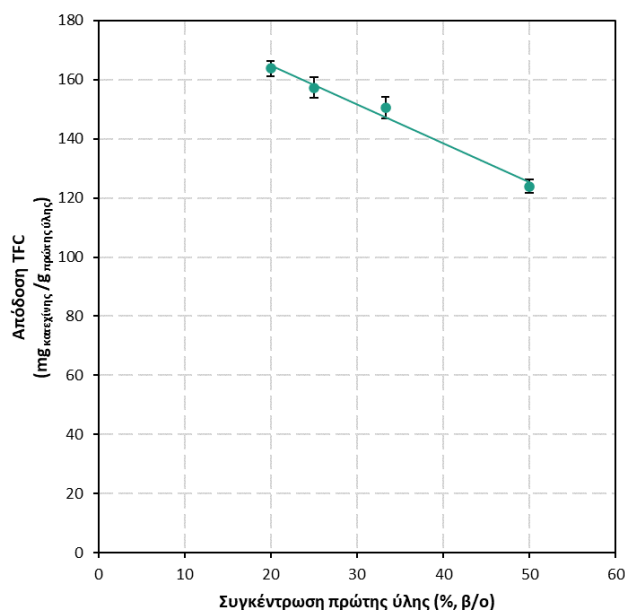
Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC στο εκχύλισμα για κάθε συγκέντρωση πρώτης ύλης επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 22, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή μετρήθηκαν 163.7, 157.3, 150.5 και 124.0 mg κατεχίνης/g π.υ. για τις συγκεντρώσεις περικαρπίου του καρπού *R. canina* 20, 25, 33.3 και 50% β/ο αντίστοιχα.

Ομοίως με όσα παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στερεού (Παράγραφος 6.3.2.2), η αύξηση και των υψηλών % β/ο συγκεντρώσεων οδηγούν σε μείωση της απόδοσης TFC ανά μονάδα μάζας στερεού.

Επιπλέον, στο Διάγραμμα 23 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TFC συναρτήσεως της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.*

Από το Διάγραμμα 23 προκύπτει μέσω γραμμικής παρεμβολής η εξίσωση που εκφράζει την απόδοση (Y) σε TFC συναρτήσεως της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης (σε % β/ο):

$$Y_{TFC} \left(\frac{mg}{g} \right) = -1.3182 \cdot C_{\text{πρώτης ύλης}} + 191.17 \quad (R^2=0.9846)$$



Διάγραμμα 23: Μεταβολή της συγκέντρωσης και της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=48h.

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 23 οι αποδόσεις TFC ανά μονάδα μάζας στερεού μειώνονται περίπου ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου του καρπού της *R. canina*. Ωστόσο, δεν προκύπτει τόσο υψηλός συντελεστής προσδιορισμού (R^2) όσο στο πείραμα με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στερεού εξαιτίας της υψηλότερης συγκέντρωσης στερεού (50% β/ο) που κατέστησε το διάλυμα πολύ ιξώδες, εμποδίζοντας την υδρόλυση της φυτικής μήτρας.

6.3.3.3 Αντιοξειδωτική δράση

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC_{50} για τις διάφορες υψηλές συγκεντρώσεις της στερεής πρώτης ύλης του περικαρπίου *R. canina*. Οι τιμές των δεικτών IC_{50} έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 7 και 8 του Παραρτήματος για χρόνους δειγματοληψίας 6 και 48 h αντίστοιχα.

Πίνακας 22: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* (20, 25, 33.3, 50% β/ο) σε κοκκομετρία <500 μm, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και t=6 & 48h.

Συγκέντρωση του περικαρπίου των καρπών <i>R. canina L.</i> (% β/ο)	IC_{50} (μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος)	
	6h	48h
20	0.166 ± 0.001	0.091 ± 0.014
25	0.088 ± 0.003	0.087 ± 0.000
33.3	0.085 ± 0.002	0.062 ± 0.011
50	0.080 ± 0.002	0.061 ± 0.012

Διαπιστώνεται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀. Τέλος, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, απελευθερώνονται περισσότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις και ως εκ τούτου μειώνεται ο δείκτης IC₅₀.

Γενικότερα, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων στερεών (high solid) συνιστά μία μέθοδο που εφαρμόζεται συχνά για την παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα με στόχο να αυξήσει την μετατροπή του υποστρώματος και την παραγωγικότητα της διεργασίας, αλλά και για να μειώσει την κατανάλωση ενέργειας και τον όγκο των χρησιμοποιούμενων υδατικών διαλυτών.

Η ενζυμική υδρόλυση με υψηλές συγκεντρώσεις στερεού είναι μία διεργασία στην οποία δεν υπάρχουν σημαντικές ποσότητες ελεύθερου νερού σε υγρή κατάσταση. Ωστόσο, το νερό είναι βασικός παράγοντας στην ενζυμική υδρόλυση πολυσακχαριτών, καθώς αφενός λειτουργεί ως αντιδρών στη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών, και αφετέρου ως το μέσο της αντίδρασης που διαχέει τα ένζυμα, τα υποστρώματα και τις βιοδραστικές ενώσεις που προκύπτουν από την υδρόλυση. Πιο συγκεκριμένα, οι πολλοί λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας ταξινομούνται ως μη νευτώνεια ρευστά με ψευδοπλαστική συμπεριφορά και συνεπώς το φαινομενικό ιξώδες αυτών των μιγμάτων αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της αναλογίας στερεού-υγρού. Η παρατηρούμενη αύξηση του ιξώδους οδηγεί σε περιορισμούς στη μεταφορά μάζας, δηλαδή σε κακή επαφή μεταξύ των ενζύμων και του υποστρώματος, η οποία είναι απαραίτητη για επαρκή υδρόλυση, και σε τοπική συσσώρευση σακχάρων κοντά στα ένζυμα, γεγονός που ενδεχομένως να προκαλεί αναστολή της δράσης τους [99]–[101].

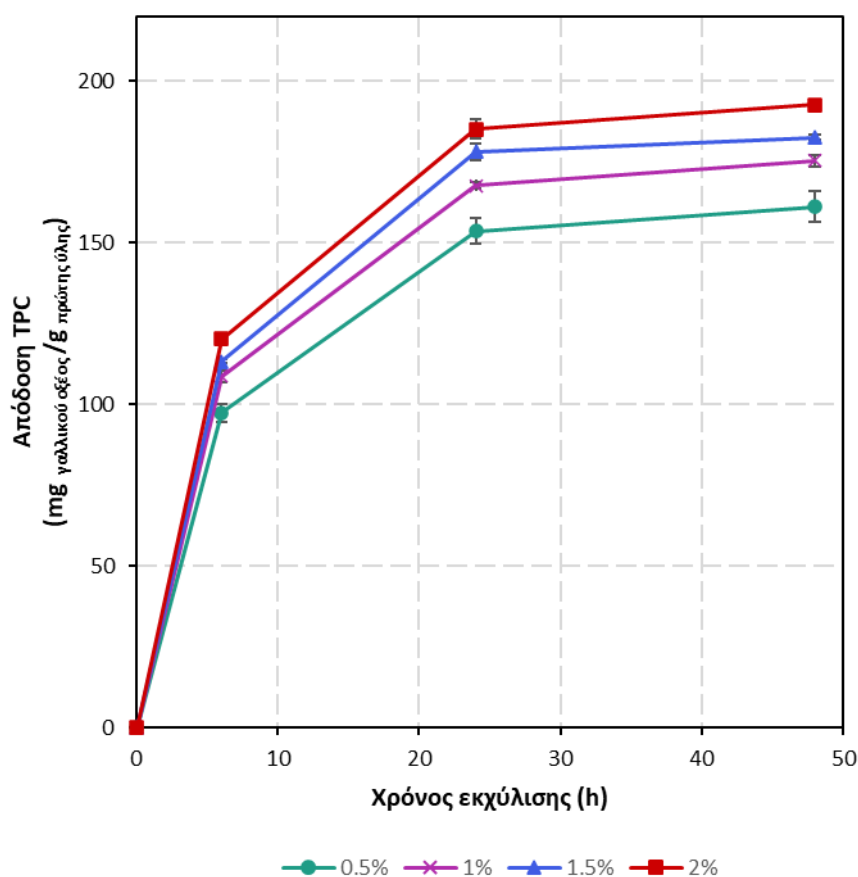
*Συνοψίζοντας, στην περίπτωση των εκχυλίσεων με υψηλές συγκεντρώσεις στερεής πρώτης ύλης απαιτούνται είτε σημαντικά μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης του ενζύμου, είτε προσθήκη περισσότερου ενζυμικού φορτίου, προκειμένου να υδρολυθεί η φυτική μήτρα, να ρευστοποιηθεί επαρκώς το σύστημα και να μειωθεί το ιξώδες της ημίρρευστης μάζας του στερεού. Έτσι, μπορούν να επιτευχθούν όμοιες αποδόσεις με αραιότερα συστήματα. Επειδή λοιπόν στην περίπτωση συγκέντρωσης 50% β/ο περικαρπίου του καρπού *R. canina* το υψηλό ιξώδες οδήγησε σε χαμηλότερες αποδόσεις TPC & TFC, για τη διεξαγωγή του πειράματος μελέτης επίδρασης ενζυμικού φορτίου επιλέχθηκε η συγκέντρωση 25% β/ο.*

6.3.4 Μελέτη επίδρασης ενζυμικού φορτίου

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου του σκευάσματος Cellic CTec3 για σταθερή συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης (25% β/ο). Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα εξής ενζυμικά φορτία: 0.5%, 1%, 1.5% και 2% ο/ο ή αντίστοιχα 2.68, 5.37, 8.05 και 10.74 FPU/g πρώτης ύλης. Η κοκκομετρία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού *Rosa canina L.* είχε τη μορφή πούδρας (<500μm), ενώ πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες (τις χρονικές στιγμές 6, 24 και 48h). Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση.

6.3.4.1 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC)

Στο Διάγραμμα 24 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τα τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία:



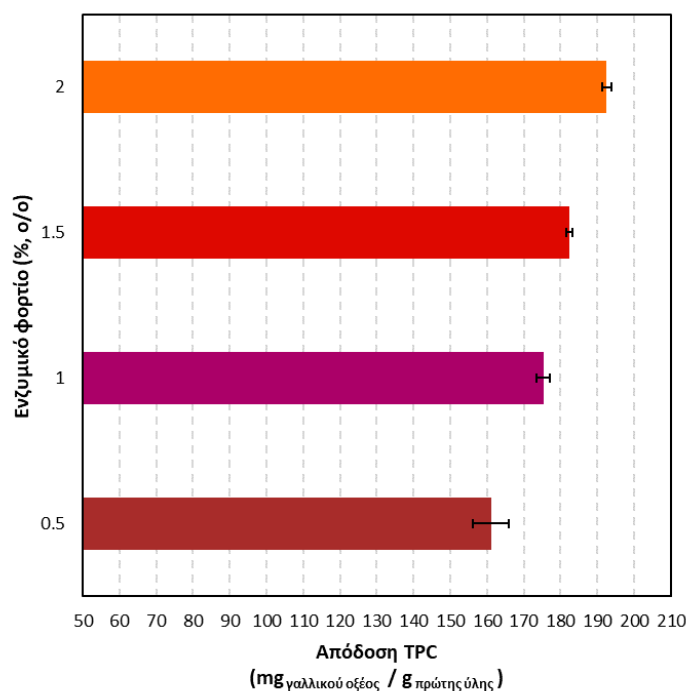
Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.

Από το Διάγραμμα 24 παρατηρείται μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TPC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, οι καμπύλες απόδοσης

TPC φαίνεται να σταθεροποιούνται και οι αποδόσεις να παραμένουν περίπου ίδιες μετά τις 24h. Για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης η απόδοση της διεργασίας σε φαινολικές ενώσεις παρουσιάζει ήπια ανοδική τάση και συνεπώς μπορεί να γίνει η θεώρηση ότι η εκχύλιση έχει πρακτικά ολοκληρωθεί. Εάν θεωρηθεί η απόδοση που επιτυγχάνεται στις 48 h ως η μέγιστη δυνατή, τότε η αύξηση της απόδοσης TPC μεταξύ των 24 και 48 h είναι 4.7, 4.4, 2.4 και 3.9 % για ενζυμικά φορτία 0.5, 1, 1.5 και 2% ο/ο αντίστοιχα.

Ο χρόνος υδρόλυσης και η συγκέντρωση του ενζύμου αποτελούν συσχετιζόμενα μεγέθη, γιατί θεωρητικά αυξάνοντας την ποσότητα του ενζύμου και μειώνοντας τον χρόνο υδρόλυσης με αναλογικό τρόπο, μπορεί να επιτευχθεί η ίδια απόδοση. Ωστόσο, όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 21 η απόδοση TPC εμφανίζει σταθεροποίηση περίπου σε ίδιους χρόνους εκχύλισης για όλα τα εξεταζόμενα ενζυμικά φορτία. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί επειδή στην πράξη η ενεργότητα των ενζύμων μειώνεται με γρήγορο ή πιο αργό ρυθμό όταν ο χρόνος υδρόλυσης παραταθεί. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας διάφορων ανασταλτικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να προέρχονται από την πρώτη ύλη, από τα προϊόντα αντιδράσεων, από ορισμένες άλλες παραμέτρους της διεργασίας κ.λπ. [50], [51].

Στο Διάγραμμα 25 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC για κάθε διαφορετικό ενζυμικό φορτίο:



Διάγραμμα 25: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC στο εκχύλισμα για κάθε ενζυμικό φορτίο επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 25, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν 161.0, 175.3, 182.4 και 192.6 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. για ενζυμικά φορτία 0.5, 1, 1.5 και

2% ο/ο αντίστοιχα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η προσθήκη μεγαλύτερου ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις TPC.

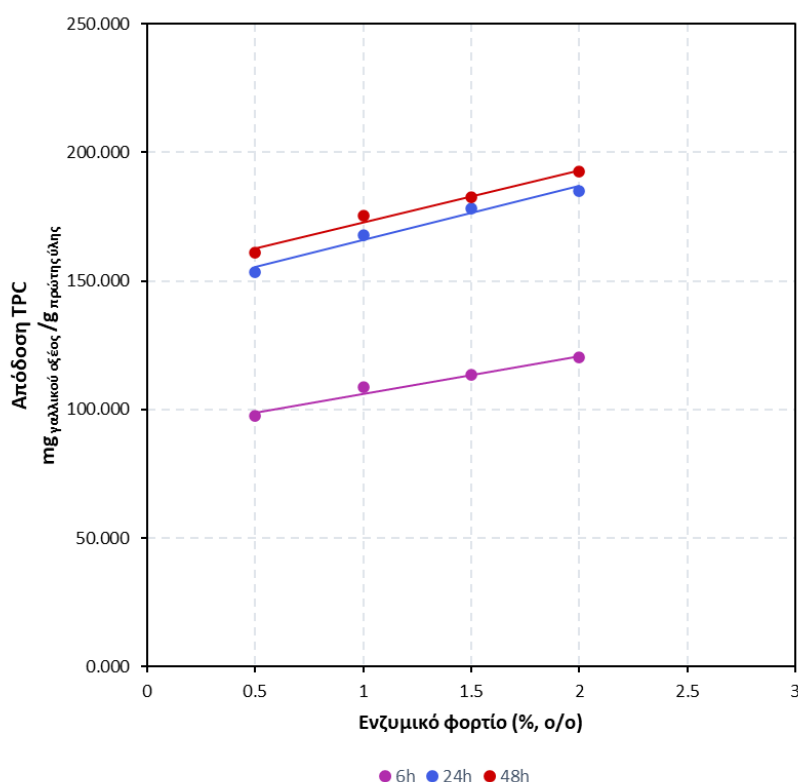
Επιπλέον, στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TPC συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού φορτίου.

Από το Διάγραμμα 26 προκύπτουν μέσω γραμμικής παρεμβολής οι εξισώσεις που εκφράζουν την απόδοση (Y) σε TPC συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου (σε % ο/ο) για χρόνους εκχύλισης 6, 24 και 48h:

$$Y_{TPC,6h} (mg/g) = 14.609 \cdot C_{ενζύμου} + 91.59 \quad (R^2=0.9671)$$

$$Y_{TPC,24h} (mg/g) = 21.004 \cdot C_{ενζύμου} + 144.83 \quad (R^2=0.9775)$$

$$Y_{TPC,48h} (mg/g) = 20.329 \cdot C_{ενζύμου} + 152.42 \quad (R^2=0.9822)$$



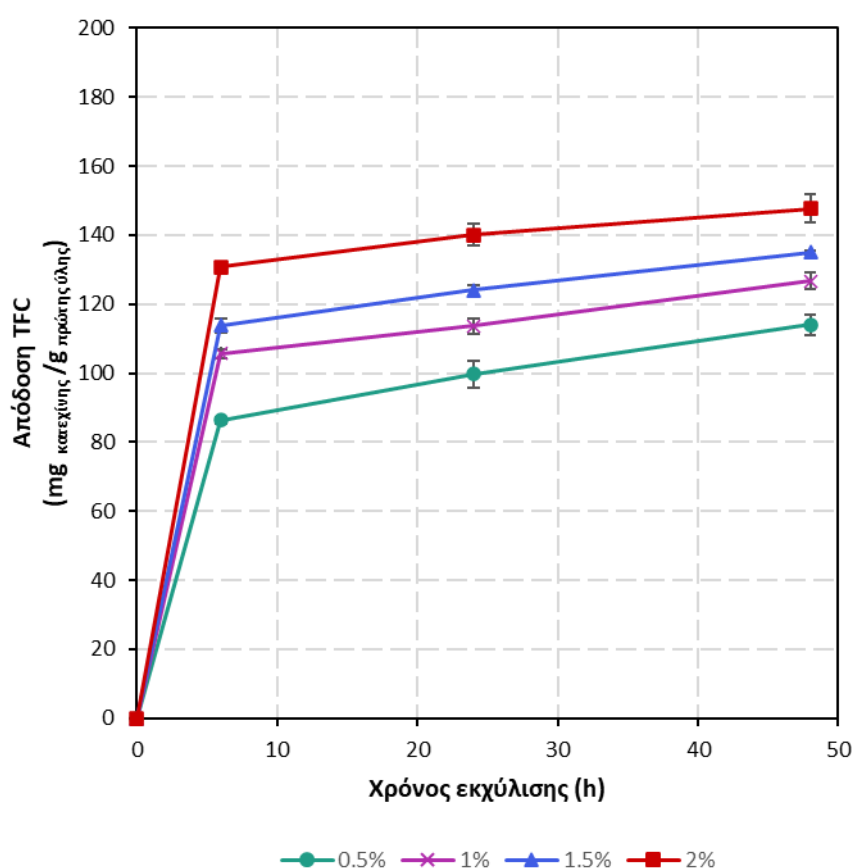
Διάγραμμα 26: Μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου για σταθερή συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48h.

Από το Διάγραμμα 26 διαπιστώνεται ότι για όλους τους εξεταζόμενους χρόνους εκχύλισης, η απόδοση TPC αυξάνεται περίπου αναλογικά με το ενζυμικό φορτίο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους ικανοποιητικούς συντελεστές προσαρμογής R^2 . Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου οδηγεί σε υψηλότερους ρυθμούς εκχύλισης λόγω του σχηματισμού περισσότερων συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος. Βέβαια, στην περίπτωση αυξανόμενης συγκέντρωσης ενζύμου, αρχικά σημειώνεται αύξηση της απόδοσης εκχύλισης έως μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια παρατηρείται μείωση. Σημειώνεται ότι η συγκέντρωση του ενζύμου που οδηγεί στη μέγιστη απόδοση ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο [61], [64]. Ωστόσο, στο εύρος ενζυμικών φορτίων που εξετάστηκε στο

συγκεκριμένο πείραμα, δεν εμφανίστηκε η βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση πέραν της οποίας θα παρουσιαζόταν πτώση της απόδοσης TPC. Επομένως, το ενζυμικό φορτίο που οδηγεί σε μέγιστη απόδοση είναι μεγαλύτερο από 2% ο/ο. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 13 (Παράγραφος 5.2.3.4) η ενζυμική συγκέντρωση 2% ο/ο αντιστοιχεί σε ενζυμική ενεργότητα 10.74 FPU/ g στερεού, η οποία είναι ήδη αρκετά υψηλή, και δεδομένης της κοστοβόρας προμήθειας των ενζυμικών σκευασμάτων, ιδιαίτερα σε βιομηχανική κλίμακα, δε κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη περισσότερου ενζυμικού φορτίου για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση.

6.3.4.2 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)

Στο Διάγραμμα 27 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τα τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία:

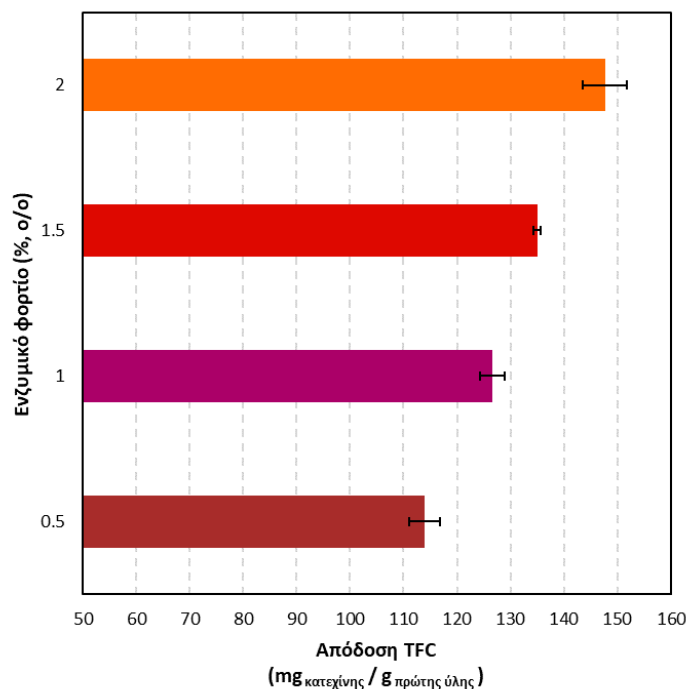


Διάγραμμα 27: Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.

Από το Διάγραμμα 27 παρατηρείται μια απότομη ανοδική τάση της απόδοσης TFC κατά τους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στη συνέχεια, μετά τις 24h οι αποδόσεις εμφανίζουν τάση για σταθεροποίηση. Εάν θεωρηθεί η απόδοση που επιτυγχάνεται στις 48 h ως η μέγιστη δυνατή, τότε η αύξηση της απόδοσης TFC μεταξύ των 24 και 48 h είναι 12.5, 10.4, 8.1 και 5.1 % για ενζυμικά φορτία 0.5, 1, 1.5 και 2%

ο/ο αντίστοιχα. Συνεπώς, στην περίπτωση των φλαβονοειδών παρατηρείται ότι για μεγαλύτερα ενζυμικά φορτία παρουσιάζεται ταχύτερα σταθεροποίηση και απαιτείται λιγότερος χρόνος προκειμένου να ολοκληρωθεί πρακτικά η εκχύλιση.

Στο Διάγραμμα 28 απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC για κάθε διαφορετικό ενζυμικό φορτίο:



Διάγραμμα 28: Μέγιστες τιμές της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm.

Οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC στο εκχύλισμα για κάθε ενζυμικό φορτίο επιτεύχθηκαν στο δείγμα των 48 h. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 28, οι μέγιστες αποδόσεις του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή μετρήθηκαν 114.0, 126.7, 135.0 και 147.7 mg κατεχίνης/g π.υ. για ενζυμικά φορτία 0.5, 1, 1.5 και 2% ο/ο αντίστοιχα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η προσθήκη μεγαλύτερου ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις TFC.

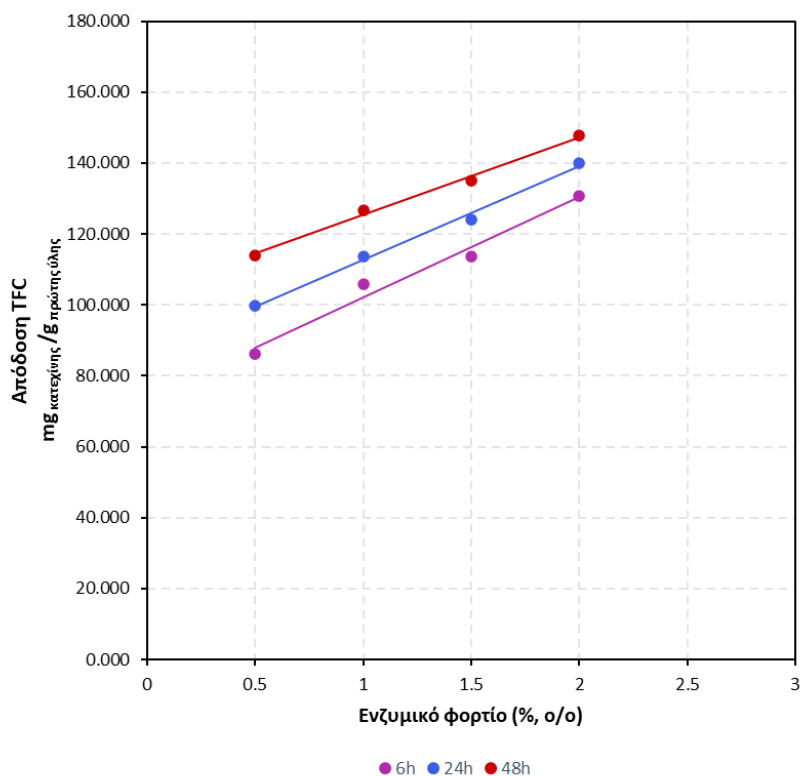
Επιπλέον, στο Διάγραμμα 29 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόδοσης TFC συναρτήσει του προστιθέμενου ενζυμικού φορτίου.

Από το Διάγραμμα 29 προκύπτουν μέσω γραμμικής παρεμβολής οι εξισώσεις που εκφράζουν την απόδοση (Y) σε TFC συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου (σε % ο/ο) για χρόνους εκχύλισης 6, 24 και 48h:

$$Y_{TFC,6h} (mg/g) = 28.233 \cdot C_{ενζύμου} + 73.839 \quad (R^2=0.9785)$$

$$Y_{TFC,24h} (mg/g) = 26.307 \cdot C_{ενζύμου} + 86.478 \quad (R^2=0.9937)$$

$$Y_{TFC,48h} (mg/g) = 21.856 \cdot C_{ενζύμου} + 103.53 \quad (R^2=0.9935)$$



Διάγραμμα 29: Μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) συναρτήσει του ενζυμικού φορτίου για σταθερή συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48h.

Από το Διάγραμμα 29 διαπιστώνεται η ίδια τάση που παρατηρήθηκε και στην απόδοση TPC, ότι δηλαδή για όλους τους εξεταζόμενους χρόνους εκχύλισης, η απόδοση TFC αυξάνεται περίπου αναλογικά με το ενζυμικό φορτίο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους υψηλούς συντελεστές προσαρμογής R^2 .

6.3.4.3 Αντιοξειδωτική δράση

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC_{50} για τα διαφορετικά ενζυμικά φορτία. Οι τιμές των δεικτών IC_{50} έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 9, 10 και 11 του Παραρτήματος για χρόνους δειγματοληψίας 6, 24 και 48 h αντίστοιχα.

Πίνακας 23: Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων για τέσσερα διαφορετικά ενζυμικά φορτία (0.5, 1, 1.5, 2 % ο/ο) για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm και για t=6, 24 & 48 h.

Ενζυμικό φορτίο (%, ο/ο)	IC ₅₀ (μl εκχυλίσματος/ml διαλύματος)		
	6h	24h	48h
0.5	0.129 ± 0.007	0.108 ± 0.009	0.101 ± 0.004
1	0.121 ± 0.003	0.101 ± 0.002	0.095 ± 0.004
1.5	0.115 ± 0.002	0.094 ± 0.001	0.072 ± 0.018
2	0.110 ± 0.001	0.092 ± 0.001	0.052 ± 0.001

Παρατηρείται ότι όσο υψηλότερο είναι το ενζυμικό φορτίο παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀. Τέλος, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, απελευθερώνονται περισσότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις και ως εκ τούτου μειώνεται ο δείκτης IC₅₀.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί μια σημαντική οπτική παρατήρηση αναφορικά με το ιξώδες των συστημάτων εκχύλισης στερεού- υγρού. Ειδικότερα, η συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης περικαρπίου της *R.canina* που εξετάστηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν 25 % β/ο, η οποία είναι αρκετά υψηλή και ως εκ τούτου οδηγεί σε εξαιρετικά παχύρρευστα εναιωρήματα. Το υψηλό αυτό ιξώδες δυσχεραίνει την καλή ανάδευση και προκειμένου να μεταφερθεί αποτελεσματικά ο διαλύτης και το υδρολυτικό ένζυμο σε όλη τη μάζα του στερεού υποστρώματος απαιτούνται είτε υψηλότεροι ρυθμοί ανάδευσης και συνεπώς περισσότερη κατανάλωση ενέργειας, είτε διαφορετικός τύπος ανάδευσης. Ωστόσο, η παρουσία του ενζύμου Cellic CTec3 διαπιστώθηκε ότι μείωνε εμφανώς το ιξώδες των παχύρρευστων συστημάτων. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του ενζυμικού φορτίου επέφερε ταχύτερη και μεγαλύτερη μείωση του ιξώδους.

Συνοψίζοντας, η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδήγησε σε αύξηση του ρυθμού εκχύλισης φλαβονοειδών, ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση εκχύλισης των φαινολικών. Επιπλέον, για μεγαλύτερες ενζυμικές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν υψηλότερες αποδόσεις TFC και TPC, καθώς και ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Τέλος, το εύρος των ενζυμικών φορτίων που μελετήθηκε φαίνεται να είναι μικρότερο από τη βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση, στην οποία επιτυγχάνονται οι μέγιστες αποδόσεις σε TPC και TFC.

6.4 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό και την αξιολόγηση των πιο σημαντικών παραγόντων μίας διεργασίας με τελικό σκοπό την αριστοποίησή της, καθώς συνδυάζει με τέτοιο τρόπο τις μεταβλητές έτσι ώστε να μπορεί να δώσει την καλύτερη απόδοση της διεργασίας.

Μελετήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση τριών παραμέτρων στο τελικό εκχύλισμα *Rosa Canina L.*, δηλαδή η αναλογία στερεού-υγρού, ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο του σκευάσματος Cellic CTec3 με στόχο τη μεγιστοποίηση (α) του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, (β) του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων και (γ) της αντιοξειδωτικής δράσης.

Για την εύρεση των πειραματικών συνθηκών με τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικός σχεδιασμός ο περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCC) τριών παραγόντων. Οι τελικές τιμές των μεταβλητών απόκρισης του πειραματικού σχεδιασμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 24:

Πίνακας 24: Αποτελέσματα εξαρτημένων μεταβλητών (TPC, TFC & IC₅₀) για τις αντίστοιχες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, χρόνος εκχύλισης, ενζυμικό φορτίο) στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.

A/A	Αναλογία στερεού - υγρού (% β/ο)	Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	Απόδοση TFC (mg κατεχίνης/g π.υ.)	Απόδοση TPC (mg γαλλικού οξέος/g π.υ.)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL δείγματος)
1	10	2	0.5	98.28	133.92	0.27
2	20	2	0.5	91.88	120.42	0.15
3	10	6	0.5	119.13	167.45	0.24
4	20	6	0.5	114.33	140.84	0.13
5	10	2	1.5	103.76	141.13	0.23
6	20	2	1.5	103.86	134.24	0.11
7	10	6	1.5	123.82	180.69	0.26
8	20	6	1.5	115.33	149.82	0.15
9	6.6	4	1	98.38	165.02	0.44
10	23.4	4	1	146.35	150.57	0.10
11	15	0.6	1	102.19	131.38	0.15
12	15	7.4	1	120.39	160.92	0.20
13	15	4	0.2	104.96	146.38	0.21
14	15	4	1.8	125.59	140.00	0.18
15	15	4	1	116.04	155.24	0.16
16	15	4	1	112.67	142.33	0.17
17	15	4	1	109.31	137.56	0.15
18	15	4	1	119.58	158.10	0.20
19	15	4	1	112.40	148.51	0.17
20	15	4	1	110.78	141.92	0.15

6.4.1 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)

Καταγράφηκε μεγάλη διακύμανση από 91.88 έως 146.35 mg κατεχίνης/g π.υ. των τιμών του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων στα ενζυμικώς επεξεργασμένα εκχυλίσματα του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *R. Canina L.* Υψηλότερες τιμές TFC εμφάνισε η πλειονότητα των εκχυλισμάτων που επεξεργάστηκε για χρόνο εκχύλισης ≥ 4 h με αναλογία στερεού-υγρού $> 15\%$ β/ο. Η συγκέντρωση του ενζύμου φάνηκε να μην επηρεάζει σημαντικά την απόδοση TFC όσο οι άλλες δύο ανεξάρτητες μεταβλητές (Πίνακας 24). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από τον στατιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA), η οποία έδειξε ότι ο χρόνος εκχύλισης έχει σημαντική επίδραση στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.01$ (Πίνακας 25).

Η προσαρμογή των μετρήσεων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων οδήγησε στο γραμμικό μοντέλο (Εξίσωση 7):

$$\text{Απόδοση TFC (mg κατεχίνης/g π.υ.)} = + 75.12044 + 0.894578 \cdot (\text{Αναλογία Στερεού-Υγρού, \% β/ο}) + 3.86028 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) + 8.47126 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο}) \quad (7)$$

Στον Πίνακα 25 παρουσιάζονται οι δείκτες F και p της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για τις τιμές απόδοσης TFC, στο πλήρες μοντέλο.

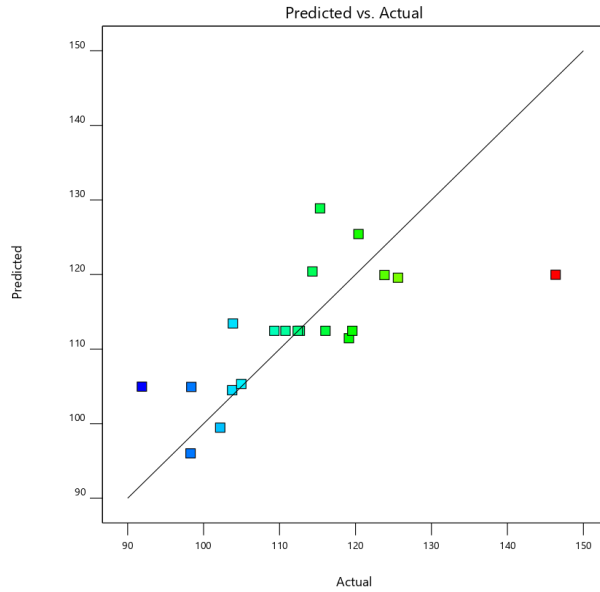
Πίνακας 25: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.

	F-value	p-value
Μοντέλο	4.91	0.0132
Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)	3.02	0.1014
Χρόνος εκχύλισης (h)	9.00	0.0085
Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	14.58	0.1193
R ²	0.4793	

Η F-value του μοντέλου είναι 4.91, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 1.32% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Στη μοντελοποίηση συνηθίζεται, οι όροι με τιμές p-values μεγαλύτερες από 0.1 να θεωρούνται στατιστικά μη σημαντικοί και να απαλείφονται από το μοντέλο στο επιθυμητό όριο εμπιστοσύνης [102]. Από τη στατιστική επεξεργασία των συντελεστών της Εξίσωσης 7, προέκυψε ότι και οι τρεις γραμμικοί όροι εμφάνισαν $p \leq 0.1$ και είναι στατιστικά σημαντικοί. Η τιμή του R² του μοντέλου είναι 0.4793, η οποία δεν συγκλίνει στο 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης, όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 30, το οποίο απεικονίζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών TFC από το μοντέλο με τις πραγματικές τιμές TFC που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν.

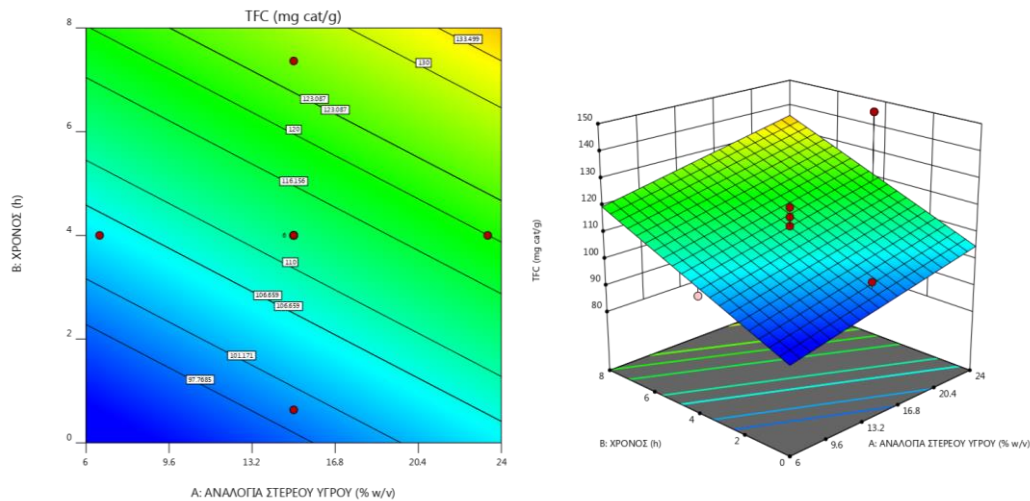
TFC (mg cat/g)
(adjusted for curvature)

Color points by value of
TFC (mg cat/g):
91.88 ■ 146.35 ■



Διάγραμμα 30: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών της απόδοσης TFC στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.

Η σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής, δηλαδή του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC), και των ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή της αναλογίας στερεού-υγρού και του χρόνου εκχύλισης, κρατώντας σταθερό το φορτίο ενζύμου στην κεντρική του τιμή 1 % ο/ο, διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας τις ισοϋψείς καμπύλες (Διάγραμμα 31).



Διάγραμμα 31: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή συναρτήσεως των μεταβλητών (χρόνος εκχύλισης, αναλογία στερεού-υγρού) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.

Από το Διάγραμμα 31 φαίνεται ότι και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην αύξηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή. Παρ'όλα αυτά ισχυρότερη επίδραση στο ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) εμφανίζει ο χρόνος εκχύλισης, και συγκεκριμένα η αύξησή του κατά περίπου 2 h οδηγεί σε αύξηση

$$\begin{aligned}
 & (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) + 0.117500 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% } \beta/\alpha) \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% } \alpha/\alpha) + 0.148750 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% } \alpha/\alpha) + \\
 & 0.122698 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% } \beta/\alpha)^2 - 0.262550 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h})^2 - 8.38687 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% } \alpha/\alpha)^2 \quad (8)
 \end{aligned}$$

Δεδομένου ότι στόχος του πειραματικού σχεδιασμού είναι η εύρεση εκείνων των συνθηκών που μεγιστοποιούν την απόδοση TPC και η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) είναι ένα εργαλείο που μπορεί να δείξει ποιοι παράγοντες είναι στατιστικά σημαντικοί για την μεγιστοποίηση των αποκρίσεων, εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης και παρουσιάζεται στον Πίνακα 26. Στον Πίνακα 26, εμφανίζονται οι F-value και p-value των γραμμικών και τετραγωνικών όρων καθώς και των αλληλεπιδράσεών τους για το πλήρες μοντέλο. Από τον Πίνακα 26 προκύπτει ότι το πλήρες μοντέλο είναι έγκυρο σύμφωνα με την p-τιμή του Fisher F-test και μπορεί να εξηγήσει σωστά την απόδοση TPC (απόκριση μοντέλου). Παρά τα αποτελέσματα αυτά, παρατηρείται ότι οι τιμές p-values ορισμένων από τις μεταβλητές του πλήρους μοντέλου δεν είναι σημαντικές. Στη μοντελοποίηση συνηθίζεται, οι όροι με τιμές p-values μεγαλύτερες από 0.1 να θεωρούνται στατιστικά μη σημαντικοί και να απαλείφονται από το μοντέλο στο επιθυμητό όριο εμπιστοσύνης [102].

Η F-value του μοντέλου είναι 4.73, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 1.17% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων είναι 0.8098, η οποία συγκλίνει στο 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Από την στατιστική επεξεργασία των συντελεστών της Εξίσωσης 8 απαλείφθηκαν αυτοί που εμφάνισαν τιμές $p > 0.1$. Προέκυψε το απλοποιημένο μαθηματικό μοντέλο (Εξίσωση 9) στο οποίο όλοι οι συντελεστές των μεταβλητών είναι στατιστικά σημαντικοί και μπορεί να προβλέψει με αξιοπιστία το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης.

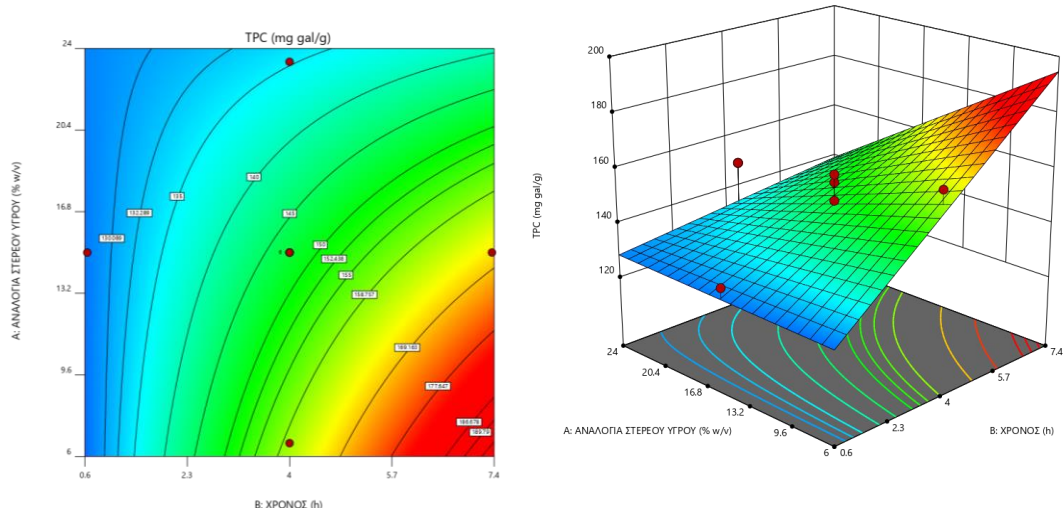
$$\begin{aligned}
 \text{Απόδοση TPC (mg γαλλικού οξέος/g π.υ.)} = & + 147.32 - 7.48 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% } \beta/\alpha) + 11.63 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) + 2.38 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% } \alpha/\alpha) - 4.64 \\
 & \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% } \beta/\alpha) \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) \quad (9)
 \end{aligned}$$

Πίνακας 26: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων στον πειραματικό σχεδιασμό CCC του πλήρους και του τροποποιημένου μοντέλου.

	Πλήρες		Τροποποιημένο	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Μοντέλο	4.73	0.0117	11.09	0.0002
Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)	10.51	0.0089	11.86	0.0036
Χρόνος εκχύλισης (h)	25.37	0.0005	28.63	< 0.0001
Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	1.06	0.3266	1.20	0.2904
Αναλογία στερεού-υγρού (% ο/ο)* Χρόνος εκχύλισης (h)	2.36	0.1552	2.67	0.1232
Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)* Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	0.0095	<u>0.9243</u>		
Χρόνος εκχύλισης (h) * Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	0.0024	<u>0.9616</u>		
Αναλογία στερεού-υγρού² (% β/ο)²	1.86	<u>0.2021</u>		
Χρόνος εκχύλισης² (h)²	0.2184	<u>0.6503</u>		
Ενζυμικό φορτίο² (% ο/ο)²	0.8707	<u>0.3728</u>		
R²	0.8098		0.7473	

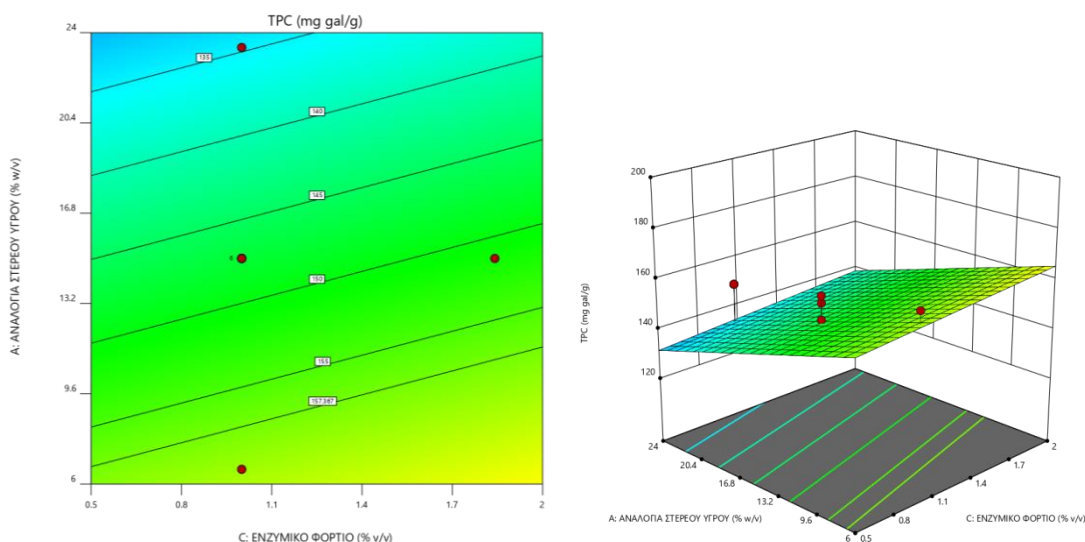
Πέντε όροι από το πλήρες μοντέλο απαλείφθηκαν εκ των οποίων δύο όροι των αλληλεπιδράσεων και τρεις τετραγωνικοί όροι. Η F-value του τροποποιημένου μοντέλου βελτιώθηκε, δηλαδή από 4.73 ανήλθε στην τιμή 11.09. Η τιμή αυτή υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 0.02% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Η τιμή του R² του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων είναι 0.7473.

Η σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής, δηλαδή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC), και των ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή της αναλογίας στερεού-υγρού και του χρόνου εκχύλισης, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1 % ο/ο, διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας τις ισοϋψείς καμπύλες (Διάγραμμα 33).



Διάγραμμα 33: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών (χρόνος εκχύλισης, αναλογία στερεού-υγρού) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.

Από τις ισοϋψείς καμπύλες παρατηρείται ότι τιμές αναλογίας στερεού-υγρού ίσες με 6.0 % β/ο και χρόνος εκχύλισης μεταξύ 4-7.5h οδηγούν σε υψηλές τιμές TPC. Ισχυρότερη επίδραση εμφανίζει ο χρόνος εκχύλισης, αύξηση του οποίου κατά 1h οδηγεί σε αύξηση κατά 10 mg γαλλικού οξέος/g π.υ., γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τον στατιστικό έλεγχο, όπου ο χρόνος εκχύλισης εμφανίζεται ως ο στατιστικά πιο σημαντικός παράγοντας με τιμή $p < 0.0001$. Η μέγιστη τιμή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα που μπορεί να επιτευχθεί είναι τα 190 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. σε χρόνο εκχύλισης 7h και σε αναλογία στερεού-υγρού 6.0 % β/ο.



Διάγραμμα 34: Ισοϋψείς καμπύλες ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, ενζυμικό φορτίο) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.

Στο Διάγραμμα 34 παρουσιάζεται η επίδραση της αναλογίας στερεού-υγρού (% β/ο) και του ενζυμικού φορτίου (% ο/ο) στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων για σταθερό χρόνο εκχύλισης 4h (κεντρική τιμή). Σύμφωνα με τις ισοϋψείς καμπύλες φαίνεται ότι η ταυτόχρονη μείωση της αναλογίας στερεού-υγρού μέχρι την τιμή 6.0% και του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αυξημένες τιμές TPC. Η μέγιστη τιμή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα που μπορεί να επιτευχθεί είναι 158 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. στην μικρότερη αναλογία στερεού-υγρού και ενζυμικού φορτίου, δηλαδή 6.0 % β/ο και 0.5% ο/ο αντίστοιχα.

6.4.3 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH- Αντιοξειδωτική δράση (IC₅₀)

Από τον πειραματικό σχεδιασμό προέκυψαν εκχυλίσματα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα εμφανίστηκε στις συνθήκες όπου η αναλογία στερεού-υγρού κυμάνθηκε μεταξύ 20 και 23.4 % β/ο και σε χρόνους εκχύλισης μεσαίους έως υψηλούς (4-6h). Από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) προέκυψε ότι η αναλογία στερεού-υγρού έχει σημαντική επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Πίνακας 27).

Η προσαρμογή των μετρήσεων αντιοξειδωτικής δράσης οδήγησε στο παρακάτω δευτεροβάθμιο μοντέλο (Εξίσωση 10):

$$\text{Δείκτης IC}_{50} (\mu\text{L εκχυλίσματος/mL δείγματος}) = + 0.762858 - 0.053959 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο}) - 0.010844 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) - 0.113436 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο}) + 0.000250 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο}) \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) - 4.30375 \cdot 10^{-17} \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο}) \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο}) + 0.015000 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο}) + 0.001262 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο})^2 - 0.000512 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h})^2 + 0.020095 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο})^2 \quad (10)$$

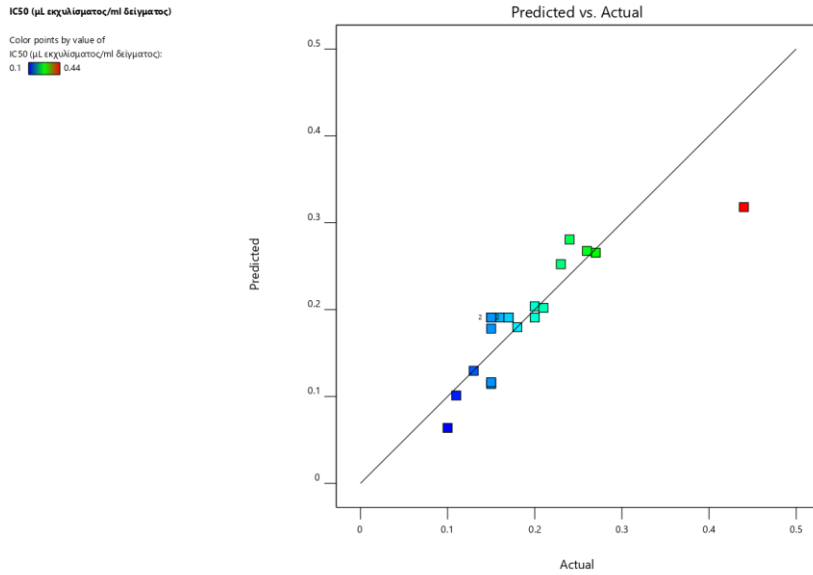
Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης (ANOVA) του πλήρους και του τροποποιημένου μαθηματικού μοντέλου. Από την στατιστική επεξεργασία των συντελεστών της Εξίσωσης 10 εξαλείφθηκαν οι στατιστικά μη σημαντικοί συντελεστές, δηλαδή αυτοί που δεν συνεισφέρουν σημαντικά στην εκτίμηση της μετρούμενης απόκρισης και προέκυψε το εξής απλοποιημένο μαθηματικό μοντέλο (Εξίσωση 11):

$$\text{IC}_{50} (\mu\text{L εκχυλίσματος/mL δείγματος}) = + 0.675749 - 0.0526636 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο}) + 0.003811 \cdot (\text{Χρόνος εκχύλισης, h}) - 0.013247 \cdot (\text{Ενζυμικό φορτίο, \% ο/ο}) + 0.001251 \cdot (\text{Αναλογία στερεού-υγρού, \% β/ο})^2 \quad (11)$$

Πίνακας 27: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την αντιοξειδωτική δράση του πλήρους και του τροποποιημένου μαθηματικού μοντέλου στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.

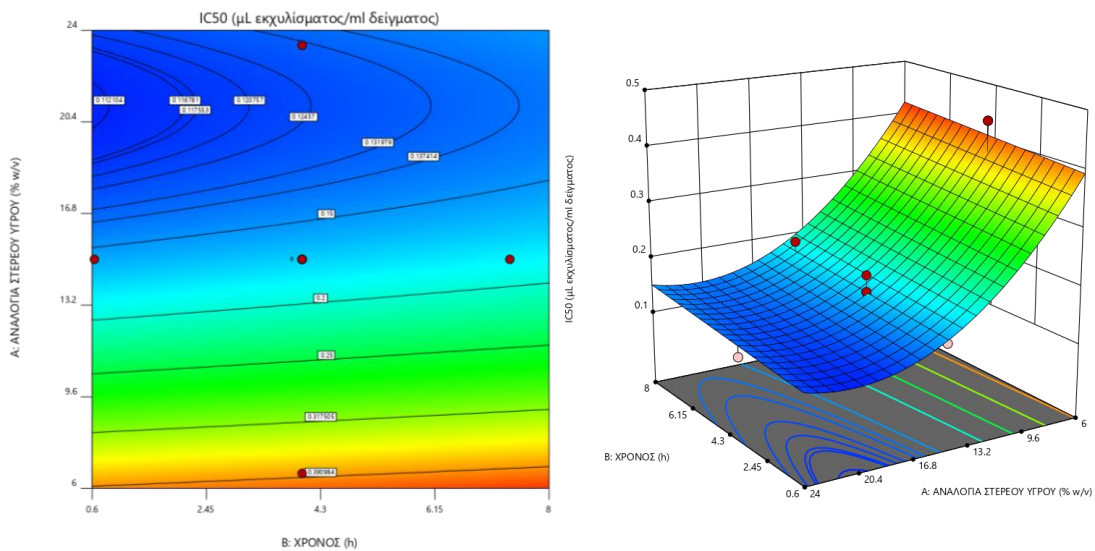
	Πλήρες		Τροποποιημένο	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Μοντέλο	10.28	0.0006	27.71	<0.0001
Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)	75.15	< 0.0001	92.21	<0.0001
Χρόνος εκχύλισης (h)	0.7648	0.4024	0.9384	0.3481
Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	0.5775	0.4648	0.7086	0.4131
Αναλογία στερεού-υγρού (% ο/ο)* Χρόνος εκχύλισης (h)	0.0482	<u>0.8306</u>		
Αναλογία στερεού-υγρού (% β/ο)* Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	0.0000	<u>1.0000</u>		
Χρόνος εκχύλισης (h) * Ενζυμικό φορτίο (% ο/ο)	1.74	<u>0.2171</u>		
Αναλογία στερεού-υγρού² (% β/ο)²	13.82	0.0040	16.97	0.0009
Χρόνος εκχύλισης² (h)²	0.0582	<u>0.8142</u>		
Ενζυμικό φορτίο² (% ο/ο)²	0.3506	<u>0.5669</u>		
R²	0.9025		0.8808	

Πέντε όροι από το πλήρες μοντέλο απαλείφθηκαν εκ των οποίων τρεις όροι των αλληλεπιδράσεων και δύο τετραγωνικοί όροι. Η F-value του τροποποιημένου μοντέλου βελτιώθηκε, δηλαδή από 10.28 ανήλθε στην τιμή 27.71. Η τιμή αυτή υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 0.01% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Η τιμή του R² του μοντέλου που περιγράφει την αντιοξειδωτική δράση είναι 0.8808 και το διάγραμμα που παρουσιάζει τη συσχέτιση προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών των δεικτών IC₅₀ είναι το εξής (Διάγραμμα 35):



Διάγραμμα 35: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών των δεικτών IC₅₀ ενδεικτικών της αντιοξειδωτικής δράσης στον πειραματικό σχεδιασμό CCC.

Η αλληλεπίδραση της αναλογίας στερεού υγρού (% β/ο) και χρόνου εκχύλισης (h) στην αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζεται στο διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο (κεντρική τιμή) (Διάγραμμα 36).

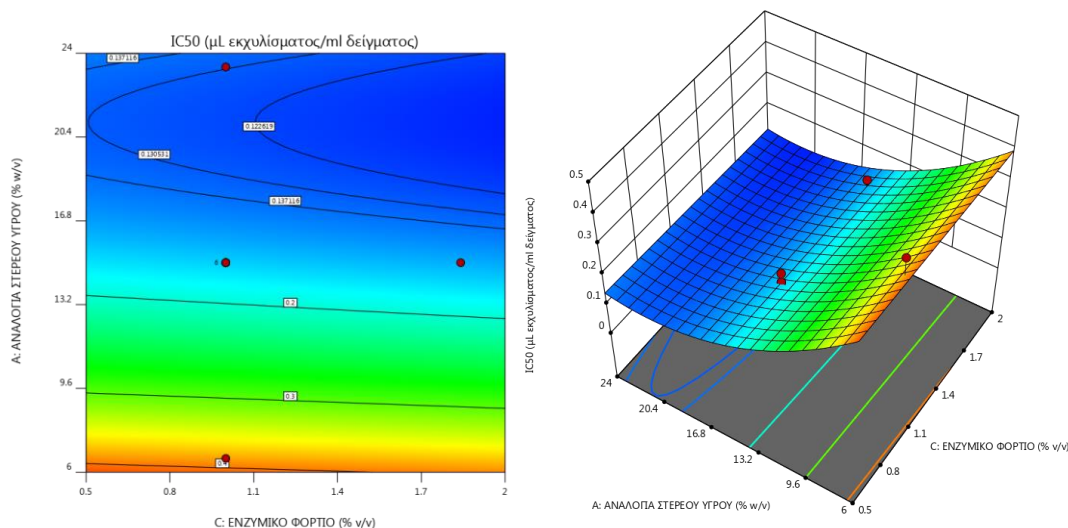


Διάγραμμα 36: Ισοϋψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, χρόνος εκχύλισης) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.

Από τις ισοϋψείς καμπύλες φαίνεται ότι ισχυρότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η αναλογία στερεού-υγρού, αύξηση της οποίας οδηγεί σε μειωμένες τιμές δεικτών IC₅₀, δηλαδή σε εκχυλίσματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Παράλληλα, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε εκχυλίσματα με μειωμένη αντιοξειδωτική δράση. Η μέγιστη τιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας που μπορεί να επιτευχθεί στις μελετηθείσες συνθήκες είναι IC₅₀=0.11 μL εκχυλίσματος/mL δείγματος για αναλογία στερεού-υγρού 20% β/ο και χρόνο

εκχύλισης 2h. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τον στατιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και προέκυψε ότι ο παράγοντας που επηρεάζει περισσότερο την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος είναι η αναλογία στερεού υγρού (% β/ο) σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.0001$.

Η αλληλεπίδραση της αναλογίας στερεού-υγρού (% β/ο) και ενζυμικού φορτίου (% ο/ο) για χρόνο εκχύλισης 4h (κεντρική τιμή) στην αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζεται στο διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών (Διάγραμμα 37).



Διάγραμμα 37: Ισοϋψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας συναρτήσει των μεταβλητών (αναλογία στερεού-υγρού, ενζυμικό φορτίο) του πειραματικού σχεδιασμού CCC.

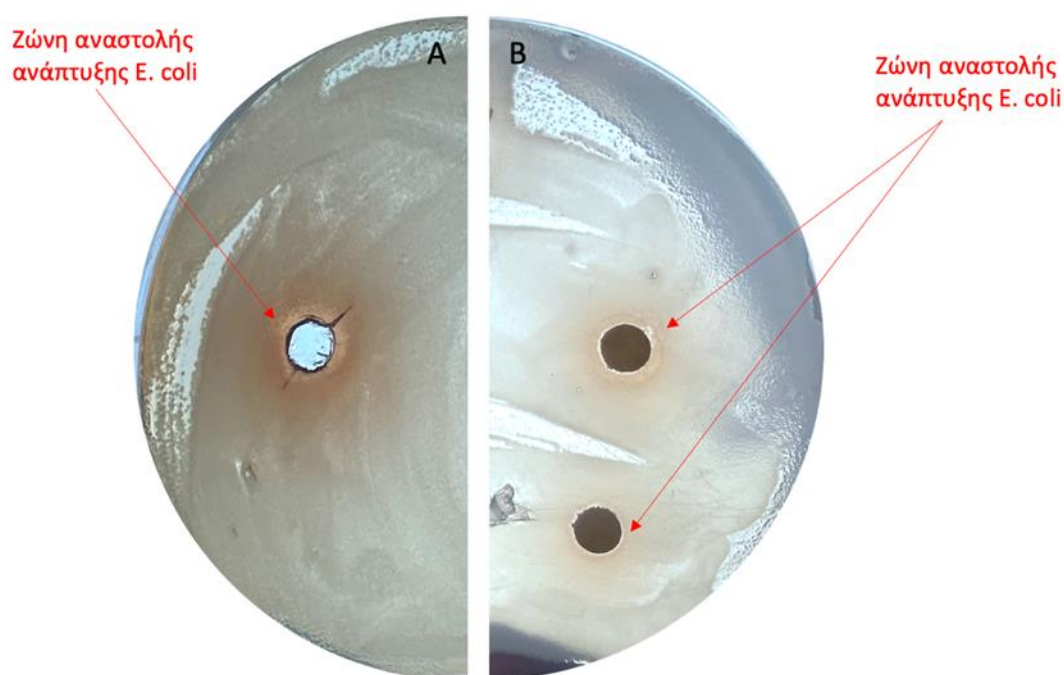
Ισχυρότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η αναλογία στερεού-υγρού, αύξηση της οποίας μέχρι την τιμή 21 % β/ο οδηγεί σε μειωμένες τιμές δεικτών IC_{50} , δηλαδή σε εκχυλίσματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Μεγαλύτερες από 1.5 % ο/ο συγκεντρώσεις ενζύμου φαίνεται να επιδρούν θετικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα, ενζυμικό φορτίο μεγαλύτερο από 1.5 % ο/ο οδηγεί σε υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Η βέλτιστη αντιοξειδωτική ικανότητα που μπορεί να επιτευχθεί στις επιλεγείσες συνθήκες είναι $IC_{50} = 0.11 \mu\text{L}$ εκχυλίσματος/mL δείγματος για αναλογία στερεού-υγρού 21 % β/ο και 1.5 % ο/ο φορτίο ενζύμου.

6.4.4 Βελτιστοποίηση

Πραγματοποιήθηκε εύρεση των τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών που οδηγούν σε ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών (ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή, ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, αντιοξειδωτική ικανότητα) με χρήση του λογισμικού Design-Expert. Η μεγιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας τις βέλτιστες τιμές χρόνου εκχύλισης (6 h), ενζυμικού φορτίου (1.5% ο/ο) και αναλογίας στερεού-υγρού (17.9091% β/ο), ενώ οι μέγιστες τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών που μπορούν να επιτευχθούν είναι οι ακόλουθες: απόδοση ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή TFC = 127.005 mg κατεχίνης/g π.υ., απόδοση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων TPC = 152.554 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. και αντιοξειδωτική ικανότητα με δείκτη IC₅₀= 0.13752 μL εκχυλίσματος/mL δείγματος.

6.4.5 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων

Στην Εικόνα 37 παρουσιάζεται το οπτικό αποτέλεσμα που προέκυψε από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ιδιότητας του εκχυλίσματος του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina L.*). Ειδικότερα, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος για συγκέντρωση στερεού 10% β/ο, ενζυμικό φορτίο 1.5% ο/ο και χρόνο εκχύλισης 6 h με τη μέθοδο διάχυσης πηγαδιού και τη μέθοδο διάχυσης δίσκου.



Εικόνα 37: Αντιμικροβιακή δράση εκχυλίσματος: (A) μέθοδος διάχυσης πηγαδιού, (B) μέθοδος διάχυσης δίσκου

Η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος οφείλεται στις βιοδραστικές ενώσεις που απελευθερώθηκαν χάρη στη δράση του εμπορικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec3 στο περικάρπιο του καρπού του *R. canina L.* και ποιοτικά

υποδηλώνεται από την εμφάνιση μιας ζώνης αναστολής ανάπτυξης του *E. coli*, περιμετρικά του εμποτισμένου με το εκχύλισμα δισκίου (Εικόνα 37-B) ή του πηγαδιού αντίστοιχα (Εικόνα 37-A).

Στην περίπτωση του εμποτισμένου δισκίου με εκχύλισμα παρατηρείται μία μικρή ζώνη αναστολής. Αντίθετα, με τη μέθοδο διάχυσης πηγαδιού, στην οποία το εκχύλισμα διαχέεται στον πυθμένα του τρυβλίου, παρατηρείται μεγαλύτερη ζώνη αναστολής που κυμαίνεται μεταξύ 5mm και 10mm. Πληθώρα δημοσιεύσεων αναφέρονται στην αντιμικροβιακή δράση εκχυλισμάτων του άνθους, των πετάλων, του καρπού, του περικαρπίου και των σπόρων από το φυτό *R. canina L.*. Στις περιπτώσεις αυτές ως μέσο εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν οργανικοί διαλύτες, όπως αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρας, χλωροφόρμιο και εξάνιο, και δοκιμάστηκαν διαφορετικοί μικροοργανισμοί (*Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *P. Aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*) [103]–[112]. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί 3.33mm ζώνη αναστολής έναντι του μικροοργανισμού *Escherichia coli* με αιθανολικό εκχύλισμα άνθους *R. canina L.*, ενώ αύξηση κατά 1mm της ζώνης αναστολής καταγράφηκε με μεθανολικό εκχύλισμα άνθους *R. canina L* [106].

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων *R. canina L.* που έχουν προέλθει από ενζυμική εκχύλιση δεν έχει ακόμα ευρέως μελετηθεί και ως εκ τούτου δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές. Η αντιμικροβιακή δράση του άγριου τριαντάφυλλου οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση φαινολικών, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι το φλαβονοειδές καμπερόλη έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι στους μικροοργανισμούς *Lactobacillus plantarum*, *Proteus mirabilis* και *Staphylococcus epidermidis* [111], ενώ έχει διαπιστωθεί επίσης ότι σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Escherichia coli* CCM 3988, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* και *Alternaria alternata fungi* εμφανίζουν οι φαινολικές ενώσεις αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων από τον καρπό και τα αποξηραμένα πέταλα του άγριου τριαντάφυλλου (*R. canina L.*) [110]. Ωστόσο, μία διαφορετική μελέτη αντιμικροβιακής δράσης του εκχυλίσματος άγριου τριαντάφυλλου που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση χρησιμοποιώντας δύο ενζυμικά σκευάσματα Viscoferm και Pectinex Ultra Color έδειξε ότι με τη μέθοδο διάχυσης πηγαδιού η ζώνη αναστολής κυμαίνεται μεταξύ 12mm και 15mm. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης της αντιμικροβιακής δράσης ενζυμικών εκχυλισμάτων που έχουν προκύψει από διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα.

Κεφάλαιο 7 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν διαφορετικές παράμετροι που επηρεάζουν τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.) χρησιμοποιώντας το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic CTec3 της Novozymes, το οποίο αποτελεί μίγμα κυτταρινασών και ημικυτταρινασών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις πειραματικές σειρές, στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης, της αναλογίας στερεού-υγρού και του ενζυμικού φορτίου ταυτόχρονα με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης. Η απόδοση των διεργασιών αξιολογήθηκε με βάση τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση σύστασης της πρώτης ύλης, ενώ διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση της διεργασίας με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού (CCC).

Από την ανάλυση σύστασης του αποξηραμένου περικαρπίου του καρπού της *R. canina* L., η περιεκτικότητα των υδατοδιαλυτών ενώσεων ανήλθε στο 40.3% β/β (ξ.β.) και η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη εκτιμήθηκε στο 9.9% β/β και 10.9% β/β (ξ.β.) αντίστοιχα.

Μία σημαντική παράμετρος που επηρεάζει τον χρόνο εκχύλισης και την συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε βιοδραστικές ενώσεις στην EYE είναι η κοκκομετρία της πρώτης ύλης. Χρόνοι εκχύλισης διάρκειας 4-6h για διαφορετικές κοκκομετρίες του περικαρπίου του καρπού της *R. canina* L. είναι αρκετοί για την απελευθέρωση της μέγιστης ποσότητας βιοδραστικών ενώσεων. Όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία του στερεού, τόσο περισσότερο αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση. Η καλύτερη άλεση της πρώτης ύλης αυξάνει τη διεπιφάνεια στερεάς μήτρας-διαλύτη, ενισχύοντας τον ρυθμό μεταφοράς της διαλυμένης ουσίας στον κύριο όγκο του υγρού, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει την προσβασιμότητα του ενζύμου στο υπόστρωμά του.

Η αναλογία στερεού-υγρού είναι ακόμα μία κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει την EYE. Για τις μελετούμενες αναλογίες στερεού-υγρού διαπιστώθηκε ότι η εκχύλιση πρακτικά τερματίζεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ των 6 και 8 h. Καταγράφηκε αύξηση της απόδοσης TPC της τάξης του 90-183% συγκριτικά με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα της συμβατικής εκχύλισης, ενώ σημειώθηκε αύξηση της απόδοσης TFC της τάξης του 119-133% συγκριτικά με τα αντίστοιχα υδροαιθανολικά εκχυλίσματα. Οι σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις TPC και TFC που επιτυγχάνονται μέσω της EYE, συνιστούν ελπιδοφόρα προοπτική για την εφαρμογή της EYE σε βιομηχανική κλίμακα. Γενικά, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος των εκχυλιζόμενων βιοδραστικών ενώσεων, ενώ αντίθετα παρατηρείται μείωση της απόδοσης ανά μονάδα μάζας στερεού. Η φυσική σημασία της μείωσης αποδόθηκε στους περιορισμούς που προκαλεί το υψηλό ιξώδες στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι

η αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης και του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀.

Η εφαρμογή υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού (50% β/ο) απαιτεί σημαντικά μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, ώστε να απελευθερωθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων. Για πολύ υψηλές αναλογίες στερεού-υγρού προέκυψαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις TPC και TFC ανά μονάδα όγκου εκχυλίσματος, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μείωση των αποδόσεων TPC και TFC ανά μονάδα μάζας στερεού. Η μείωση αυτή οφείλεται στη χαμηλή προστιθέμενη ποσότητα υδατικού διαλύτη, ο οποίος χρησιμεύει ως μέσο διάχυσης του ενζύμου, του υποστρώματος και των εκχυλιζόμενων βιοενεργών ενώσεων, και στη συνεπακόλουθη αύξηση του ιξώδους του συστήματος. Ομοίως με τις χαμηλές συγκεντρώσεις στερεού, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης και του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, δηλαδή μετρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀.

Το ενζυμικό φορτίο είναι ακόμα μία βασική παράμετρος που επηρεάζει την ΕΥΕ. Η αύξηση της ενζυμικής συγκέντρωσης οδηγεί σε αναλογική αύξηση των αποδόσεων TPC και TFC, γεγονός που υποδεικνύει ότι το εύρος των ενζυμικών φορτίων που μελετήθηκε είναι μικρότερο από τη βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση. Γενικά, στην περίπτωση αυξανόμενης συγκέντρωσης ενζύμου, αρχικά σημειώνεται αύξηση της απόδοσης εκχύλισης έως μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια παρατηρείται μείωση. Ωστόσο, στο εύρος ενζυμικών φορτίων που εξετάστηκε στο συγκεκριμένο πείραμα, δεν εμφανίστηκε η βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση πέραν της οποίας θα παρουσιαζόταν πτώση της απόδοσης TPC/TFC και συνεπώς το ενζυμικό φορτίο που οδηγεί σε μέγιστη απόδοση είναι μεγαλύτερο από 2% ο/ο. Όμως, η ενζυμική συγκέντρωση 2% ο/ο αντιστοιχεί σε αρκετά υψηλή ενζυμική ενεργότητα (10.74 FPU/g στερεού), και δεδομένης της κοστοβόρας προμήθειας των ενζυμικών σκευασμάτων, ιδιαίτερα σε βιομηχανική κλίμακα, δε κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη περισσότερου ενζυμικού φορτίου για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η ταυτόχρονη αύξηση του ενζυμικού φορτίου και του χρόνου εκχύλισης ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και επομένως προκύπτουν μικρότερες τιμές του δείκτη IC₅₀.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των τεσσάρων διαφορετικών πειραματικών σειρών εφαρμόστηκε ο περιγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCC) τριών παραγόντων, στον οποίο μελετήθηκε η ταυτόχρονη επίδραση της αναλογίας στερεού-υγρού (εύρος 6.6-23.4 % β/ο), του χρόνου εκχύλισης (εύρος 0.6-7.4 h) και του ενζυμικού φορτίου (εύρος 0.2-1.8 % ο/ο). Προέκυψαν 20 συνδυασμοί των τριών παραγόντων με τους οποίους εκχυλίστηκε το περικάρπιο του καρπού της *R. canina L.*.

Τα αποτελέσματα των εξαρτημένων μεταβλητών (TFC, TPC, IC₅₀) προσαρμόστηκαν σε γραμμικά και σε δευτεροβάθμια πλήρη ή απλοποιημένα μαθηματικά μοντέλα, στα οποία όλοι οι συντελεστές των όρων ήταν στατιστικά σημαντικοί σε επίπεδο $p < 0.1$. Τέλος, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών μέσω των ισούψων καμπυλών.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) προσαρμόστηκαν σε γραμμικό μοντέλο με όλους τους όρους στατιστικά σημαντικούς και τον χρόνο εκχύλισης να εμφανίζει την μικρότερη τιμή p , δηλαδή να συνιστά τον στατιστικά πιο σημαντικό παράγοντα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις ισοϋψείς καμπύλες από τις οποίες παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη επίδραση στο ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εμφανίζει ο χρόνος εκχύλισης, αύξηση του οποίου οδηγεί σε εκχυλίσματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε TFC. Η προσαρμογή των μετρήσεων ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) οδήγησε σε δευτεροβάθμιο απλοποιημένο μοντέλο με τον χρόνο εκχύλισης να είναι ο στατιστικά πιο σημαντικός παράγοντας, το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τις ισοϋψείς καμπύλες. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που εξάχθηκε από τις ισοϋψείς καμπύλες είναι ότι η εφαρμογή χαμηλών αναλογιών στερεού-υγρού και ενζυμικού φορτίου οδηγούν σε αυξημένες τιμές TPC.

Από τον σχεδιασμό CCC προέκυψε δευτεροβάθμιο απλοποιημένο μοντέλο, η εξίσωση του οποίου περιγράφει πολύ καλά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Από τα διαγράμματα των ισοϋψών καμπυλών διαπιστώθηκε ότι ισχυρότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η αναλογία στερεού-υγρού, αύξηση της οποίας οδηγεί σε μειωμένες τιμές δεικτών IC_{50} . Η αλληλεπίδραση της αναλογίας στερεού-υγρού (% β/ο) και ενζυμικού φορτίου (% ο/ο) για χρόνο εκχύλισης 4h έδειξε ότι ισχυρότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η αναλογία στερεού-υγρού (έως την τιμή 21 % β/ο), ενώ μεγαλύτερες από 1.5 % ο/ο συγκεντρώσεις ενζύμου φαίνεται να επιδρούν θετικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας της EYE με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή και του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και την ελαχιστοποίηση του δείκτη IC_{50} εφαρμόζοντας τη συνάρτηση επιθυμίας. Οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών, που βελτιστοποιούν τις εξαρτημένες, είναι οι ακόλουθες: χρόνος εκχύλισης 6h, συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης 18 % β/ο και ενζυμικό φορτίο 1.5% ο/ο, ενώ οι βέλτιστες τιμές αποκρίσεων (εξαρτημένες μεταβλητές) που προέκυψαν είναι: TFC = 127.005 mg κατεχίνης/g π.υ., TPC = 152.554 mg γαλλικού οξέος/g π.υ. και IC_{50} = 0.13752 μ L εκχυλίσματος/mL δείγματος.

Κεφάλαιο 8 Προοπτικές - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Από τη μελέτη που εκπονήθηκε στη παρούσα διπλωματική εργασία αναδύθηκε πληθώρα εναλλακτικών προτάσεων για μελλοντική έρευνα στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina L.*). Από τη σύγκριση των αποδόσεων μεταξύ της ΕΥΕ και της συμβατικής εκχύλισης προέκυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο για την συνέχιση και εξέλιξη της ερευνητικής δράσης στον τομέα αυτό όσο και για την προσπάθεια ευρύτερης εφαρμογής της ΕΥΕ σε βιομηχανική κλίμακα.

Τα ένζυμα έχουν συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην εκχύλιση φυσικών μεταβολιτών. Αρχικά, χάρη στον οικολογικό χαρακτήρα της ΕΥΕ, τα προϊόντα που έχουν προκύψει από ενζυμική επεξεργασία χαρακτηρίζονται ως φυσικά. Επιπλέον, τα ένζυμα προσφέρουν τη δυνατότητα ασφαλούς χειρισμού και απαιτούν υδατικούς διαλύτες, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι τοξικοί, πτητικοί και συχνά ακριβοί οργανικοί διαλύτες. Η απουσία επικίνδυνων οργανικών διαλυτών δύναται επίσης να μειώσει τα στάδια διαχωρισμού και να απλοποιήσει την διαδικασία καθαρισμού του τελικού προϊόντος. Μάλιστα, στην περίπτωση της εκχύλισης κάποιου ελαίου, δεδομένου ότι η ΕΥΕ πραγματοποιείται στην υδατική φάση, το έλαιο μπορεί εύκολα να απομονωθεί λόγω της μη αναμιξιμότητας. Επίσης, η ενζυμική εκχύλιση πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης γεγονός που οδηγεί σε ενεργειακή εξοικονόμηση και συνεπώς μπορεί να συμβάλει στη μείωση των λειτουργικών εξόδων. Οι ήπιες συνθήκες εμποδίζουν την καταστροφή των θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ουσιών (βιταμίνη C, καροτενοειδή), που συχνά περιέχονται στα εκχυλίσματα, αυξάνοντας έτσι την ποιότητα των τελικών προϊόντων. Επιπρόσθετα, τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, πράγμα που μπορεί να συντελέσει σε αυξημένες αποδόσεις της διεργασίας εκχύλισης, μείωση του απαιτούμενου χρόνου εκχύλισης αλλά και μείωση του αριθμού των σταδίων της διεργασίας. Ένα ακόμη πλεονέκτημα για την εφαρμογή της ΕΥΕ σε βιομηχανική κλίμακα αφορά στον εξοπλισμό που απαιτείται, οποίος δεν είναι εξειδικευμένος και συνήθως είναι διαθέσιμος στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις.

Ενώ τα ένζυμα, όπως επισημάνθηκε, παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, η μεγάλη κλίμακας εφαρμογή τους δυσχεραίνεται λόγω του κόστους της προμήθειάς τους, αλλά και λόγω των παρατεταμένων χρόνων επώασης που απαιτούνται σε ορισμένες περιπτώσεις. Αν και τα ένζυμα έχουν βρει εφαρμογή σε πολλές βιοδιεργασίες σε βιομηχανική κλίμακα, όπως στη φαρμακευτική βιομηχανία, στη βιομηχανία ενέργειας και στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων, η χρήση τους συχνά περιορίζεται για την παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής αξίας, αφού το υψηλό κόστος ενός εξειδικευμένου τελικού προϊόντος αντισταθμίζει το κόστος παραγωγής.

Στη συνέχεια, προτείνονται ορισμένες λύσεις, η οποίες παρουσιάζουν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον, έτσι ώστε να αρθούν οι περιορισμοί της χρήσης ενζύμων στη βιομηχανία.

Αρχικά, από τη διεργασία της ΕΥΕ δεν παραλαμβάνεται αποκλειστικά ένα υδατικό εκχύλισμα με τις διαλυτοποιημένες βιοδραστικές ενώσεις, αλλά παράγεται και ένα στερεό υπόλειμμα από την φυτική πρώτη ύλη σε μορφή ιλύος, το οποίο είναι επίσης

εμπλουτισμένο σε βιοδραστικές ενώσεις. Έτσι, η αξιοποίηση αυτού του στερεού υπολείμματος που περιέχει πολύτιμα συστατικά μπορεί να συντελέσει στην ευρύτερη εφαρμογή της EYE στη βιομηχανία, αλλά μπορεί και να καταστήσει τη διεργασία ως zero waste, δηλαδή με μηδενικά απόβλητα.

Ένα ακόμη πρόσκομμα στην εφαρμογή της EYE σε βιομηχανική κλίμακα αφορά στην απουσία δυνατότητας ανάκτησης των ενζύμων από το μίγμα της αντίδρασης, καθώς και στη δυσκολία επαναχρησιμοποίησής τους. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να επιλυθεί μέσω της στρατηγικής της ακινητοποίησης των ενζύμων. Αυτή η μέθοδος όχι μόνο επιτρέπει την ανακύκλωση των ενζύμων, αλλά βελτιώνει επίσης τις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου αναφορικά με το μεγαλύτερο αποδεκτό εύρος τιμών pH, τη θερμική σταθερότητα και την ανοχή έναντι οργανικών διαλυτών. Δεδομένου ότι η επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου είναι ένα βασικό πλεονέκτημα που προωθείται από την ακινητοποίηση, οι σχετικές ερευνητικές μελέτες είναι επιβεβλημένες. Επίσης, η ακινητοποίηση καθιστά δυνατές τις πολλαπλές χρήσεις των ακριβών ενζύμων συμβάλλοντας έτσι σε μια οικονομικά εφικτή βιομηχανική χρήση της EYE.

Έχει συντεθεί ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων υλικών (όπως αλούμινα, πυρίτιο, ζεόλιθοι και μεσοπορώδες πυρίτιο), τα οποία χρησιμοποιούνται ως μήτρες νανοσωματιδίων για την ακινητοποίηση των ενζύμων. Διάφορα συνθετικά πολυμερικά υλικά μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ευέλικτοι φορείς λόγω των καλών μηχανικών ιδιοτήτων τους και της θερμικής σταθερότητάς τους. Ωστόσο, τα νανοσωματίδια είναι δύσκολο να αφαιρεθούν από το διάλυμα της αντίδρασης. Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, οι ερευνητές έχουν διερευνήσει τη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων που θα μπορούσαν εύκολα να ανακτηθούν και να διαχωριστούν με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) θεωρούνται πιθανοί φορείς ακινητοποίησης ενζύμων λόγω των πολλών χρήσιμων ιδιοτήτων τους, όπως η βιοαποδομησιμότητα, η βιοσυμβατότητα, η χαμηλή τοξικότητα, το χαμηλό κόστος, η μεγάλη ειδική επιφάνεια και η δυνατότητα επιλεκτικού διαχωρισμού των ακινητοποιημένων ενζύμων από το μείγμα αντίδρασης.

Άλλη μια λύση που αξίζει να διερευνηθεί στα πλαίσια του scale-up της EYE είναι η παραλαβή των ενζύμων ως παραπροϊόντα βιοδιωλιστηρίων, γεγονός που μπορεί να μειώσει το κόστος παραγωγής των ενζύμων και ακολούθως το κόστος προμήθειάς τους.

Ένα ακόμη πολλά υποσχόμενο εργαλείο, είναι ο τομέας της πρωτεϊνικής μηχανικής και της γενετικής μηχανικής, ο οποίος μπορεί να αξιοποιηθεί για την προσαρμογή των ενζύμων ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή τους ή ανάλογα με τη βιοδραστική ένωση που πρόκειται να εκχυλιστεί. Για παράδειγμα, μια ρηζικέλευθη λύση θα μπορούσε να είναι η άμεση έκφραση του ενζύμου στην ίδια τη φυτική μήτρα, η οποία θα μείωνε το κόστος που συνεπάγεται η προμήθεια ενζύμων. Βέβαια, υπάρχει ακόμη τεράστιο περιθώριο για μελλοντική έρευνα στον τομέα αυτό.

Από όλα τα παραπάνω καθίσταται αναγκαία η εκπόνηση μίας τεχνικοοικονομικής μελέτης ώστε να διερευνηθεί η εφικτότητα και η βιωσιμότητα της εφαρμογής της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπλέον, προτείνεται η μελέτη επίδρασης της ανάδευσης στην περίπτωση των

υψηλών αναλογιών στερεού-υγρού (high solid) με στόχο τη βελτιστοποίηση του ρυθμού ανάδευσης, καθώς οι υψηλοί ρυθμοί ανάδευσης οδηγούν σε μεγαλύτερη κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας, η οποία συνεπάγεται αύξηση του λειτουργικού κόστους.

Συμπληρωματικά, μια πρόταση για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να είναι η σύζευξη της ΕΥΕ με κάποια άλλη πράσινη τεχνική εκχύλισης, όπως η υποβοηθούμενη εκχύλιση από μικροκύματα ή υπερήχους, ή εναλλακτικά η χρήση πράσινων διαλυτών, όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και τα ιοντικά υγρά, προκειμένου να περιοριστεί το κόστος της ΕΥΕ, να αυξηθεί η απόδοση της διεργασίας και να μειωθούν οι απαιτούμενοι χρόνοι εκχύλισης. Ωστόσο, πρέπει να επιλεγθούν προσεκτικά οι λειτουργικές παράμετροι έτσι ώστε να ικανοποιούνται όσο το δυνατόν περισσότερο οι βέλτιστες συνθήκες που απαιτεί κάθε επιμέρους τεχνική.

Δεδομένου ότι η υποβοηθούμενη από ένζυμα εκχύλιση βασίζεται στην σε βάθος κατανόηση της βιοχημείας και της μορφολογίας του φυτικού υλικού, καθώς και στην κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της εκχυλιζόμενης βιοδραστικής ένωσης, προτείνεται η παρατήρηση της ενζυμικής υδρόλυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Έτσι θα διαπιστωθεί ποιο είδος ενζύμου ή ποιο ενζυμικό μίγμα είναι καταλληλότερο ώστε να αποικοδομήσει αποτελεσματικότερα τα κυτταρικά τοιχώματα της πρώτης ύλης.

Επιπροσθέτως, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η ανάλυση σύστασης και να εξεταστεί η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση πολυάριθμων δειγμάτων περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.* συλλεγμένων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και σε διαφορετικές περιόδους συγκομιδής, με στόχο να προσδιοριστεί η περιοχή με τις βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες και η καταλληλότερη περίοδος συγκομιδής για τη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, καθώς και σε άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Ακόμη, θα μπορούσαν να μελετηθούν δείγματα που έχουν υποστεί διαφορετική προεπεξεργασία, για παράδειγμα ξήρανση σε ηπιότερες συνθήκες, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ποσοτικά το περιεχόμενο της πρώτης ύλης και σε άλλες θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ενώσεις, όπως η βιταμίνη C, της οποίας η περιεκτικότητα στον καρπό της *R. canina L.* είναι αποδεδειγμένα πολύ υψηλή.

Ενδιαφέρουσα θα ήταν επίσης η εφαρμογή ενός άλλου πειραματικού σχεδιασμού, πέραν δηλαδή του περιγεγραμμένου κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCC), αλλά και να μελετηθούν μεγαλύτερα εύρη χρόνου εκχύλισης, αναλογίας στερεού-υγρού και ενζυμικού φορτίου, έτσι ώστε να προσδιοριστούν καλύτερα οι μέγιστες τιμές απόδοσης TPC και TFC, αλλά και η ελάχιστη τιμή IC₅₀ που υποδηλώνει τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση.

Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, καθώς και να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους πέραν της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να συγκριθούν με αυτά που προέκυψαν από τις μεθόδους προσδιορισμού που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία (μέθοδος χλωριούχου αργιλίου, μέθοδος Folin Ciocalteu) και να επαληθευτούν.

Θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν μελέτες κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων *R. canina L.* σε υγιή κύτταρα, ώστε να προσδιοριστούν τα όρια των συγκεντρώσεων εντός των οποίων το εκχύλισμα δύναται να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια ως συστατικό σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα. Παράλληλα, θα μπορούσε να διεξαχθεί μελέτη κυτταροτοξικότητας και σε μη υγιή κύτταρα με στόχο να επαληθευτούν οι φαρμακολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων.

Τέλος, θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα η παρασκευή νανοσωματιδίων με εγκλεισμό του εκχυλίσματος και στη συνέχεια η ενσωμάτωσή τους σε κάποια φαρμακοτεχνική μορφή, όπως για παράδειγμα σε ενυδατική κρέμα.

Βιβλιογραφία

- [1] Σ. Χαμηλάκης, *ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ: Φαρμακευτική χρήση – Καθημερινή ζωή Αλκαλοειδή – Γλυκοζίτες – Αμινοξέα – Τερπένια – Στεροειδή – Ορμόνες*. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2022. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/11419/8142>
- [2] C. B. Aware *et al.*, “Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development,” *South African J. Bot.*, 2022.
- [3] Markets and Markets, “Plant Extracts Market by Type (Phytomedicines & Herbal Extracts, Spices, Essential Oils, Flavors & fragrances), Application (Pharmaceutical & Dietary Supplements, Food & beverages, cosmetics), Sources, and Region - Forecast to 2026,” 2021. [Online]. Available: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-extracts-market-942.html>
- [4] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis, and others, “Natural products (secondary metabolites),” in *Biochemistry and molecular biology of plants*, vol. 24, American Society of Plant Physiologists Rockville, MD, 2000, pp. 1250–1319.
- [5] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,” *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- [6] N. Kumar and N. Goel, “Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications,” *Biotechnology Reports*, vol. 24. 2019. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
- [7] D. M. Pereira, P. Valentão, J. A. Pereira, and P. B. Andrade, “Phenolics: From chemistry to biology,” *Molecules*, vol. 14, no. 6. Molecular Diversity Preservation International, pp. 2202–2211, 2009.
- [8] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, “Flavonoids: an overview,” *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, 2016.
- [9] K. T. Chung, T. Y. Wong, C. I. Wei, Y. W. Huang, and Y. Lin, “Tannins and human health: A review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, no. 6, 1998, doi: 10.1080/10408699891274273.
- [10] M. Fraga-Corral *et al.*, “By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins’ biological activities and their potential for valorization,” *Foods*, vol. 10, no. 1. 2021. doi: 10.3390/foods10010137.
- [11] S. M. Setena and N. M. Shah, “The chemistry of coumarins,” *Chem. Rev.*, vol. 36, no. 1, 1945, doi: 10.1021/cr60113a001.
- [12] A. V. Rao and L. G. Rao, “Carotenoids and human health,” *Pharmacological Research*, vol. 55, no. 3. 2007. doi: 10.1016/j.phrs.2007.01.012.
- [13] Y. Wang, Y. Zhao, X. Liu, J. Li, J. Zhang, and D. Liu, “Chemical constituents and pharmacological activities of medicinal plants from Rosa genus,” *Chinese Herb. Med.*, 2022.
- [14] H. Nybom and G. Werlemark, “Realizing the Potential of Health-Promoting Rosehips from Dogroses (*Rosa sect. Caninae*),” *Curr. Bioact. Compd.*, vol. 13, no. 1, 2016, doi: 10.2174/1573407212666160607090635.
- [15] M. Tabaszewska and D. Najgebauer-Lejko, “The content of selected phytochemicals and in vitro antioxidant properties of rose hip (*Rosa canina* L.) tinctures,” *NFS J.*, vol. 21, 2020, doi: 10.1016/j.nfs.2020.09.003.
- [16] E. Maloupa *et al.*, “Molecular Authentication, Phytochemical evaluation and asexual propagation of wild-growing *Rosa canina* L.(Rosaceae) genotypes of

- Northern Greece for sustainable exploitation,” *Plants*, vol. 10, no. 12, p. 2634, 2021.
- [17] A. Bhave, V. Schulzova, H. Chmelarova, L. Mrnka, and J. Hajslova, “Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 25, no. 3, 2017, doi: 10.1016/j.jfda.2016.12.019.
- [18] G. Fascella *et al.*, “Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora,” *Food Chem.*, vol. 289, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.127.
- [19] K. Winther, J. Campbell-Tofte, and A. S. Vinther Hansen, “Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies,” *Bot. Targets Ther.*, 2016, doi: 10.2147/btat.s91385.
- [20] S. Jiménez, N. Jiménez-Moreno, A. Luquin, M. Laguna, M. J. Rodríguez-Yoldi, and C. Ancín-Azpilicueta, “Chemical composition of rosehips from different *Rosa* species: an alternative source of antioxidants for the food industry,” *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 34, no. 7, 2017, doi: 10.1080/19440049.2017.1319071.
- [21] J. Gruenwald, R. Uebelhack, and M. I. Moré, “*Rosa canina* – Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanics counteracting osteoarthritis – A systematic review,” *Phytomedicine*, vol. 60, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.152958.
- [22] Z. Ayati, M. S. Amiri, M. Ramezani, E. Delshad, A. Sahebkar, and S. A. Emami, “Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 24, no. 35, 2018, doi: 10.2174/1381612824666181010151849.
- [23] S. Patel, “Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 63, 2017. doi: 10.1016/j.tifs.2017.03.001.
- [24] W. Johnson *et al.*, “Safety Assessment of *Rosa canina*-derived Ingredients as Used in Cosmetics,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 41, no. 1_suppl, 2022, doi: 10.1177/10915818221080088.
- [25] E. Kerasioti *et al.*, “Polyphenolic composition of *rosa canina*, *rosa sempervivens* and *pyrocantha coccinea* extracts and assessment of their antioxidant activity in human endothelial cells,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 4, 2019, doi: 10.3390/antiox8040092.
- [26] Z. İlbay, S. Şahin, and İsmail Kırbaşlar, “Investigation of polyhenolic content of rose hip (*Rosa canina* l.) tea extracts: A comparative study,” *Foods*, vol. 2, no. 1, 2013, doi: 10.3390/foods2010043.
- [27] I. Mármol, C. Sánchez-De-Diego, N. Jiménez-Moreno, C. Ancín-Azpilicueta, and M. Rodríguez-Yoldi, “Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 6, 2017. doi: 10.3390/ijms18061137.
- [28] K. Winther, L. Warholm, J. Campbell-Tofte, and K. Marstrand, “Effect of *Rosa canina* L.(Rose-hip) on cold during winter season in a middle-class population: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial,” *J. Herb. Med.*, vol. 13, pp. 34–41, 2018.
- [29] W. Peschel *et al.*, “An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes,” *Food Chem.*, vol. 97, no. 1, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.033.

- [30] X. Gao, L. Bjork, V. Trajkovski, and M. Ugglá, "Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 80, no. 14, 2000, doi: 10.1002/1097-0010(200011)80:14<2021::AID-JSFA745>3.0.CO;2-2.
- [31] D. A. Daels-Rakotoarison *et al.*, "Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst," *Phyther. Res.*, vol. 16, no. 2, 2002, doi: 10.1002/ptr.985.
- [32] F. Lattanzio, E. Greco, D. Carretta, R. Cervellati, P. Govoni, and E. Speroni, "In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, no. 1, 2011, doi: 10.1016/j.jep.2011.07.006.
- [33] J. Concha, C. Soto, R. Chamy, and M. E. Zúñiga, "Enzymatic pretreatment on rose-hip oil extraction: Hydrolysis and pressing conditions," *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 81, no. 6, 2004, doi: 10.1007/s11746-006-0939-y.
- [34] W. L. McCabe, J. C. Smith, and P. Harriott, *Unit operations of chemical engineering*, vol. 5. McGraw-hill New York, 1993.
- [35] R. F. da Silva *et al.*, "Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review," *Microchemical Journal*, vol. 175, 2022. doi: 10.1016/j.microc.2022.107184.
- [36] A. K. Jha and N. Sit, "Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 119, 2022. doi: 10.1016/j.tifs.2021.11.019.
- [37] M. Puri, D. Sharma, and C. J. Barrow, "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants," *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 1, 2012. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014.
- [38] C. I. L. Justino, K. Duarte, A. C. Freitas, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, "Classical methodologies for preparation of extracts and fractions," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 65, 2014. doi: 10.1016/B978-0-444-63359-0.00003-3.
- [39] S. J. Marathe, S. B. Jadhav, S. B. Bankar, and R. S. Singhal, "Enzyme-assisted extraction of bioactives," in *Food bioactives*, Springer, 2017, pp. 171–201.
- [40] S. Chanioti, G. Liadakis, and C. Tzia, *Solid-liquid extraction*, vol. 2. CRC Press Boca Raton, FL, USA, 2014.
- [41] D. R. Joshi and N. Adhikari, "An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity," *J. Pharm. Res. Int.*, 2019, doi: 10.9734/jpri/2019/v28i330203.
- [42] F. Chemat, M. A. Vian, and G. Cravotto, "Green extraction of natural products: Concept and principles," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 7, 2012, doi: 10.3390/ijms13078615.
- [43] X. Cheng, L. Bi, Z. Zhao, and Y. Chen, "Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products," 2015. doi: 10.2991/ic3me-15.2015.72.
- [44] S. Das, S. S. Nadar, and V. K. Rathod, "Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 191, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.060.
- [45] P. D. Patil, S. P. Patil, R. K. Kelkar, N. P. Patil, P. V. Pise, and S. S. Nadar, "Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: An integral approach to extract bioactive compounds," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 116, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.07.032.
- [46] B. A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Urbe, and S. O. Serna-Saldívar, "Bound phenolics in foods, a review," *Food Chemistry*, vol. 152, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093.

- [47] M. P. Casas and H. D. González, “Enzyme-assisted aqueous extraction processes,” in *Water extraction of bioactive compounds*, Elsevier, 2017, pp. 333–368.
- [48] S. S. Nadar, P. Rao, and V. K. Rathod, “Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review,” *Food Research International*, vol. 108. 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.03.006.
- [49] P. Streimikyte, P. Viskelis, and J. Viskelis, “Enzymes-Assisted Extraction of Plants for Sustainable and Functional Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 4, p. 2359, 2022.
- [50] O. Gligor, A. Mocan, C. Moldovan, M. Locatelli, G. Crişan, and I. C. F. R. Ferreira, “Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 88. 2019. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.029.
- [51] F. Chemat and M. A. Vian, *Alternative solvents for natural products extraction*, vol. 381. Springer, 2014.
- [52] B. Alberts *et al.*, *Essential cell biology*. Garland Science, 2015.
- [53] C. Loix, M. Huybrechts, J. Vangronsveld, M. Gielen, E. Keunen, and A. Cuypers, “Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 8. 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.01867.
- [54] Ε. Τόπακας and Π. Χριστακόπουλος, *Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*, 2015. [Online]. Available: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/1721>
- [55] M. Giovannoni, G. Gramegna, M. Benedetti, and B. Mattei, “Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8. 2020. doi: 10.3389/fbioe.2020.00356.
- [56] M. L. Shuler and F. Kargi, “Bioprocess Engineering Basic Concepts Second Edition,” *Adv. Chem. Eng.*, 1991.
- [57] Y. H. P. Zhang and L. R. Lynd, “A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 5, 2006, doi: 10.1002/bit.20906.
- [58] R. Tokin, J. Ø. Ipsen, P. Westh, and K. S. Johansen, “The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 42, no. 10, 2020, doi: 10.1007/s10529-020-02922-0.
- [59] K. Hosni *et al.*, “Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 47, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.03.023.
- [60] C. Soto-Maldonado and M. E. Zúñiga-Hansen, “Enzyme-assisted extraction of phenolic compounds,” in *Water extraction of bioactive compounds*, Elsevier, 2017, pp. 369–384.
- [61] J. Hu, V. Arantes, and J. N. Saddler, “The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect?,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 4, 2011, doi: 10.1186/1754-6834-4-36.
- [62] B. B. Li, B. Smith, and M. M. Hossain, “Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 48, no. 2, pp. 182–188, 2006.

- [63] M. Mushtaq, B. Sultana, H. N. Bhatti, and M. Asgher, "Optimization of enzyme-assisted revalorization of sweet lime (citrus limetta risso) peel into phenolic antioxidants," *BioResources*, vol. 9, no. 4. 2014. doi: 10.15376/biores.9.4.6153-6165.
- [64] M. Mushtaq, B. Sultana, F. Anwar, A. Adnan, and S. S. H. Rizvi, "Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 104, 2015, doi: 10.1016/j.supflu.2015.05.020.
- [65] I. F. Strati, E. Gogou, and V. Oreopoulou, "Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste," *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, 2015, doi: 10.1016/j.fbp.2014.09.012.
- [66] A. Boulila *et al.*, "Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 74, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.050.
- [67] S. Chen, X. H. Xing, J. J. Huang, and M. S. Xu, "Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 48, no. 1, 2011, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.017.
- [68] H. B. Sowbhagya and V. N. Chitra, "Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no. 2, 2010, doi: 10.1080/10408390802248775.
- [69] F. Ribeiro, "Novozymes Cellic®CTec3 HS—Secure Your Plant's Lowest Cost," *Novozymes A/S Bagsværd, Denmark*, 2017.
- [70] AOAC, "Official methods of analysis of the association of official analytical chemists," *Anal. Chim. Acta*, vol. 242, 1991, doi: 10.1016/0003-2670(91)87088-o.
- [71] A. Sluiter *et al.*, "NREL/TP-510-42618 - Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass," 2012.
- [72] J. M. Lawther, R. Sun, and W. B. Banks, "Extraction, Fractionation, and Characterization of Structural Polysaccharides from Wheat Straw," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, no. 3, 1995, doi: 10.1021/jf00051a021.
- [73] L. PHATAK, K. C. CHANG, and G. BROWN, "Isolation and Characterization of Pectin in Sugar-Beet Pulp," *J. Food Sci.*, vol. 53, no. 3, 1988, doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb08964.x.
- [74] G. Aravantinos-Zafiris, V. Oreopoulou, C. Tzia, and C. D. Thomopoulos, "Fibre fraction from orange peel residues after pectin extraction," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 27, no. 5, 1994, doi: 10.1006/fstl.1994.1094.
- [75] Ν. Πετρίδης, "Ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης και μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων σε υδατικά δείγματα," Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2016.
- [76] U. S. D. of Commerce, "Central Composite Designs (CCD)," 2013. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>
- [77] U. S. D. of Commerce, "Comparisons of response surface designs," 2013. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3363.htm>
- [78] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 299, 1999, doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- [79] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination

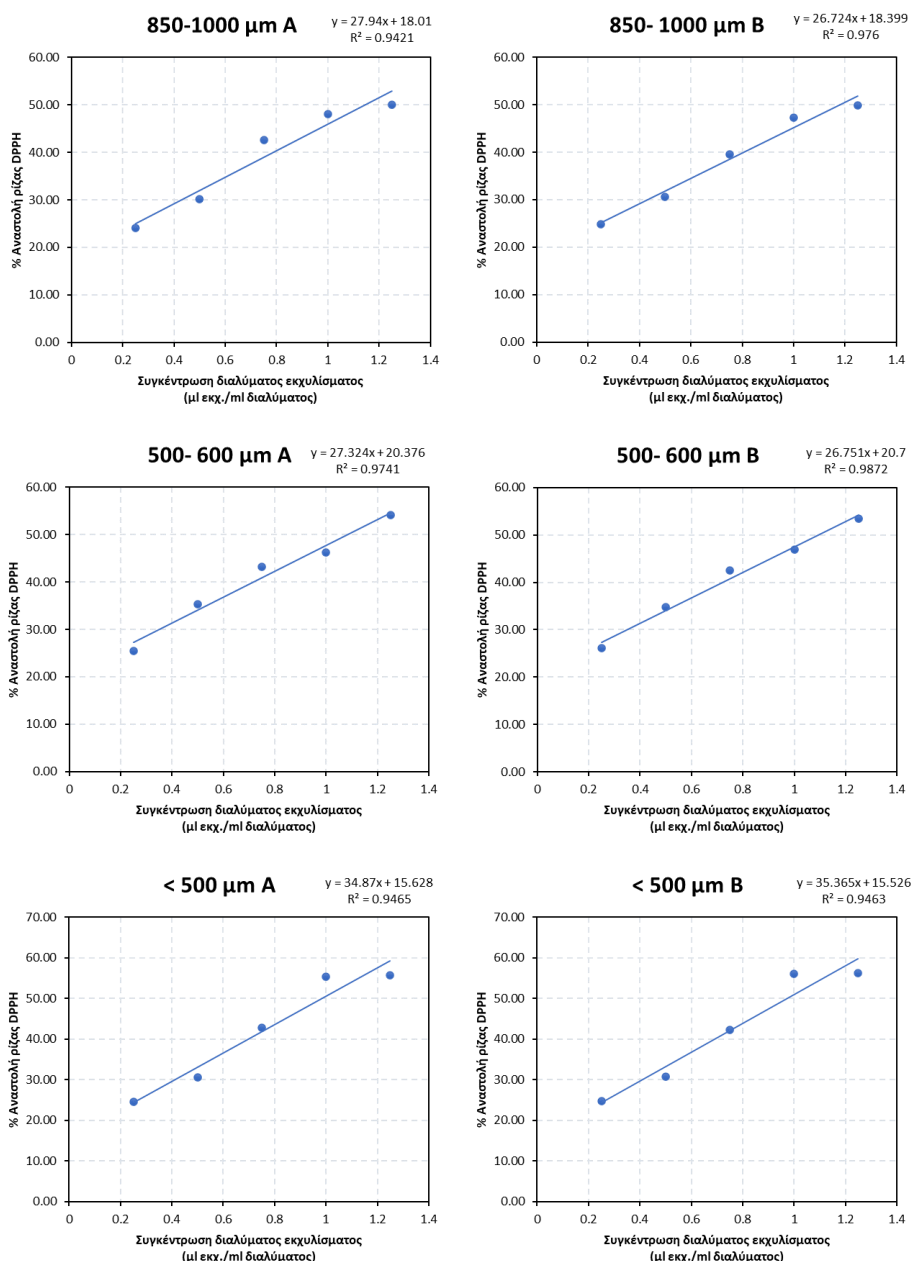
- of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10. 2005. doi: 10.1021/jf0502698.
- [80] Y. Martono, F. F. Yanuarsih, N. R. Aminu, and J. Muninggar, “Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves,” in *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, vol. 1307, no. 1. doi: 10.1088/1742-6596/1307/1/012014.
- [81] L. Ford, K. Theodoridou, G. N. Sheldrake, and P. J. Walsh, “A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds,” *Phytochemical Analysis*, vol. 30, no. 6. 2019. doi: 10.1002/pca.2851.
- [82] G. A. Agbor, J. A. Vinson, and P. E. Donnelly, “Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay Description of Folin Ciocalteu Reagent,” *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet. Int J Food Sci Nutr Diet. Int. J. Food Sci. Nutr. Diet. Int J Food Sci Nutr Diet*, vol. 3, no. 38, 2014.
- [83] A. Tzani *et al.*, “Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe),” *Sustain. Chem.*, vol. 2, no. 4, 2021, doi: 10.3390/suschem2040032.
- [84] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, and Y. M. Hijji, “Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation,” *LWT*, vol. 150, 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932.
- [85] A. Pękal and K. Pyrzynska, “Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay,” *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, 2014, doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.
- [86] C. P. Anokwuru, G. N. Anyasor, A. O., F. O., and O. P., “Effect of Extraction Solvents on Phenolic, Flavonoid and Antioxidant activities of Three Nigerian Medicinal Plants,” *Nat. Sci.*, vol. 9, no. 7, 2011.
- [87] A. M. Pisoschi and G. P. Negulescu, “Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review,” *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 01, no. 01, 2012, doi: 10.4172/2161-1009.1000106.
- [88] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results,” *Food Chem.*, vol. 130, no. 4, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
- [89] S. B. Kedare and R. P. Singh, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no. 4. 2011. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [90] Δ. Τσιμογιάννης, “Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων,” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), 2008.
- [91] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1. 1995. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- [92] M. Akin and N. Saki, “Antimicrobial, DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* and *Rosa damascena* mill. ethanol extracts by using TLC bioautography and chemical screening methods,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 42, no. 7–8, 2019, doi: 10.1080/10826076.2019.1591977.
- [93] M. Ognyanov *et al.*, “Influence of Gamma Irradiation on Different Phytochemical Constituents of Dried Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits,” *Molecules*, vol. 27, no. 6, 2022, doi: 10.3390/molecules27061765.

- [94] M. H. Ognyanov, M. M. Hodzhova, N. T. Petkova, P. N. Denev, Y. N. Georgiev, and M. G. Kratchanova, "Isolation and characterization of plant cell wall material from rose hip fruits," *Bulg. Chem. Commun.*, vol. 50, no. 4, 2018.
- [95] C. Fan, C. Pacier, and D. M. Martirosyan, "Rose hip (*Rosa canina* L): A functional food perspective," *Functional Foods in Health and Disease*, vol. 4, no. 12. 2014. doi: 10.31989/ffhd.v4i12.159.
- [96] S. Kizil, O. Toncer, and T. Sogut, "Mineral content and fatty acid compositions of wild and cultivated rose hip mineral contents and fatty acid compositions of wild and cultivated rose hip (*Rosa canina* L.)," *Fresenius Environ. Bull.*, vol. 27, no. 2, 2018.
- [97] F. Demir and M. Özcan, "Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey," *J. Food Eng.*, vol. 47, no. 4, 2001, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00129-1.
- [98] N. Cordoba, M. Fernandez-Alduenda, F. L. Moreno, and Y. Ruiz, "Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 96. 2020. doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.004.
- [99] J. B. Kristensen, C. Felby, and H. Jørgensen, "Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 2, 2009, doi: 10.1186/1754-6834-2-11.
- [100] A. A. Modenbach and S. E. Nokes, "Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review," *Biomass and Bioenergy*, vol. 56. 2013. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.05.031.
- [101] A. S. A. Da Silva, R. P. Espinheira, R. S. S. Teixeira, M. F. De Souza, V. Ferreira-Leitão, and E. P. S. Bon, "Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A critical review," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 13, no. 1. 2020. doi: 10.1186/s13068-020-01697-w.
- [102] G. Nikaen, S. Yousefinejad, S. Rahmdel, F. Samari, and S. Mahdavinia, "Central Composite Design for Optimizing the Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Plantago major* Extract and Investigating Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-66357-3.
- [103] S. O. Yilmaz and S. Ercisli, "Antibacterial and antioxidant activity of fruits of some rose species from Turkey," *Rom. Biotechnol. Lett.*, vol. 16, no. 4, 2011.
- [104] N. Montazeri, E. Baher, F. Mirzajani, Z. Barami, and S. Yousefian, "Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran," *J. Med. Plant Res.*, vol. 5, no. 18, 2011.
- [105] S. Sathiya, B. Karthikeyan, C. A. Jaleel, M. M. Azooz, and M. Iqbal, "Antibiogram of *Catharanthus roseus* Extracts," *Glob. J. Mol. Sci.*, vol. 3, no. 1, 2008.
- [106] K. Rovná, J. Petrová, M. Terentjeva, J. Černá, and M. Kačániová, "ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *ROSA CANINA* FLOWERS AGAINST SELECTED MICROORGANISMS," *J. Microbiol. Biotechnol. food Sci.*, vol. 4, no. special issue 1 (Microbiology), 2015, doi: 10.15414/jmbfs.2015.4.special1.62-64.
- [107] S. Tahmasebi and C. Ahmadzadeh, "Comparative study of antibacterial effects of polar, semi-polar, and nonpolar fractions of *Rosa canina* extract against some pathogenic bacteria," *J. Food Microbiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 82–91, 2020.
- [108] R. Nowak and U. Gawlik-Dziki, "Polyphenols of *Rosa* L. leaves extracts and

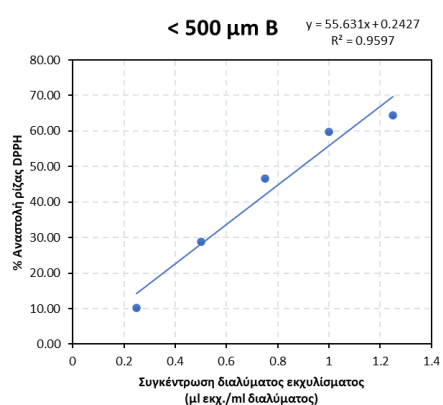
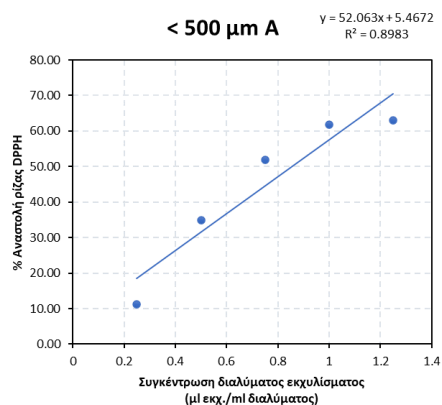
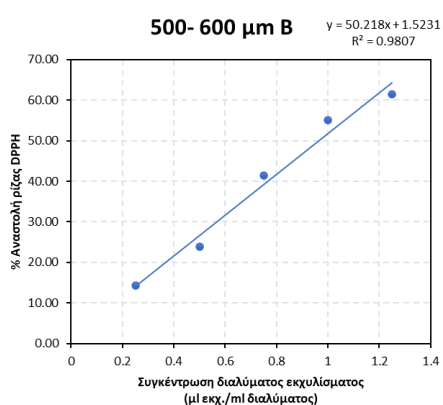
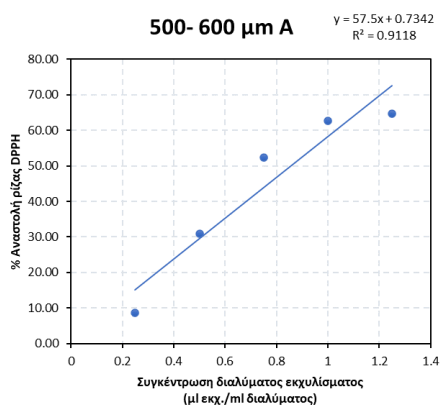
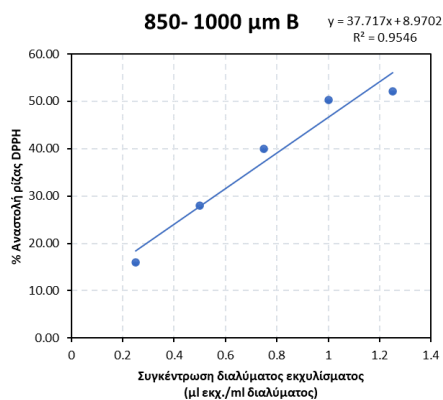
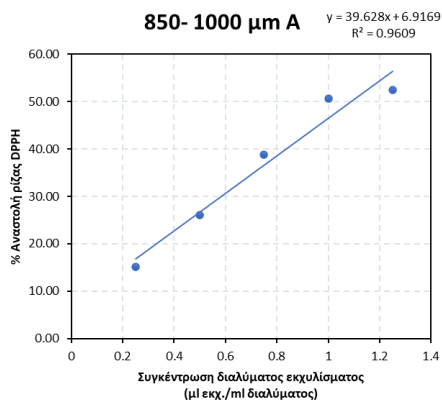
- their radical scavenging activity,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 62, no. 1–2, 2007, doi: 10.1515/znc-2007-1-206.
- [109] B. C. Aridoğan, H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Özbaşar, and E. Mumcu, “Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 25, no. 6, 2002, doi: 10.1007/bf02977005.
- [110] K. F. Nuriddinovich and N. D. Fazliddinovna, “Medicinal properties of rosa canina,” *Acad. An Int. Multidiscip. Res. J.*, vol. 12, no. 5, 2022, doi: 10.5958/2249-7137.2022.00456.6.
- [111] Y. Kumarasamy, P. J. Cox, M. Jaspars, M. A. Rashid, and S. D. Sarker, “Bioactive flavonoid glycosides from the seeds of Rosa canina,” *Pharm. Biol.*, vol. 41, no. 4, 2003, doi: 10.1076/phbi.41.4.237.15663.
- [112] R. P. Mishra, M. Arshad, and A. Sami, “Antibacterial properties of Rosa indica (L.) Stem, leaves, and flowers,” *J. Pharm. Biomed. Sci.*, vol. 12, no. 12, 2011.

Παράρτημα

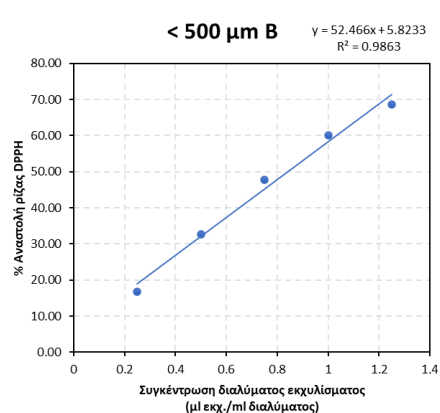
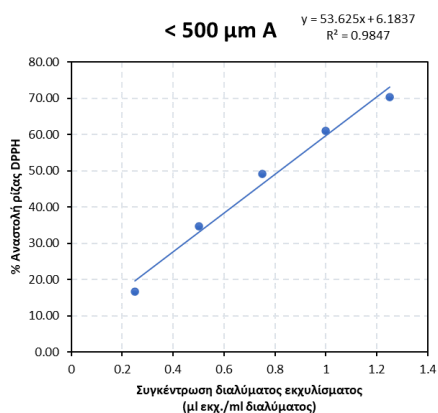
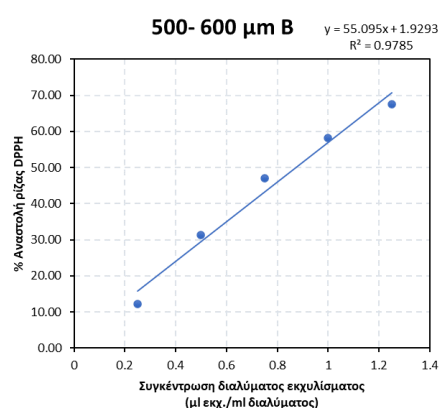
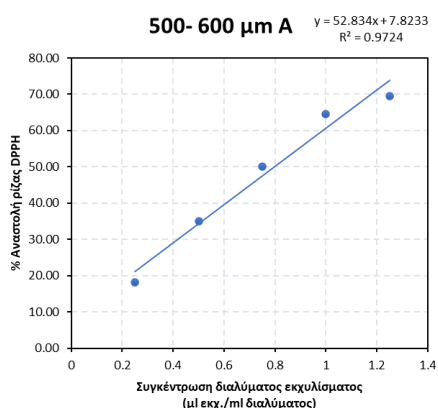
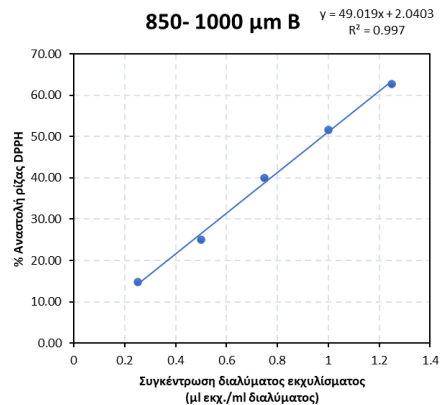
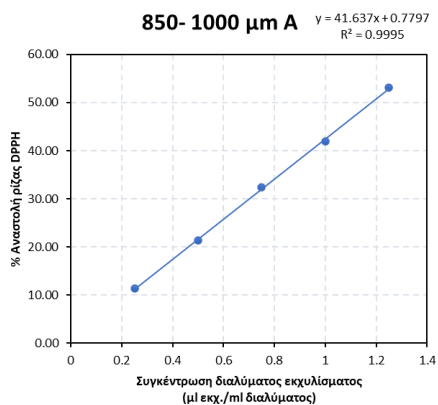
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναστολή της ρίζας του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για τα τρία διαφορετικά πειράματα: Μελέτη επίδρασης της κοκκομετρίας του στερεού (Διαγράμματα 1,2,3), Μελέτη επίδρασης αναλογίας στερεού – υγρού (Διαγράμματα 4,5,6), Μελέτη επίδρασης υψηλών αναλογιών στερεού - υγρού (Διαγράμματα 7,8) και Μελέτη επίδρασης ενζυμικού φορτίου (Διαγράμματα 9,10,11).



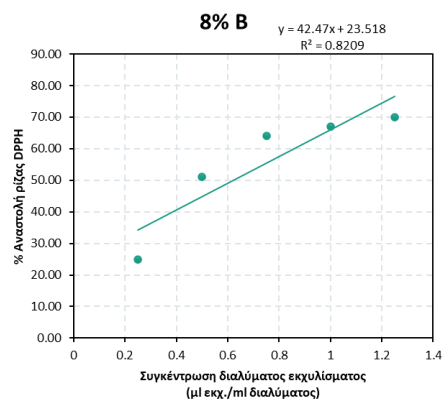
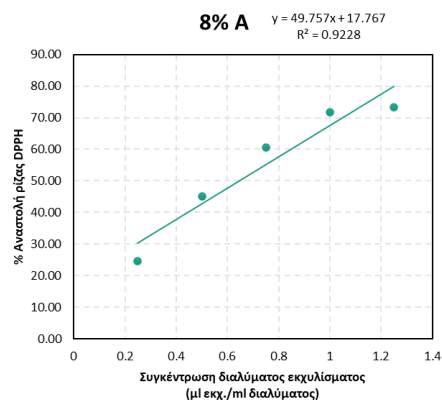
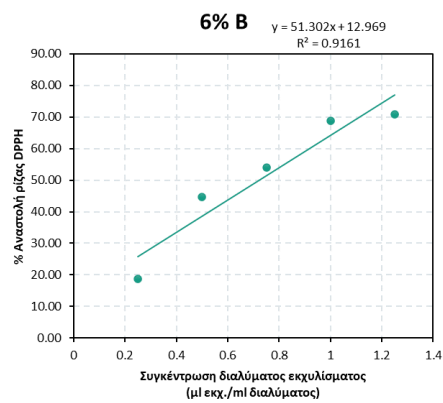
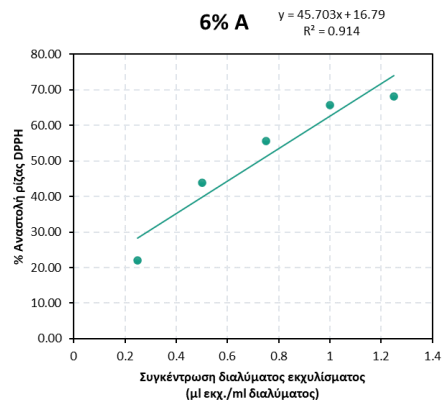
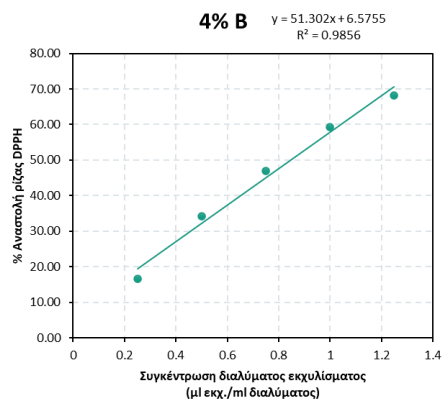
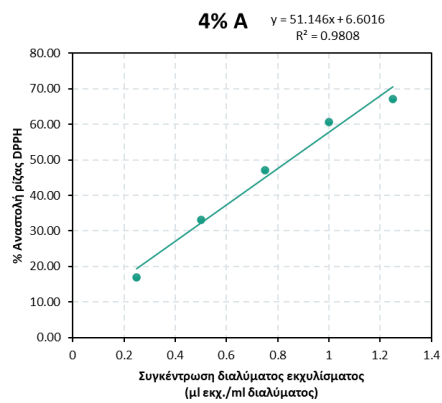
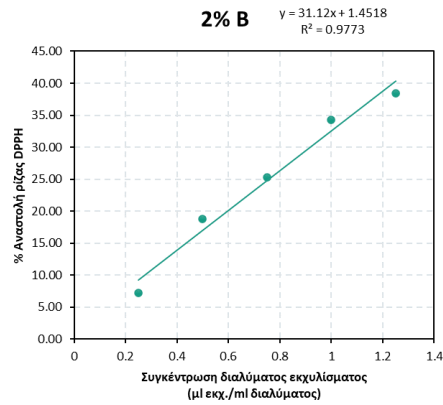
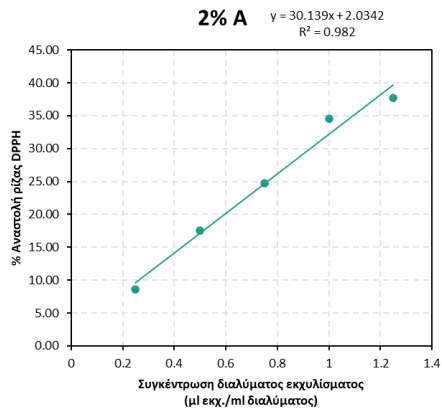
Διάγραμμα 1: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για τρία εύρη κοκκομετριών: 850μm-1mm, 500-600 μm και <500 μm, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* 3% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης και για χρόνο δειγματοληψίας t=2 h.



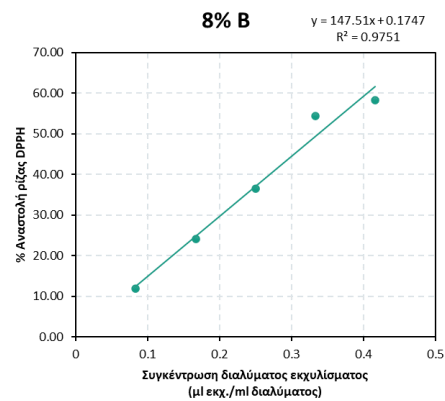
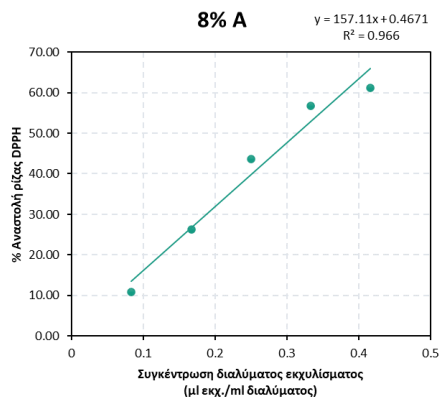
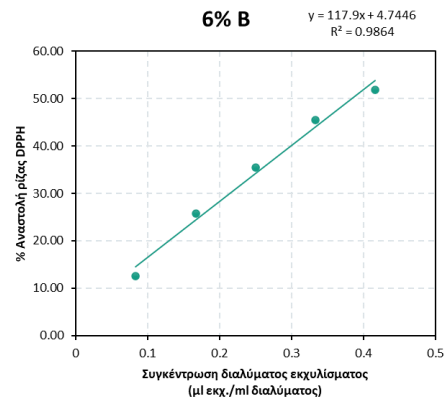
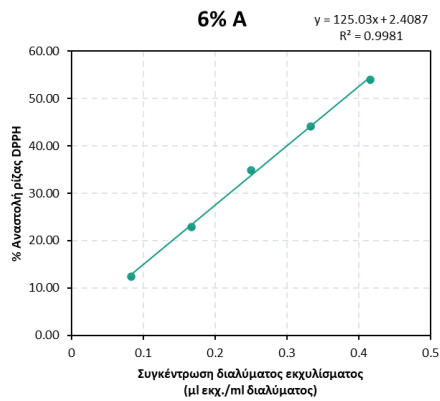
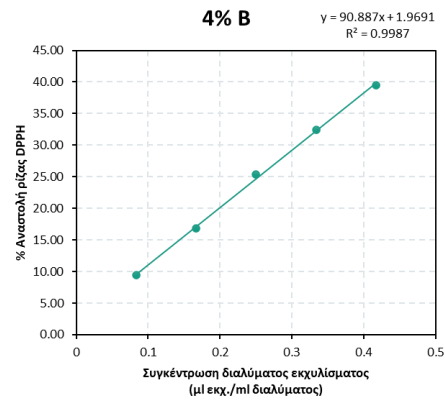
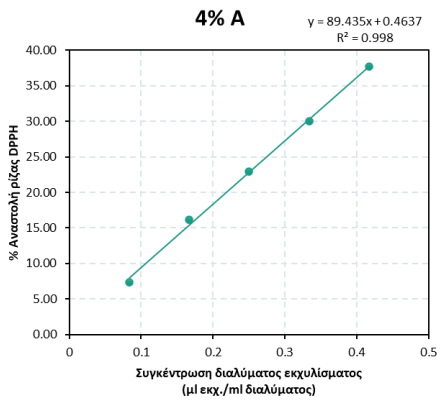
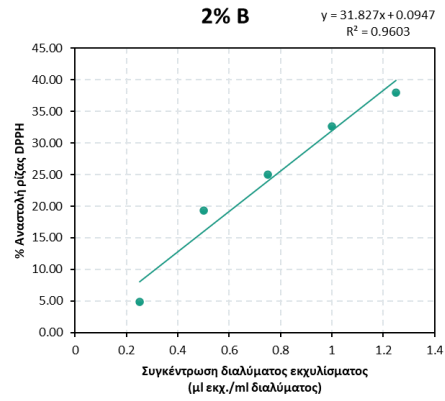
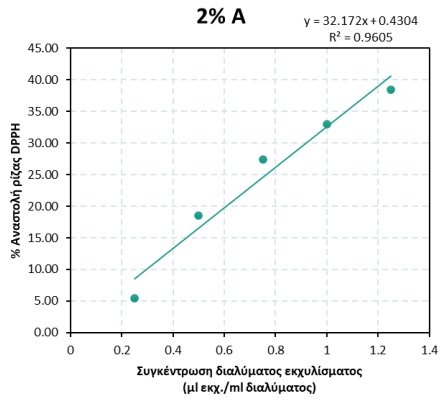
Διάγραμμα 2: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για τρία εύρη κοκκομετριών: 850μm-1mm, 500-600 μm και <500 μm, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* 3% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης και για χρόνο δειγματοληψίας t=6 h.



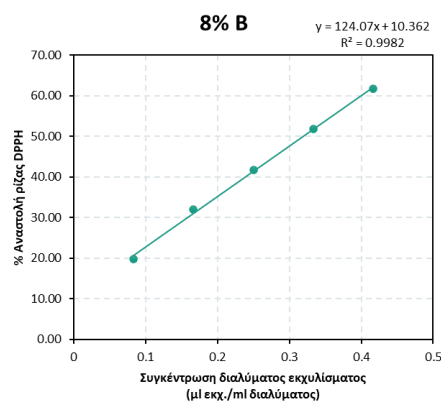
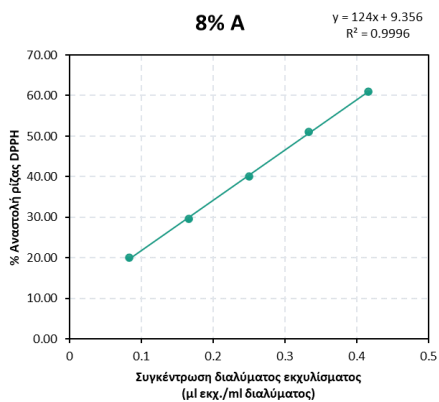
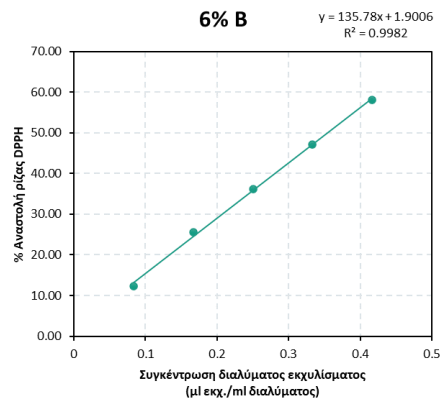
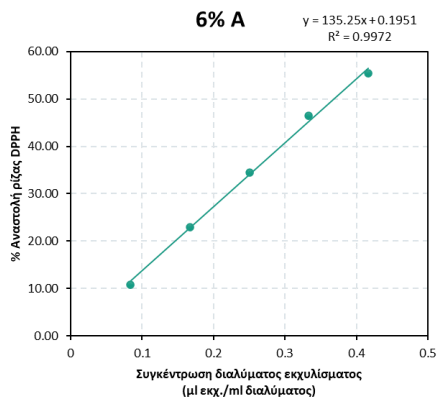
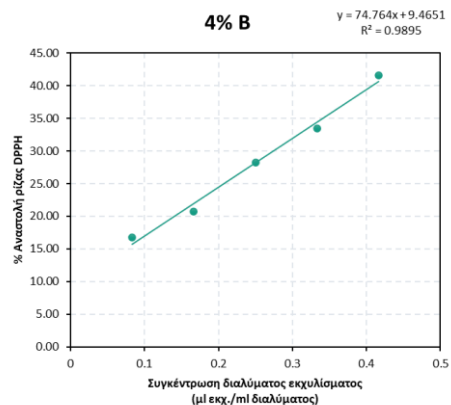
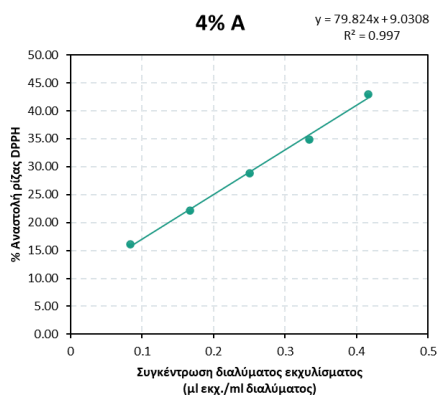
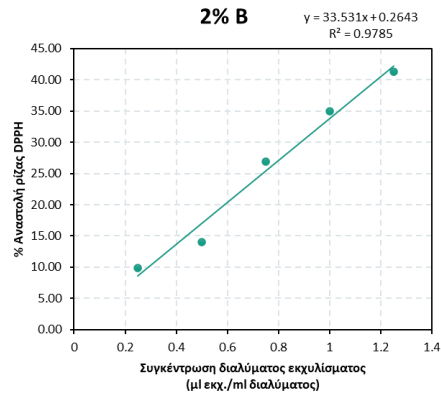
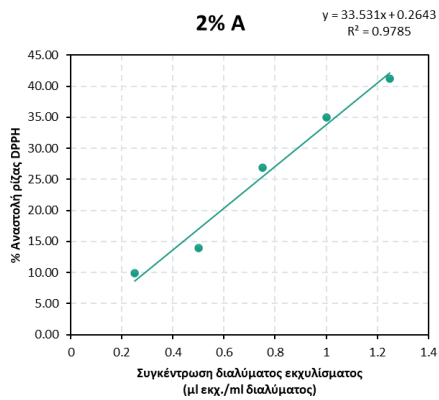
Διάγραμμα 3: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για τρία εύρη κοκκομετριών: 850μm-1mm, 500-600 μm και <500 μm, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* 3% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης και για χρόνο δειγματοληψίας t=48 h.



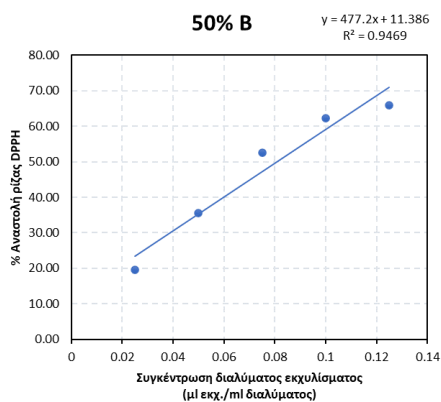
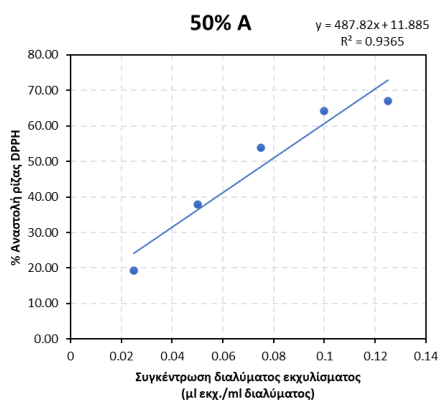
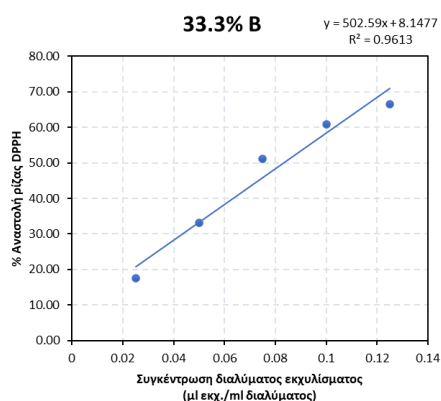
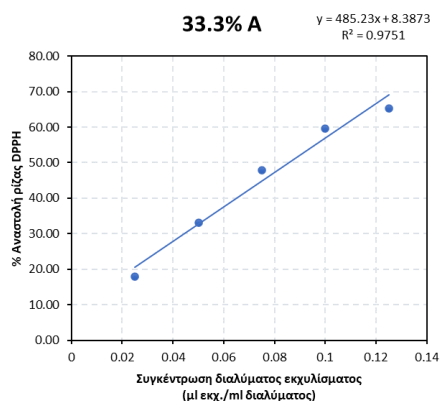
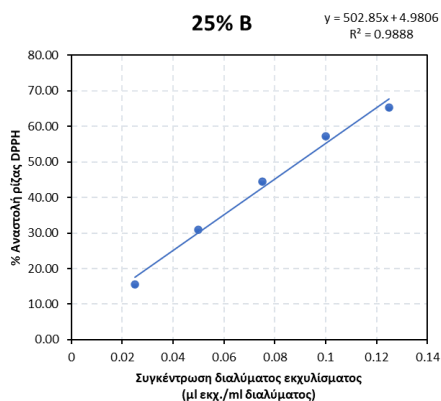
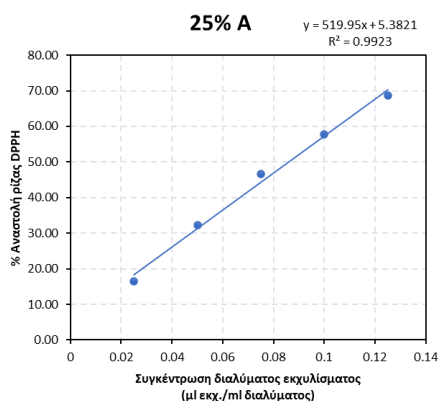
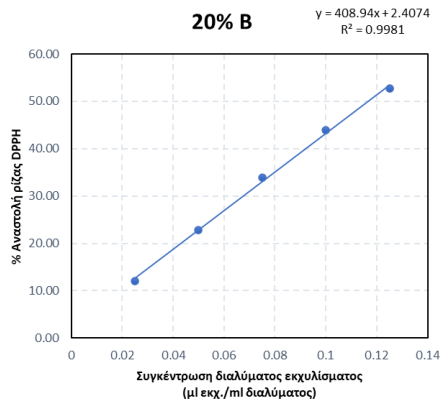
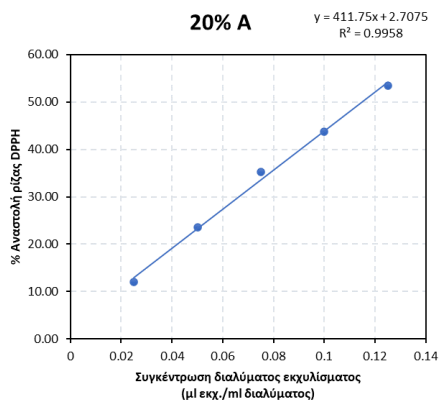
Διάγραμμα 4: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm: 2% β/ο, 4% β/ο, 6% β/ο και 8% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για χρόνο δειγματοληψίας t=2 h.



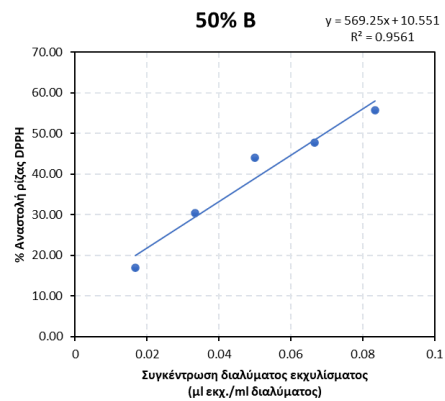
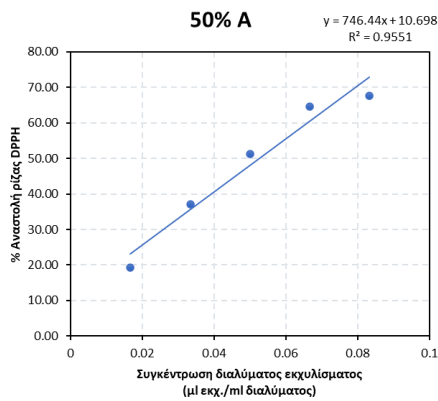
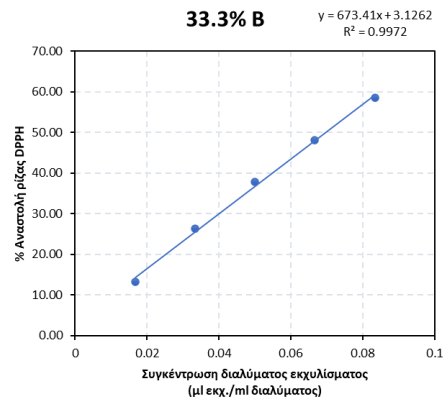
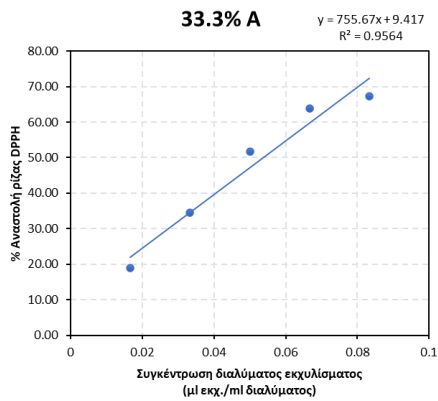
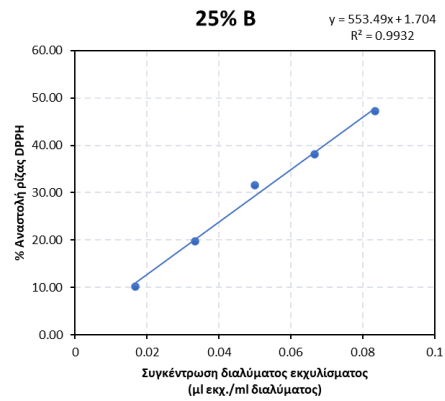
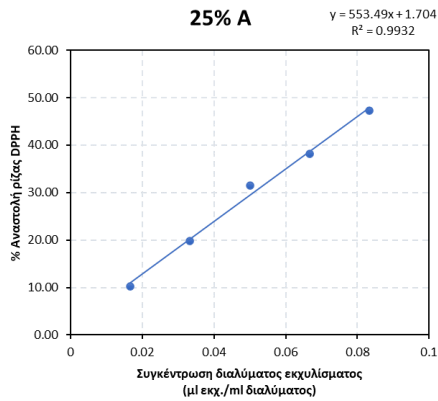
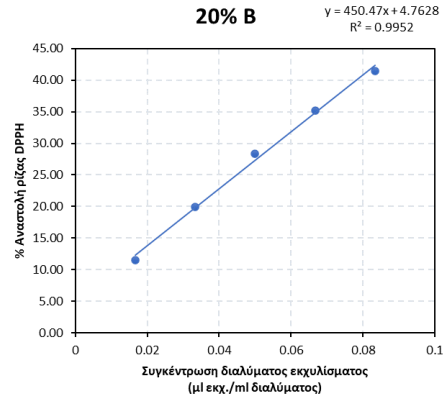
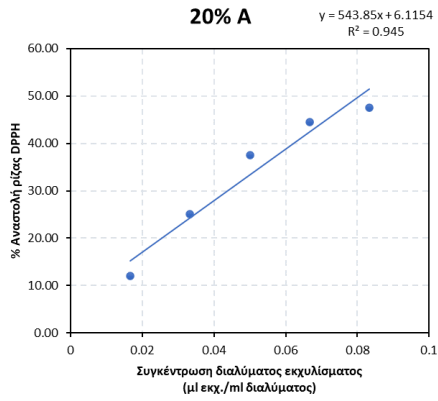
Διάγραμμα 5: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm: 2% β/ο, 4% β/ο, 6% β/ο και 8% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για χρόνο δειγματοληψίας t=6 h.



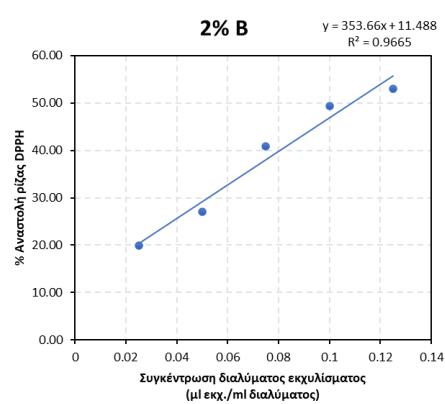
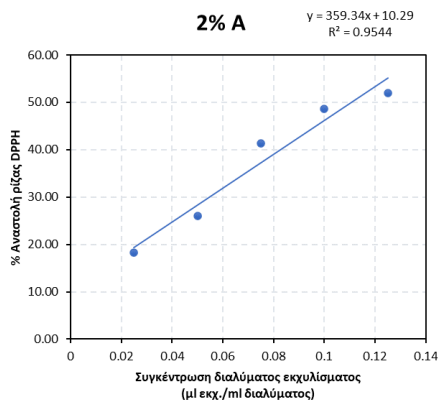
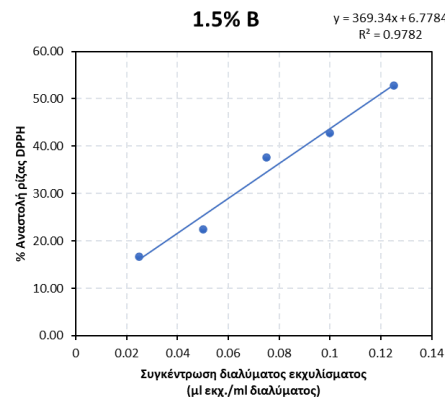
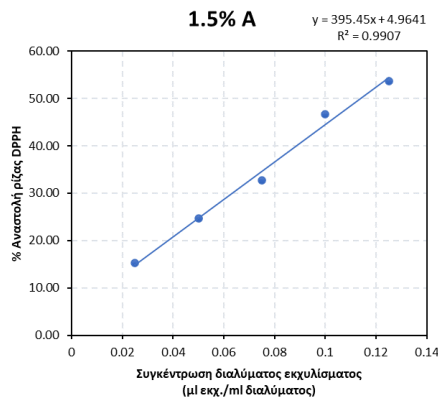
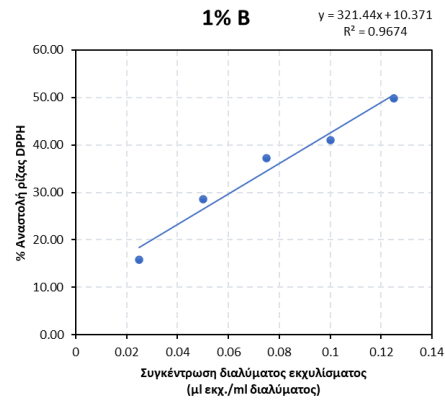
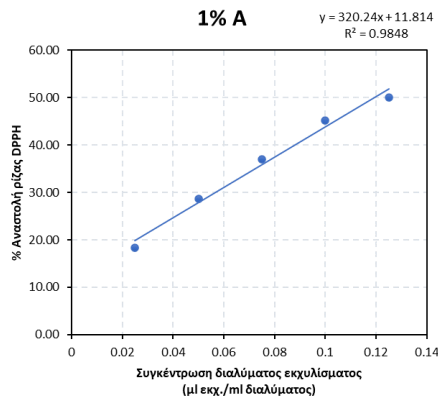
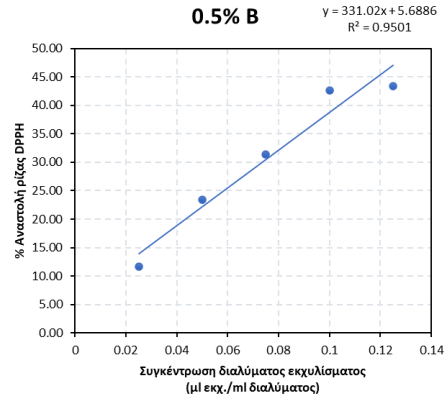
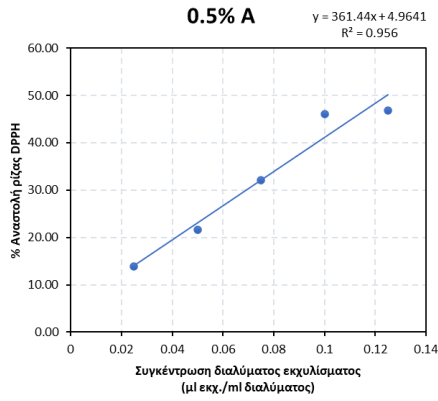
Διάγραμμα 6: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm: 2% β/ο, 4% β/ο, 6% β/ο και 8% β/ο για δύο επαναλήψεις (A και B), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g π.υ. και για χρόνο δειγματοληψίας t=8 h.



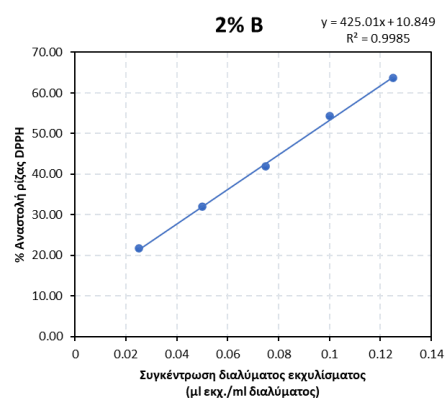
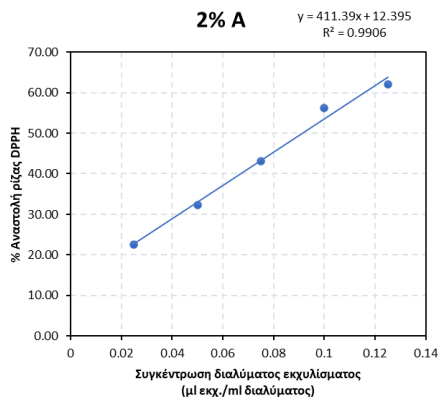
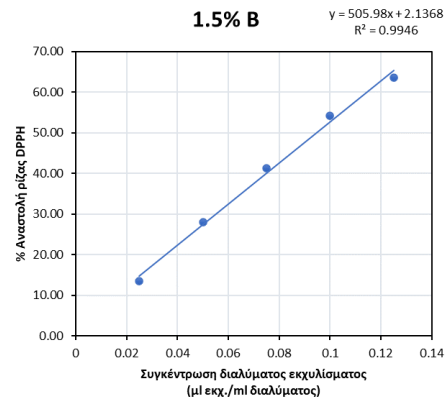
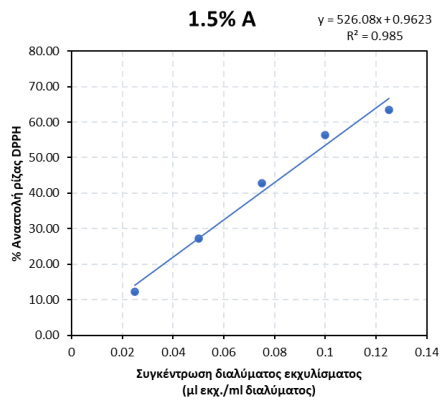
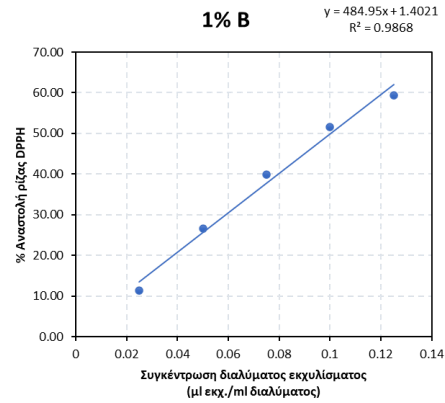
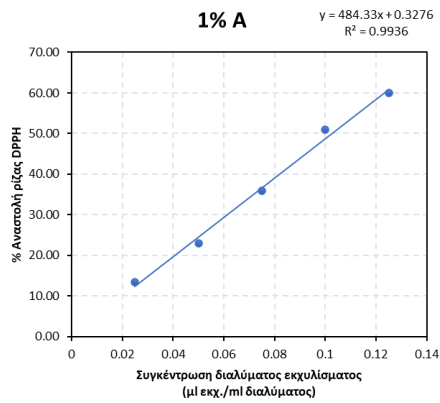
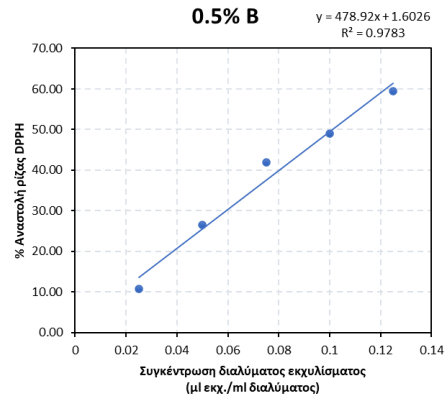
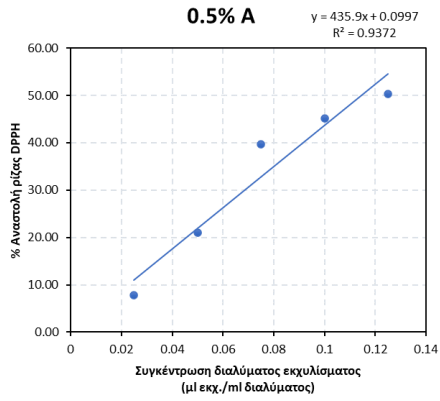
Διάγραμμα 7: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm: 20% β/ο, 25% β/ο, 33.3% β/ο και 50% β/ο για δύο επαναλήψεις (Α και Β), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και για χρόνο δειγματοληψίας t=6 h.



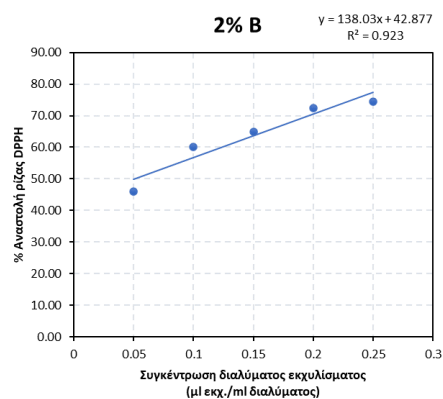
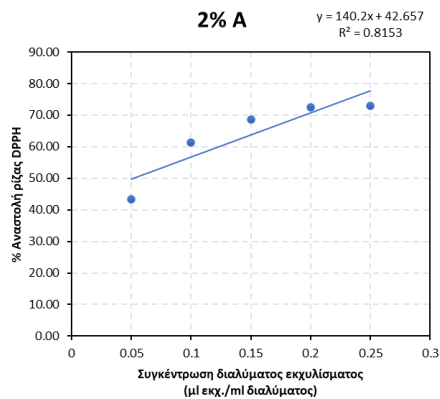
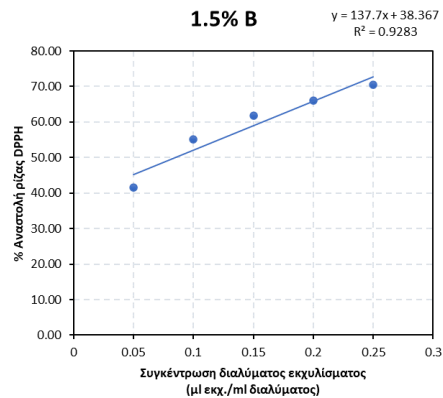
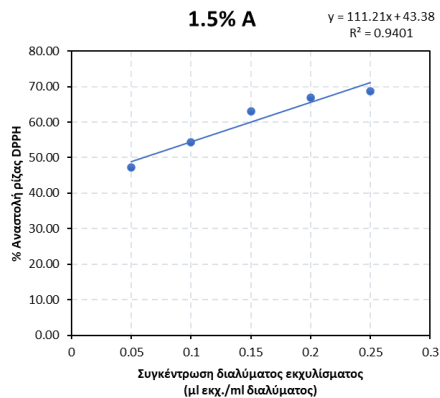
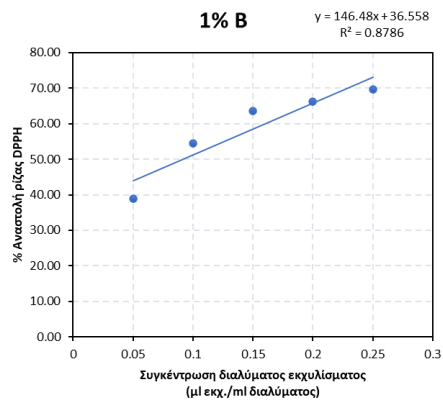
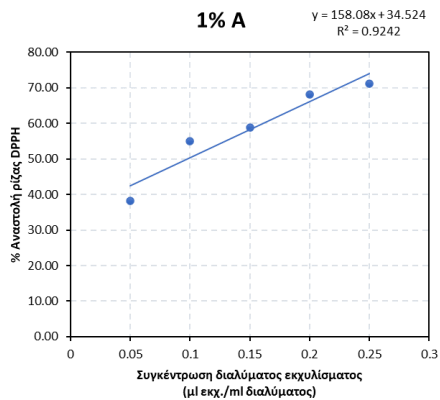
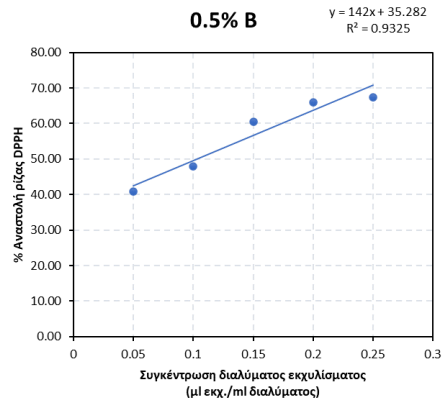
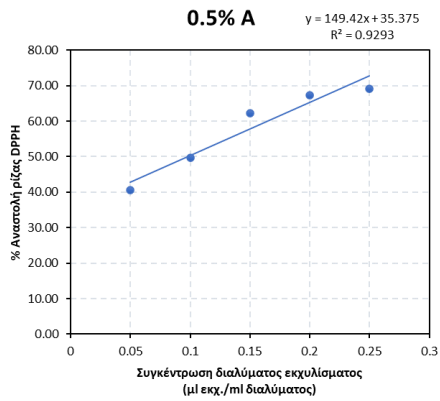
Διάγραμμα 8: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* σε κοκκομετρία <500 μm: 20% β/ο, 25% β/ο, 33.3% β/ο και 50% β/ο για δύο επαναλήψεις (Α και Β), για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% ο/ο και για χρόνο δειγματοληψίας t=48 h.



Διάγραμμα 9: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm, για διαφορετικά ενζυμικά φορτία 0.5% ο/ο, 1% ο/ο, 1.5% ο/ο και 2% ο/ο για δύο επαναλήψεις (A και B) και για χρόνο δειγματοληψίας t=6 h.



Διάγραμμα 10: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm, για διαφορετικά ενζυμικά φορτία 0.5% ο/ο, 1% ο/ο, 1.5% ο/ο και 2% ο/ο για δύο επαναλήψεις (A και B) και για χρόνο δειγματοληψίας t=24 h.



Διάγραμμα 11: Διαγράμματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH (χρόνος επώασης 30 min) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina L.* 25% β/ο σε κοκκομετρία <500 μm, για διαφορετικά ενζυμικά φορτία 0.5% ο/ο, 1% ο/ο, 1.5% ο/ο και 2% ο/ο για δύο επαναλήψεις (A και B) και για χρόνο δειγματοληψίας t=48 h.