



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών μορίων
από τον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.):
μελέτη της επίδρασης κυτταρινολυτικών και
πηκτινολυτικών ενζύμων**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΤΣΟΧΑ ΛΥΔΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΜΑΜΜΑ ΔΙΟΜΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022 στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαμμά Διομή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο καθηγήτρια του ΕΜΠ Διομή Μαμμά, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας, αλλά και για την ουσιαστική καθοδήγηση και υποστήριξή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ Στέλλα Καλαντζή και την Υ.Δ. Ζαφειρία Λεμονή για την βοήθεια τους αλλά και για τον χρόνο που αφιέρωσαν κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της διπλωματικής μελέτης.

Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την εξαιρετική συνεργασία και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που δημιούργησαν.

Τέλος, τίποτα από τα παραπάνω δεν θα ήταν δυνατό χωρίς την υποστήριξη της οικογένειάς μου αλλά και των κοντινών μου φίλων. Ευχαριστώ λοιπόν όλους αυτούς τους ανθρώπους που με στήριξαν έμπρακτα και καθημερινά καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, βοηθώντας με να φτάσω στον στόχο μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια αξιοποιούνται όλο και περισσότερες φυτικές πρώτες ύλες στην φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και στην παραγωγή καλλυντικών προϊόντων και τροφίμων. Η αυξανόμενη ζήτησή τους οφείλεται στις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες καθώς και στις θεραπευτικές τους δράσεις. Ο καρπός της άγριας τριανταφυλλιάς (*Rosa canina L.*) αποτελεί ένα δημοφιλές και ευρείας χρήσης φυτικό θεραπευτικό μέσο, λόγω της αντιοξειδωτικής, αντιμικροβιακής, αντιφλεγμονώδους αλλά και αντικαρκινικής δράσης που παρουσιάζει. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στις βιοδραστικές ενώσεις που διαθέτει και συγκεκριμένα στα αντιοξειδωτικά, τις πολυφαινολικές ενώσεις, τα καρτενοειδή, τις βιταμίνες αλλά και τα τριτερπενοϊκά οξέα. Τα συστατικά αυτά καθιστούν τον καρπό, αλλά και τα υπόλοιπα μέρη του φυτού, αποτελεσματικά μέσα καταπολέμησης και πρόληψης πληθώρας ασθενειών και παθήσεων, όπως για παράδειγμα οι διαταραχές του νευρικού, του καρδιαγγειακού αλλά και του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος, το άσθμα, η έλλειψη βιταμίνης C, η γρίπη, ο διαβήτης, η αρθρίτιδα αλλά και ο καρκίνος.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εφαρμογή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης για την άντληση επιθυμητών βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς (πρώτη ύλη), αλλά και η διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών παραμέτρων της εκχύλισης στην απόδοση της. Η απόδοση της διεργασίας εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC), του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) αλλά και της αντιοξειδωτικής δράσης (δείκτης IC₅₀) του εκάστοτε εκχυλίσματος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σύστασης της ξηρής πρώτης ύλης. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν συμβατικές εκχυλίσεις με υδροαιθανολικό διάλυμα ως διαλύτη, σε εύρος συγκεντρώσεων πρώτης ύλης 1-7 % w/v, και προσδιορίστηκε η απόδοση των εκχυλισμάτων στις επιθυμητές βιοδραστικές ενώσεις. Ακολούθησαν πειράματα ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (EYE) της πρώτης ύλης, με χρήση των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color. Οι χαρακτηρισμοί των εκχυλισμάτων επιβεβαίωσαν ότι η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αποδίδει αυξημένη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων συγκριτικά με την συμβατική.

Κατά τα πειράματα EYE μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής μίας παραμέτρου της εκχύλισης στην απόδοση της διεργασίας σε συνάρτηση με τον χρόνο και διατηρώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm και διερευνήθηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης, στα εύρη: <500, 500-600 και 800-1000 μm, και ακολούθως της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης, στα εύρη συγκεντρώσεων 1-7 % w/v, και 20-50 % w/v. Μέγιστη απόδοση υπολογίστηκε στα εκχυλίσματα στερεού κοκκομετρίας <500 μm, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης είχε αρνητική επίδραση στην απόδοση,

αλλά θετική επίδραση στην συγκέντρωση των μετρούμενων βιοδραστικών ενώσεων. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η συνεργιστική δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color σε σύστημα συγκέντρωσης στερεού 25% w/v και κοκκομετρίας στερεού <500 μm, υπό σταθερό ενζυμικό φορτίο και σε διαφορετικούς χρόνους προσθήκης των ενζύμων στο εκάστοτε σύστημα. Έπειτα, βάσει του πειραματικού σχεδιασμού Box-Wilson Central Composite Design, ολοκληρώθηκαν εκχυλίσες με χρήση των Viscoferm και Pectinex Ultra Color σε 9 διαφορετικούς συνδυασμούς ενζυμικής συγκέντρωσης- του εύρους 0.3-0.9% v/v- και με στερεό κοκκομετρίας <500 μm και συγκέντρωσης 25% w/v. Ακολούθησε στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων και εξαγωγή των μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν ικανοποιητικά την απόκριση των τιμών TFC και του δείκτη αντιοξειδωτικής δράσης IC₅₀, συναρτήσει της συγκέντρωσης των σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color στο σύστημα της εκχύλισης (ανεξάρτητες μεταβλητές). Για την απόκριση του συστήματος σε φαινολικές ενώσεις δεν εξήχθη κάποιο στατιστικά σημαντικό μοντέλο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της διεργασίας με χρήση της συνάρτησης επιθυμίας και με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των τιμών TFC και την ελαχιστοποίηση των δεικτών αναστολής IC₅₀ (εξαρτημένες μεταβλητές). Οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που υπολογίστηκαν ήταν 0.88% v/v Viscoferm και 0.71% v/v Pectinex Ultra Color.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και ποιοτικός έλεγχος των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων του καρπού της *Rosa canina L.* μέσω των μεθόδων διάχυσης δίσκου και διάχυσης πηγαδιού, με χρήση καλλιέργειας του μικροοργανισμού *E. Coli*.

Λέξεις-Κλειδιά: άγριο τριαντάφυλλο, καρπός, *Rosa canina L.*, βιοδραστικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση, πολυφαινόλες, εκχύλιση, ένζυμα, αντιμικροβιακή δράση, φλαβονοειδή

ABSTRACT

In recent years, more and more plant raw materials have been used in the pharmaceutical industry, as well as in the production of cosmetics and food products. Their growing demand is due to their health-beneficial properties and their medicinal actions. The fruit of the wild rose *Rosa canina L.*, also known as rosehip, is a popular and widely used herbal remedy, due to its antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-cancer effects. Rosehip owes these properties to its bioactive compounds, such as antioxidants, polyphenolic compounds, carotenoids, vitamins and triterpenic acids. Due to these components, the fruits, flowers and roots of the wild rose can be effective means of combating and preventing many diseases and ailments, such as disorders of the nervous, cardiovascular and lower urinary system, asthma, lack of vitamin C, flu, diabetes, arthritis and even cancer.

This thesis aims at the application of enzyme-assisted extraction for the extraction of desired bioactive compounds from the shell (hypanthium) of the wild rose fruit (raw material), but also at the investigation of the effect that different extraction parameters have on its performance. The determination of the extraction yield was based on the calculation of the total phenolic content (TPC), the total flavonoid content (TFC) and the antioxidant activity (IC_{50}) of each extract, via the Folin-Ciocalteu, Aluminum Chloride and DPPH Scavenging Activity assays.

First, a component analysis of the dried raw material was performed, according to the Association of Official Analytical Chemists' methods. Then, a hydroethanolic solution was used as a solvent in conventional extractions in a range of raw material concentration of 1-7 % w/v. Enzyme-assisted extractions (EAE) of the raw material followed, using the commercial enzyme blends Viscoferm and Pectinex Ultra Color. The characterizations of the extracts confirmed that the enzyme-assisted extraction has a higher yield than the conventional one.

The EAE experiments, focused on the effect of different extraction parameters at its performance as a function of time and by keeping the rest parameters constant. The influence of raw material's particle size was investigated, in the ranges: <500, 500-600 and 800-1000 μm , whereas the influence of raw material's concentration, in the ranges of 1-7 % w/v, and 20-50% w/v. The particle size of <500 μm demonstrated the highest extraction yield, while the increase of raw material's concentration had a negative effect on the yield, but a positive effect on the concentration of the measured bioactive compounds. Then, the synergistic effect of the enzyme blends Viscoferm and Pectinex Ultra Color was examined by adding, at different points of time, a fixed enzyme load of each blend in systems, where the raw material's concentration was 25% w/v and its particle size less than 500 μm . Thereafter, some EAEs were carried out, based on the Box-Wilson Central Composite Experimental Design, in order to study the synergistic influence of Viscoferm and Pectinex Ultra Color at a concentration range of 0.3-0.9% v/v, by keeping constant the solid concentration (25% w/v) and the

particle size (<500 μm). The results of the bioactive compounds characterization were statistically analyzed. Subsequently, mathematical models, that predict the TFC and IC_{50} values, were derived, depending on the concentration of Viscoferm and Pectinex Ultra Color enzyme blends in the extraction system (independent variables). No statistically significant model was derived for the prediction of TPC values. Finally, process optimization was performed, using a desirability function and by aiming to the simultaneous maximization of TFC values, and minimization of IC_{50} values (dependent variables). The optimal values of the independent variables were 0.88% v/v Viscoferm and 0.71% v/v Pectinex Ultra Color.

Moreover, an antimicrobial activity assessment of the extracts was carried out, via the Disk Diffusion and Well Diffusion Methods, by using *E.Coli* as a test microorganism.

Key-words: wild rose, rosehip, *Rosa canina L.*, bioactive compounds, antioxidant activity, phenols, extraction, enzymes, antimicrobial activity, flavonoids

Πίνακας Περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : Ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa canina L.</i>	14
1.1 Γενικά στοιχεία & Εφαρμογές του φυτού <i>Rosa canina L.</i>	14
1.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά.....	15
1.3 Σύσταση του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς (<i>Rosa canina L.</i>).....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : Βιοδραστικές Ενώσεις.....	20
2.1 Τερπένια & Τερπενοειδή	21
2.1.1 Γενικά στοιχεία.....	21
2.1.2 Καροτενοειδή	22
2.2 Αλκαλοειδή	23
2.3 Φαινολικές Ενώσεις.....	24
2.3.1 Φλαβονοειδή	25
2.3.2 Φαινολικά Οξέα.....	27
2.3.3 Τανίνες.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : Αντιοξειδωτική Δράση Βιοδραστικών Μορίων	30
3.1 Ελεύθερες Ρίζες	30
3.2 Ο Ρόλος και η Δράση των Αντιοξειδωτικών Μορίων	31
3.3 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών Ενώσεων	31
3.4 Βιταμίνη C.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : Εκχύλιση Βιοδραστικών Ενώσεων.....	34
4.1 Εφαρμογή της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυτά στην ανάπτυξη καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων.....	34
4.2 Μέθοδοι Εκχύλισης.....	36
4.2.1 Συμβατική Εκχύλιση	36
4.2.2 Μη Συμβατική Εκχύλιση.....	38
4.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE).....	38
4.3.1 Στοιχεία της μεθόδου	38
4.3.2 Ένζυμα και Κυτταρικό Τοίχωμα	39
4.4 Κρίσιμες Παράμετροι της Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης Στερεού -Υγρού.....	42
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι	45
5.1 Υλικά και Αντιδραστήρια	45
5.1.1 Όργανα και Συσκευές	45
5.1.2 Πρώτη Ύλη	45

5.1.3 Αντιδραστήρια- Τυποποιημένα Χημικά Παρασκευάσματα	46
5.2 Μέθοδοι	46
5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση	47
5.2.2 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση	47
5.3 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων	52
5.3.1 Ανάλυση σύστασης περικαρπίου του καρπού <i>Rosa canina L.</i>	52
5.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Ενώσεων-Μέθοδος Folin Ciocalteu	53
5.3.3 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών-Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου	56
5.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.....	58
5.4 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων	60
5.4.1 Υγρό και στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης <i>E. Coli</i>	60
5.4.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method) για την εκτίμηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων	61
5.4.3 Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method) για την εκτίμηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων	61
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο : Αποτελέσματα & Συζήτηση	64
6.1 Σύσταση περικαρπίου του καρπού της <i>Rosa canina L.</i>	64
6.2 Συμβατική Εκχύλιση	65
6.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE).....	67
6.3.1 Μελέτη Επίδρασης της Κοκκομετρίας του Στερεού	67
6.3.2 Μελέτη Επίδρασης της Συγκέντρωσης του Στερεού	73
6.3.3 Μελέτη Επίδρασης Υψηλών Συγκεντρώσεων του Στερεού (High Solid).....	79
6.3.4 Μελέτη επίδρασης Συνεργιστικής Δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color	85
6.3.5 Μελέτη της επίδρασης του Ενζυμικού Φορτίου κατά την Συνεργιστική Δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color.....	90
6.4 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων	106
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο : Συμπεράσματα	110
7.1 Συμπεράσματα	110
7.2 Προτάσεις μελλοντικής διερεύνησης & Προοπτικές	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	56
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης με τη μέθοδο Χλωριούχου Αργιλίου	58
Διάγραμμα 3: Μεταβολή της συγκέντρωσης και απόδοσης των TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης.....	65
Διάγραμμα 4: Μεταβολή της συγκέντρωσης και απόδοσης των TFC συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης.....	66
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v και (δ) 7% w/v και για χρόνο επώασης 30 min.....	66
Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας.....	68
Διάγραμμα 7: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας	69
Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας.....	70
Διάγραμμα 9: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας	70
Διάγραμμα 10: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) κοκκομετρία: <500 μm, t _{δευματολειψίας} = 6 h, (β) κοκκομετρία: 500-600 μm, t _{δευματολειψίας} = 6 h, (γ) κοκκομετρία: 800-1000 μm, t _{δευματολειψίας} = 6 h, (δ) κοκκομετρία: <500 μm, t _{δευματολειψίας} = 48 h, (ε) κοκκομετρία: 500-600 μm, t _{δευματολειψίας} = 48 h, (στ) κοκκομετρία: 800-1000 μm, t _{δευματολειψίας} = 48 h.....	72
Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού.....	73
Διάγραμμα 12: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	74
Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	75
Διάγραμμα 14: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	75
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε t _{δευματολειψίας} =6h .	77
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε t _{δευματολειψίας} =8h .	77
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε t _{δευματολειψίας} =48h	78
Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού.....	80
Διάγραμμα 19: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	80
Διάγραμμα 20: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	81

Διάγραμμα 21: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	82
Διάγραμμα 22: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) συγκέντρωση περικαρπίου 50% w/v, (β) συγκέντρωση περικαρπίου 33.3% w/v, (γ) συγκέντρωση περικαρπίου 25% w/v, (δ) συγκέντρωση περικαρπίου 20% w/v, για $t_{\text{δευματοληψίας}} = 6 \text{ h}$	83
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) συγκέντρωση περικαρπίου 50% w/v, (β) συγκέντρωση περικαρπίου 33.3% w/v, (γ) συγκέντρωση περικαρπίου 25% w/v, (δ) συγκέντρωση περικαρπίου 20% w/v, για $t_{\text{δευματοληψίας}} = 48 \text{ h}$	84
Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των εξετασθέντων συστημάτων για συγκέντρωση στερεού 25% w/v και με ενζυμικό φορτίο 1% v/v Pectinex (P) και 1% v/v Viscoferm (V)	86
Διάγραμμα 25: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων των εξετασθέντων συστημάτων για σταθερή συγκέντρωση στερεού και ενζυμικού φορτίου	86
Διάγραμμα 26: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα των εξετασθέντων συστημάτων για συγκέντρωση στερεού 25% w/v και με ενζυμικό φορτίο 1% v/v Pectinex (P) και 1% v/v Viscoferm (V)	87
Διάγραμμα 27: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων των εξετασθέντων συστημάτων για σταθερή συγκέντρωση στερεού και ενζυμικού φορτίου	88
Διάγραμμα 28: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) P&V, $t=12\text{h}$, $t_{\text{δευματοληψίας}}=12\text{h}$, (β) P&V, $t=12\text{h}$, $t_{\text{δευματοληψίας}}=24\text{h}$, (γ) P&V, $t=24\text{h}$, $t_{\text{δευματοληψίας}}=24\text{h}$ (δ) P&V, $t=12\text{h}$, $t_{\text{δευματοληψίας}}=48\text{h}$ (ε) P&V, $t=24\text{h}$, $t_{\text{δευματοληψίας}}=48\text{h}$	89
Διάγραμμα 29: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες	91
Διάγραμμα 30: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες	92
Διάγραμμα 31: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες	92
Διάγραμμα 32: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες	93
Διάγραμμα 33: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. Τα εκχυλίσματα προέκυψαν μετά από κατεργασία του περικαρπίου της <i>R. canina</i> L. με (α) 0.9% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex (β) 0.9% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (δ) 0.9% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (ε) 0.6% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (ς) 0.6% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (ζ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (η) 0.3% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (θ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex. $t_{\text{δευματοληψίας}}=2\text{h}$	95
Διάγραμμα 34: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. Τα εκχυλίσματα προέκυψαν μετά από κατεργασία του περικαρπίου της <i>R. canina</i> L. με (α) 0.9% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex (β) 0.9% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (δ) 0.9% v/v	

Viscoferm + 0.3% ν/ν Pectinex, (δ) 0.6% ν/ν Viscoferm + 0.9% ν/ν Pectinex, (ε) 0.6% ν/ν Viscoferm + 0.6% ν/ν Pectinex, (στ) 0.6% ν/ν Viscoferm + 0.3% ν/ν Pectinex, (ζ) 0.3% ν/ν Viscoferm + 0.9% ν/ν Pectinex, (η) 0.3% ν/ν Viscoferm + 0.6% ν/ν Pectinex, (θ) 0.3% ν/ν Viscoferm + 0.3% ν/ν Pectinex. $t_{\text{δειγματοληψίας}}=6\text{h}$	97
Διάγραμμα 35: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών TFC.....	100
Διάγραμμα 36: (Α) Τρισδιάστατο διάγραμμα των επιφανειών απόκρισης, (Β) Ισοϋψείς καμπύλες του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, συναρτήσσει των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού.	101
Διάγραμμα 37: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών των δεικτών αντιοξειδωτικής δράσης.	103
Διάγραμμα 38: (Α) Τρισδιάστατο διάγραμμα των επιφανειών απόκρισης, (Β) Ισοϋψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας, συναρτήσσει των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού	104
Διάγραμμα 39: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών TPC.....	105

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Στοιχεία ενζυμικών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης	47
Πίνακας 2: Μεταβλητές και επίπεδα πειραματικού σχεδιασμού.....	50
Πίνακας 3: Μήτρα σχεδιασμού	50
Πίνακας 4: Πραγματικές τιμές μεταβλητών.....	50
Πίνακας 5: Τιμές ενζυμικού φορτίου Viscoferm και Pectinex.....	51
Πίνακας 6: Σύσταση περικαρπίου του καρπού της <i>Rosa canina</i> L.	64
Πίνακας 7: Συγκέντρωση και απόδοση σε TPC και TFC κατά την συμβατική εκχύλιση για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	65
Πίνακας 8: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού	67
Πίνακας 9: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικής κοκκομετρίας σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6h$ και $t=48h$	72
Πίνακας 10: Δείκτης IC_{50} για εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού και σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6h$, $t=8h$ και $t=48h$	78
Πίνακας 11: Δείκτης IC_{50} για εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού και σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6h$ και $t=48h$	84
Πίνακας 12: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex.....	90
Πίνακας 13: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση της πρώτης ύλης με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες για χρόνους δειγματοληψίας $t=2h$ και $t=6h$	97
Πίνακας 14: Αποτελέσματα εξαρτημένων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού για $t_{\text{δειγματοληψίας}}=2h$	98
Πίνακας 15: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.	99
Πίνακας 16: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για τους δείκτες αντιοξειδωτικής δράσης.....	102
Πίνακας 17: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.....	105

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Άνθος της άγριας τριανταφυλλιάς <i>Rosa canina</i> L.....	16
Εικόνα 2: Καρπός της άγριας τριανταφυλλιάς <i>Rosa canina</i> L και εγκάρσια διατομή του	16
Εικόνα 3: Σπόροι του καρπού <i>Rosa canina</i> L.....	17
Εικόνα 4: Περικάρπιο του καρπού <i>Rosa canina</i> L.....	17
Εικόνα 5: Χημικές δομές κυρίαρχων βιοδραστικών ενώσεων	21
Εικόνα 6: Χημικές δομές των κυριότερων καρροτενοειδών της ανθρώπινης διατροφής.....	23
Εικόνα 7: Βασικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων	25
Εικόνα 8: Βασική δομή φλαβονοειδών ενώσεων	26
Εικόνα 9: Δομές των βασικών υποκατηγοριών των φλαβονοειδών και κυριότερες ενώσεις τους.....	27
Εικόνα 10: Χημικές δομές των κυριότερων φαινολικών οξέων.....	28
Εικόνα 11: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	30
Εικόνα 12: Μηχανισμός απενεργοποίησης της ελεύθερης ρίζας του ανιόντος υπεροξειδίου από την κερσετίνη (φυσικό αντιοξειδωτικό)	31
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων.....	40
Εικόνα 14: Βασική αρχή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες.....	41
Εικόνα 15: Καρποί του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa canina</i> L.....	46
Εικόνα 16: Βασική αντίδραση οξείδωσης της φαινόλης στην μέθοδο F-C από ιόν μετάλλου M, όπου M: βολφράμιο ή μολυβδαίνιο.....	54
Εικόνα 17: Αντίδραση συμπλοκοποίησης της κερσετίνης (φλαβονοειδές) με το μεταλλικό ιόν Al^{3+}	57
Εικόνα 18: Αντίδραση απενεργοποίησης της ρίζας DPPH από αντιοξειδωτική ένωση AH... ..	59
Εικόνα 19: Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method)	61
Εικόνα 20: Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method)	62
Εικόνα 21: Αντιμικροβιακή δράση εκχυλίσματος (A) μέθοδος διάχυσης δίσκου (B) μέθοδος διάχυσης πηγαδιού.....	107

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina* L.

1.1 Γενικά στοιχεία & Εφαρμογές του φυτού *Rosa canina* L.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σταθερή αύξηση της ζήτησης νέων φυσικών προϊόντων και συστατικών με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Ένα από αυτά είναι και το φυτό της άγριας τριανταφυλλιάς (*Rosa canina* L.), το οποίο ανήκει στο γένος *Rosa* της οικογένειας Rosaceae. Το φυτό *Rosa canina* L. είναι εγγενές στην Ευρώπη, τη δυτική Ασία και τη βόρεια Αφρική. Το λατινικό όνομα προέρχεται από το *canis*, που σημαίνει σκύλος, και σχετίζεται με τη χρήση των ριζών του συγκεκριμένου φυτού για τη θεραπεία από δάγκωμα σκύλου κατά την αρχαιότητα. Τα είδη της οικογένειας Rosaceae είναι μακρόβιοι πολυετείς θάμνοι, οι οποίοι αναπτύσσονται σε ξηρά δάση και έχουν την ικανότητα να αποικίζουν εύκολα νέες περιοχές (Werlemark, 2003).

Ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου αποτελεί πηγή βιοδραστικών μορίων, τα οποία εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιγηραντική, αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση, αποτελώντας φυτικό φάρμακο ευρείας θεραπευτικής ικανότητας. Έχει γίνει λοιπόν πληθώρα ιστορικών καταγραφών αναφορικά με την παρασκευή ροφημάτων από διάφορα μέρη του φυτού ως θεραπευτικό μέσο διάφορων ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, έχουν καταγραφεί χρήσεις του στη Γαλλία με σκοπό την θεραπεία του σκορβούτου και των αιμορροΐδων. Αντίστοιχα το 1941, χρησιμοποιήθηκε ευρέως και στην Βρετανία για την πρόληψη του σκορβούτου σε μορφή σιροπιού (Cutler, 2003). Στη Βουλγαρία, το άνθος του τριαντάφυλλου χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια για τη θεραπεία ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ στη Ρωσία προτείνεται για τη θεραπεία πνευμονικών παθήσεων και λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Γενικότερα, όλα τα μέρη του φυτού μπορούν να αξιοποιηθούν στη θεραπεία ασθενειών και παθήσεων. Πιο συγκεκριμένα (Winther et al., 2016):

- Οι ρίζες του φυτού μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά ενάντια σε πρωκτικές αιμορροΐδες, προβλήματα δυσουρίας και ρευματισμού αλλά και στον κοινό βήχα.
- Τα φύλλα *Rosa canina* L. μπορούν να αξιοποιηθούν στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων της γρίπης, του βήχα αλλά και του κνησμού.
- Τα κλαδιά παρουσιάζουν βελτιωτική δράση σε νεφρολιθίαση και σε εκζέματα.
- Οι καρποί τέλος, όντες πλούσιοι σε βιοδραστικά συστατικά, έχουν αξιοποιηθεί για την αντιμετώπιση της έλλειψης βιταμίνης C, του βήχα και της γρίπης, ασθενειών της χοληδόχου κύστης, του άσθματος, διαταραχών του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος αλλά και καρδιακών διαταραχών. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί η ευεργετική τους δράση στην αντιμετώπιση δερματικών διαταραχών, ηπατοτοξικότητας, νεφρικών διαταραχών, διάρροιας, φλεγμονών, αρθρίτιδας, διαβήτη, υπερλιπιδαιμίας, όπως επίσης

και στην καταπολέμηση του καρκίνου (Mármol et al., 2017, Winther et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια δίνεται έμφαση στην μελέτη και έρευνα της δραστηριότητας αυτού του φυτού. Το *Rosa canina* L. είναι το πιο μελετημένο και πιο χρησιμοποιούμενο είδος *Rosa*, και αξιοποιείται όχι μόνο στον τομέα της Φαρμακευτικής αλλά και στην ανάπτυξη βρώσιμων ή καλλυντικών προϊόντων που προάγουν την ευεξία και θωρακίζουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Η ευεργετική δράση του καρπού οφείλεται στην περιεκτικότητά του σε (Roman et al., 2013):

- Φλαβονοειδή
- Καροτενοειδή
- Λιπαρά οξέα
- Φυλλικό οξύ
- Βιταμίνες, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
- Γαλακτολιπίδια
- Αντιοξειδωτικά
- Σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη
- Πηκτίνες
- Ταννίνες
- Αντιφλεγμονώδη μόρια

Τα προϊόντα του καρπού διατίθενται σε μορφή ελαίων, εκχυλισμάτων, σιροπιών, συμπληρωμάτων διατροφής αλλά και καλλυντικών κρεμών και ορών (Jiménez et al., 2017). Επιπλέον, το *Rosa canina* L. χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή μαρμελάδας, πουρέ, ζελέ, σιροπιού, κομπόστας, ποτών, κρασιού αλλά και πολτού. Εκτός από την πλούσια περιεκτικότητά σε βιοδραστικά συστατικά, τα φρούτα του φυτού *Rosa canina* L. έχουν ευχάριστο άρωμα, που τα καθιστά δημοφιλή επιλογή για την παραγωγή γευστικών τσαγιών (Ραυνογιάννη et al., 2019)

1.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Το γένος *Rosa* περιέχει πάνω από 100 είδη που είναι ευρέως διαδεδομένα κυρίως στην Ευρώπη, την Ασία, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αμερική. Όπως προαναφέρθηκε, πρόκειται για ένα θάμνο ύψους 1-3 μέτρων, που συχνά διαθέτει αναρριχητική ικανότητα λόγω των αγκαθιών του. Τα κλαδιά του είναι συχνά κυρτά, ενώ τα πέταλα του άνθους του φυτού είναι 5, μέση διάμετρο 4-5cm. Τα άνθη του συναντώνται σε λευκό χρώμα ή σε ανοιχτές ροζ και σπανιότερα βαθύτερες ροζ αποχρώσεις (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Άνθος της άγριας τριανταφυλλιάς *Rosa canina* L.

Ο καρπός της άγριας τριανταφυλλιάς (“rose hip”) εμφανίζεται σε διάφορα μεγέθη και με ένα ευρύ φάσμα αποχρώσεων, το οποίο κυμαίνεται από κίτρινο-πορτοκαλί έως σκούρο κόκκινο και ακόμη και μαύρο, ανάλογα με την σύσταση του σε χρωμοφόρες ενώσεις, όπως είναι τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες (Bhave et al., 2017, Roman et al., 2013).

Στο εσωτερικό του καρπού εσωκλείονται σπόροι, οι οποίοι αποτελούν περίπου το 30% του καρπού και περιβάλλονται από το σαρκώδες ερυθρό περικάρπιο, που λειτουργεί ως κέλυφος (Εικόνα 2) (Winther et al., 2016).



Εικόνα 2: Καρπός της άγριας τριανταφυλλιάς *Rosa canina* L. και εγκάρσια διατομή του

1.3 Σύσταση του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς (*Rosa canina* L.)

Ο καρπός *Rosa canina* L. αποτελείται από τους σπόρους και το περικάρπιο. Κάθε ένα από τα δύο κύρια μέρη περιέχει πληθώρα φυσικών συστατικών, πολλά από τα οποία εμφανίζουν επιθυμητές ή και θεραπευτικές δράσεις. Η ωρίμανση του καρπού πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς και η ακριβής σύσταση του καθορίζεται από παράγοντες όπως, η ποιότητα του εδάφους, η περιεκτικότητα του σε θρεπτικά συστατικά, οι βροχοπτώσεις, η έκθεση του καρπού στον ήλιο, η περίοδος συγκομιδής αλλά και το υψόμετρο (Paunović et al., 2019, Winther et al., 2016).



Εικόνα 3: Σπόροι του καρπού *Rosa canina* L.



Εικόνα 4: Περικάρπιο του καρπού *Rosa canina* L.

Το *Rosa canina* L., έχει διερευνηθεί ως προς τη χημική του σύσταση και το βιολογικό του δυναμικό και έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία θρεπτικών και ενεργών συστατικών, όπως φαινολικά οξέα, προανθοκυανιδίνες, τανίνες, φλαβονοειδή, τριτερπενικά οξέα, φωσφολιπίδια, μεταλλικά στοιχεία, γαλακτολιπίδια και καροτενοειδή (Lattanzio et al., 2011).

Συστατικά περικάρπιου

Πιο συγκεκριμένα, ο καρπός του *Rosa canina* L. περιέχει κιτρικό οξύ και μεγάλες ποσότητες ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) συγκριτικά με άλλα φρούτα και λαχανικά, και συγκεκριμένα από 3g έως 40 g ανά kg ξηρού στερεού. Εκτός από βιταμίνη C περιέχονται και ποσότητες βιταμινών A, B1, B2, B6, D, E και K (Koczka et al., 2018). Όσον αφορά τα καροτενοειδή του καρπού, τα συνηθέστερα είναι το λυκοπένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη, η ρουβιξανθίνη, η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη. Επιπλέον, βασικά χημικά συστατικά είναι τα φλαβονοειδή και οι προανθοκυκνιδίνες, που υπάγονται στην κατηγορία των πολυφαινολικών ενώσεων, αλλά και οι α- και γ-τοκοφερόλες (Winther et al., 2016). Τα τριτερπενοϊκά οξέα του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου είναι κυρίως γνωστά για τις ανοσοτροποποιητικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το ουρολικό και το ολεανολικό δρούν ηπατοπροστατευτικά, και εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Στους καρπούς εντοπίζεται και βετουλινικό οξύ. Το τελευταίο είναι γνωστό όχι μόνο για τις αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες αλλά και για την αναστολή του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας. Εξίσου σημαντικές βιολογικά δραστικές ενώσεις των καρπών είναι τα γαλακτολιπίδια (με κυριότερο το GOPO), τα οποία παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντική και αντικαρκινική δράση, αλλά και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που εντοπίζονται στους σπόρους της τριανταφυλλιάς, και είναι κυρίως το λινολεϊκό (45-55%), το α-λινολενικό οξύ (18-32%) και το ελαϊκό οξύ (Bhave et al., 2017). Στους καρπούς περιέχεται και πληθώρα μεταλλικών στοιχείων, όπως φώσφορος, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και ψευδάργυρος (Koczka et al., 2018).

Συστατικά σπόρων

Όσον αφορά τη χημική σύσταση των σπόρων του καρπού *Rosa canina* L., τα πειραματικά δεδομένα είναι περιορισμένα, ωστόσο είναι γνωστή η παρουσία λιπαρών οξέων, με κυρίαρχα το λινολεϊκό (ωμέγα-6 λιπαρό οξύ), το α-λινολενικό (ωμέγα-3 λιπαρό οξύ) και το ελαϊκό οξύ, αλλά και άλλων βιολογικά ενεργών ενώσεων, όπως η τρετινοΐνη, τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες, οι φυτοστερόλες και τα φωσφολιπίδια. Επιπλέον, στους σπόρους του καρπού περιέχονται και ποσότητες αργιλίου, ασβεστίου, χρωμίου, χαλκού, σιδήρου, μαγνησίου, μαγγανίου, καλίου, νατρίου, θείου και ψευδαργύρου (Dąbrowska et al., 2019).

Η υψηλή περιεκτικότητα των σπόρων σε λινολεϊκό και α-λινολενικό οξύ καθιστά τα έλαια του καρπού ευεργετικά ενάντια σε παθήσεις όπως το έκζεμα και η αρτηριοσκλήρυνση. Το α-λινολενικό οξύ, μετατρέπεται στο σώμα σε άλλα βιολογικά ενεργά λιπαρά οξέα, τα οποία συμβάλουν στην πρόληψη καρδιαγγειακών ασθενειών, στην προστασία του νευρικού συστήματος και στην πρόσληψη οξυγόνου. Επιπλέον, το έλαιο από σπόρους του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου αποτελεί ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό φυσικό ενυδατικό προϊόν με ισχυρές αναπλαστικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιγηραντικές ιδιότητες. Οι δράσεις αυτές συσχετίζονται με την υψηλή περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και την κατάλληλη αναλογία

ωμέγα-6 και ωμέγα-3 βασικών λιπαρών οξέων, που διευκολύνουν την εξυγίανση και την ορθή λειτουργία του δέρματος (Dąbrowska et al., 2019).

Σύγκριση βιοδραστικών συστατικών στο περικάρπιο και στους σπόρους του Rosa canina L.

Κατά την διεξαγωγή αναλύσεων σε δείγματα προϊόντων *Rosa canina* L. που προέκυψαν από επεξεργασία μόνο του περικάρπιου και έπειτα ολόκληρου του καρπού (περικάρπιο και σπόροι), μετρήθηκε περίπου τέσσερις φορές υψηλότερη περιεκτικότητα λιπαρών οξέων στα δείγματα που περιείχαν και σπόρους (ολόκληρος ο καρπός). Αντίστοιχα, βρέθηκε υψηλότερη κατά επτά φορές περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ. Συνεπώς, τα λιπαρά οξέα εμφανίζονται κυρίως στους σπόρους και λιγότερο στο περικάρπιο. Αντιθέτως, η βιταμίνη C και το β-καροτένιο δεν παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων με σπόρους και των δειγμάτων χωρίς. Επιπροσθέτως, οι ποσότητες τριτερπενοειδών, γαλακτολιπιδίων, λυκοπενίου και βιταμίνης E παρουσιάστηκαν αυξημένες στα προϊόντα απο σκέτο περικάρπιο, υποδεικνύοντας την υψηλή περιεκτικότητα της σάρκας του καρπού σε αυτά τα συστατικά. Τέλος, τα ολικά φλαβονοειδή εντοπίστηκαν στον ίδιο βαθμό στους σπόρους και στο περικάρπιο του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς, ωστόσο με διαφορές ως προς τα ποσοστά των επιμέρους συστατικών τους (Winther et al., 2016).

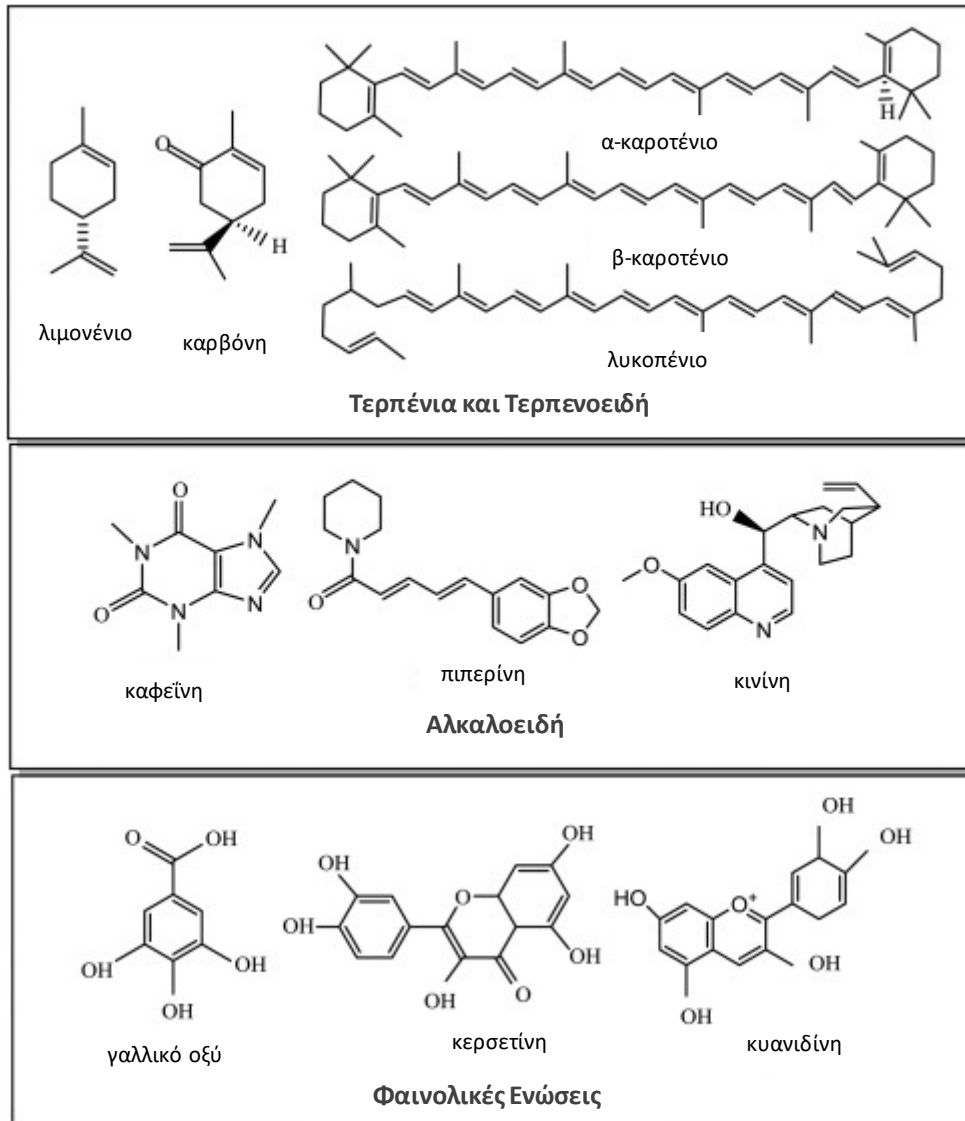
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Βιοδραστικές Ενώσεις

Οι βιοδραστικές ενώσεις αποτελούν βιολογικά ενεργά μόρια, τα οποία κατά την είσοδο τους σε ένα βιολογικό σύστημα, για παράδειγμα στον ανθρώπινο οργανισμό, επιτελούν συνήθως κάποια επιθυμητή δράση και εμφανίζουν μία ή περισσότερες θεραπευτικές ιδιότητες, περιορίζοντας την προφλεγμονώδη κατάσταση, το οξειδωτικό στρές και τις μεταβολικές διαταραχές. Τα προαναφερθέντα επιτυγχάνονται με αναστολή ή επαγωγή της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων, ή και των αντίστοιχων γονιδίων που τα εκφράζουν, και μέσω παρεμπόδισης της δράσης πρωτεϊνικών υποδοχέων (Santos et al., 2019).

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών είναι οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Οι βιοδραστικές ενώσεις αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες και εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες σε ορισμένα φυτά. Συνήθως πρόκειται για υδρόφοβα μόρια χαμηλής υδατοδιαλυτότητας που ενισχύουν την άμυνα και διευκολύνουν την επιβίωση των φυτών, ενώ διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

1. Τερπένια και Τερπενοειδή (περίπου 25.000 τύποι μορίων)
2. Αλκαλοειδή (περίπου 12.000 τύποι μορίων)
3. Φαινολικές Ενώσεις (περίπου 8.000 τύποι μορίων)

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται οι χημικές δομές ορισμένων βιοδραστικών ενώσεων κάθε κύριας κατηγορίας (Khezerlou & Jafari, 2020).



Εικόνα 5: Χημικές δομές κυρίαρχων βιοδραστικών ενώσεων (Khezerlou & Jafari, 2020)

Ένα μεγάλο εύρος βιοδραστικών ενώσεων απομακρύνονται από τα μέρη των φυτών μέσω της εκχύλισης, προκειμένου να ενισχύσουν προϊόντα περιποίησης και κατανάλωσης, προσδίδοντας επιθυμητές ιδιότητες που προάγουν την ευεξία. Η αντικαρκινική, αντιγηραντική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιδιαβητική ή και ανοσοτροποποιητική δράση που συχνά παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα φυτών, τα καθιστά έναν τομέα συνεχούς αυξανόμενης ζήτησης και ανάπτυξης.

2.1 Τερπένια & Τερπενοειδή

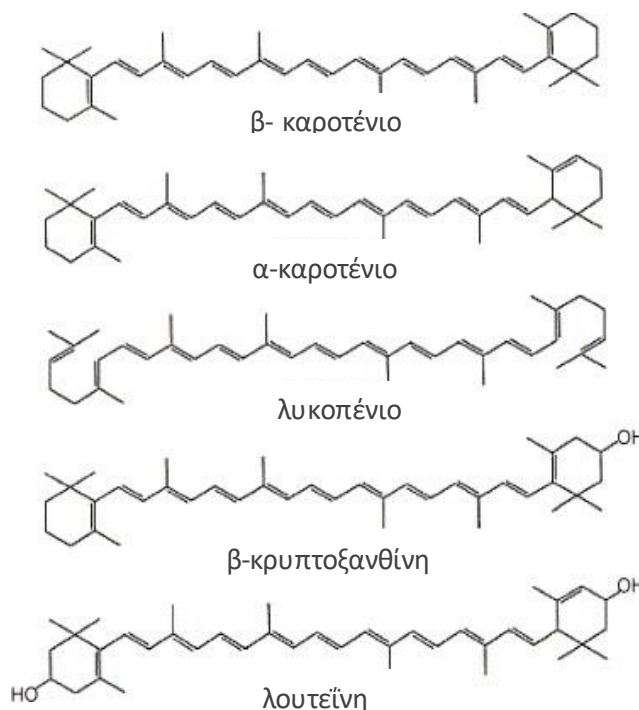
2.1.1 Γενικά στοιχεία

Στην κατηγορία των τερπενίων και τερπενοειδών υπάγεται ένα μεγάλο εύρος οργανικών ενώσεων που παράγονται κυρίως από φυτά αλλά και από ορισμένα έντομα. Πρόκειται για υδρογονάνθρακικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν παράγωγα του ισοπρένιου και ταξινομούνται με βάση τον αριθμό μονάδων ισοπρένιου που εντοπίζονται στο μόριο της εκάστοτε ένωσης. Αποτελούν βιοσυνθετικά δομικά στοιχεία και φέρουν έντονη οσμή, η οποία προσελκύει τα αρπακτικά αλλά και τα παράσιτα διαφόρων φυτοφάγων οργανισμών προστατεύοντας έτσι τα φυτά από τα φυτοφάγα ζώα. Τα τερπενοειδή προκύπτουν από τα τερπένια μέσω βιοχημικών τροποποιήσεων και περιέχουν άτομα οξυγόνου. Τερπένια και τερπενοειδή εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό σε διάφορους τύπους λουλουδιών και αιθέριων ελαίων. Οι συγκεκριμένες ενώσεις, μία εκ των οποίων είναι και η βιταμίνη Α, εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιγηραντικές και αντιοξειδωτικές δράσεις, για αυτό και αξιοποιούνται σε μεγάλο βαθμό σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα (Awuchi, 2019).

2.1.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μία οικογένεια χρωστικών ενώσεων που συντίθεται είτε από φυτά είτε από μικροοργανισμούς και ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών. Στα φυτά, τα καροτενοειδή εμπλέκονται σε φωτοσυνθετικούς μηχανισμούς και ενεργούν φωτο-προστατευτικά ενάντια στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες σε πληθώρα φρούτων και λαχανικών, ενώ σε αυτά οφείλεται το κίτρινο, πορτοκαλί ή και κόκκινο χρώμα τους. Οι ενώσεις που υπάγονται σε αυτή την κατηγορία εμφανίζουν δομή πολυισοπρένιου, δηλαδή αποτελούνται από μία μακρά ανθρακική αλυσίδα συζυγών διπλών δεσμών, η οποία εμφανίζει συμμετρία γύρω από τον κεντρικό διπλό δεσμό και παρέχει την δυνατότητα για δημιουργία *cis*- και *trans*- ισομερών (Εικόνα 6). Μέσω κυκλοποίησης των ακραίων ομάδων της αλύσου ή και εισαγωγής οξυγονούχων ομάδων, σχηματίζονται τα διαφορετικά είδη καροτενοειδών, οι χρωματισμοί αλλά και οι χαρακτηριστικές τους δράσεις (Rao & Rao, 2007).

Τα μόρια των καροτενοειδών δρουν ως αντιοξειδωτικά, ανοσοτροποποιητικά και παρεμποδιστές μεταλλάξεων, προλαμβάνοντας την εμφάνιση καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και άλλων χρόνιων ασθενειών. Για αυτούς τους λόγους οι εφαρμογές τους στην ιατρική, και οι χρήσεις τους σε καλλυντικά προϊόντα και ως πρόσθετα τροφίμων είναι πολυάριθμες. Παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 600 διαφορετικά καροτενοειδή στη φύση, μόνο τα 40 περίπου συμμετέχουν στην ανθρώπινη διατροφή, με κυριότερα και συνηθέστερα το β-καροτένιο, το α-καροτένιο, το λυκοπένιο, τη λουτεΐνη και την κρυπτοξανθίνη (Rao & Rao, 2007).



Εικόνα 6: Χημικές δομές των κυριότερων καροτενοειδών της ανθρώπινης διατροφής (Rao & Rao, 2007)

2.2 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι οργανικές ενώσεις που παράγονται από φυτά, μύκητες, βακτήρια, αλλά και ζώα και περιέχουν άτομα αζώτου, τα οποία τους προσδίδουν αλκαλικό χαρακτήρα. Μπορούν ακόμη να διαθέτουν και άτομα θείου, οξυγόνου και σπανιότερα φωσφόρου, χλωρίου και βρωμίου. Τα αλκαλοειδή χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική ποικιλομορφία. Οι πιο πρόσφατες κατηγοριοποιήσεις βασίζονται στον ανθρακικό σκελετό των μορίων, όπως για παράδειγμα της ισοκινολίνης, της πυριδίνης, της ινδόλης και άλλων, ή στις βιοχημικές πρόδρομες ενώσεις τους.

Το πρώτο αλκαλοειδές που απομονώθηκε ήταν η μορφίνη από την οπιούχο παπαρούνα το 1804. Έκτοτε έχουν διαπιστωθεί διάφορες φαρμακολογικές δράσεις με τις οποίες συνδέονται οι ουσίες αυτές. Για παράδειγμα, η κινίνη εμφανίζει ανθελονοσιακές ιδιότητες, η εφεδρίνη βοηθά στην καταπολέμηση του άσθματος και η μορφίνη αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα αναλγητικά. Επιπλέον, ορισμένες ουσίες περιορίζουν τις καρδιακές αρρυθμίες, ενώ άλλες παρουσιάζουν αντικαρκινική, αγγειοδιασταλτική, ή και αντιβακτηριακή δράση. Για τους λόγους αυτούς αρκετά αλκαλοειδή έχουν αξιοποιηθεί στην σύγχρονη ιατρική ως πρόδρομες ενώσεις για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Ωστόσο, πολλά αλκαλοειδή διακρίνονται και για την ικανότητα να ενεργούν και ως ψυχοτρόπες ή διεργετικές ενώσεις, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ψιλοκίνης, της κοκαΐνης και της καφεΐνης. Οι ενώσεις αυτές διαθέτουν χαρακτηριστική πικρή γεύση ενώ πολλές είναι ιδιαίτερα τοξικές τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο ακόμα και σε μικρές ποσότητες (Awuchi, 2019).

2.3 Φαινολικές Ενώσεις

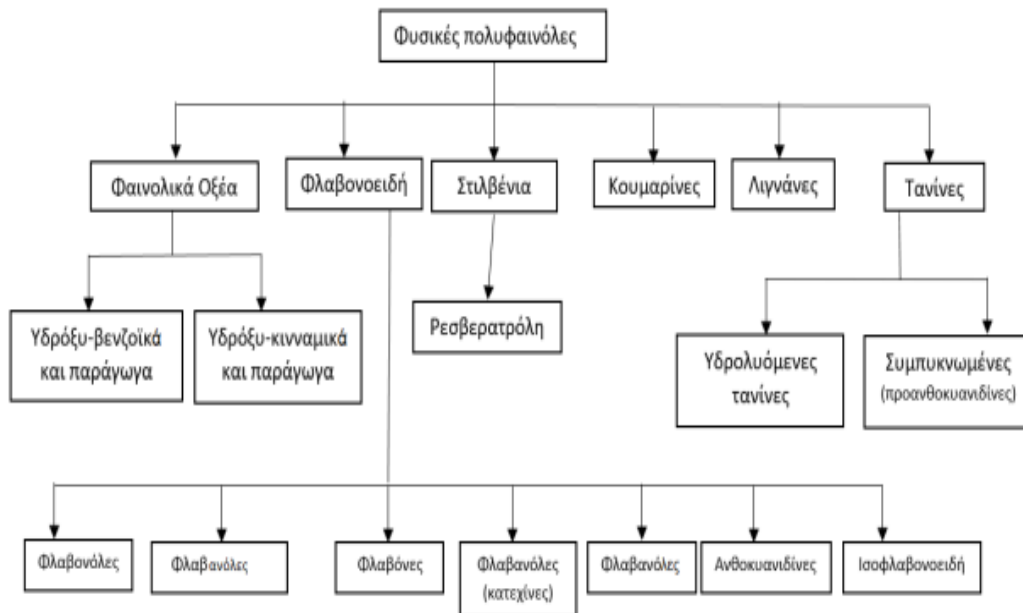
Στον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου, τα βιοδραστικά μόρια στα οποία αποδίδεται η πλειοψηφία των θεραπευτικών του δράσεων, είναι οι φαινολικές ενώσεις. Για αυτό και οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τον καρπό αφορούν στον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και άλλων υποκατηγοριών των φαινολικών ενώσεων, και αποσκοπούν στην βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης τους.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μόρια αποτελούμενα από έναν ή περισσότερους συζευγμένους αρωματικούς δακτυλίους που φέρουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Πρόκειται για κυρίαρχη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών με περισσότερες από 8.000 γνωστές δομές και διαφοροποιήσεις ως προς το μοριακό μέγεθος και την δράση. Παράγονται κυρίως μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος από την L-φαινυλαλανίνη και την L-τυροσίνη, ενώ ο ρόλος τους αφορά στην προσέλκυση εντόμων για την διευκόλυνση του επικονιασμού του φυτού αλλά και στην προστασία του από:

1. παθογόνους μικροοργανισμούς χάρη στην αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση
2. φυτοφάγα ζώα, μέσω των χρωματισμών που προσδίδουν σε αυτά καθιστώντας τα μη ορατά σε θηρευτές
3. την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες (Kumar & Goel, 2019).

Λόγω της προστατευτικής τους δράσης, οι φαινολικές ενώσεις εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών (καρπός, φύλλα, ρίζες) και κυρίως σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, στον οίνο, στο τσάι και στον καφέ. Η παρουσία τους σε ένα φυτό ή φρούτο προσδίδει πικρή γεύση, λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τις γλυκοπρωτεΐνες που περιέχονται στη σίελο. Η ποσότητα και ο τύπος των φαινολικών ενώσεων στα φυτικά προϊόντα εξαρτώνται από την χημική δομή και το μέγεθος των μορίων τους, το είδος του φυτού, τις μεθόδους εκχύλισης αλλά και την παρουσία παρεμποδιστικών μορίων, όπως χρωστικές, τερπένια και διάφορα λιπαρά (Alara et al., 2021).

Οι κυριότερες ομάδες φαινολικών ενώσεων είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες και τα στυλβένια, τα οποία διακρίνονται σε περαιτέρω υποκατηγορίες, όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 7.

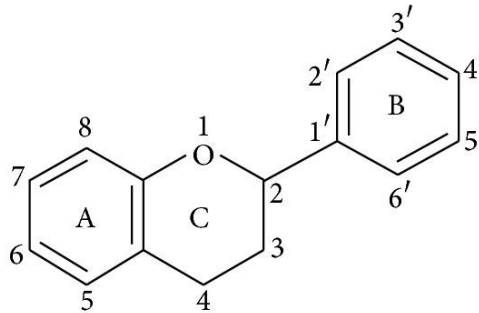


Εικόνα 7: Βασικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Shahidi & Ambigaipalan, 2015)

Στον καρπό του *Rosa canina L.*, τα συνηθέστερα απαντώμενα μόρια φαινολικών ενώσεων είναι η κατεχίνη, η κερσετίνη, το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το ελλαγικό οξύ, η απιγενίνη, το γαλλικό οξύ, η ρεσβερατρόλη, η καμπφερόλη και το p-κουμαρικό οξύ (Fetni et al., 2020). Τα προαναφερθέντα αποτελούν ορισμένα από τα πιο κοινά φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή των φυτών.

2.3.1 Φλαβονοειδή

Τα μόρια των φλαβονοειδών αποτελούνται από έναν μοριακό σκελετό 15 ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν την βασική χημική δομή. Η δομή αυτή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B συνδεδεμένους μεταξύ τους μέσω ενός οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου πυρανίου C, που παρεμβάλλεται μεταξύ των A και B, σχηματίζοντας μία γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα ($C_6-C_3-C_6$) (Kumar & Pandey, 2013). Η θέση του άνθρακα που συνδέει τον δακτύλιο B με τον C, ο βαθμός οξειδωσης και ο βαθμός ακορεστότητας του ετεροκυκλικού δακτυλίου C, καθορίζουν την υποκατηγορία στην οποία υπάγεται το εκάστοτε φλαβονοειδές μόριο. Τα συνηθέστερα φλαβονοειδή είναι η κερκετίνη, η κατεχίνη, η ναρινγενίνη και η κυανιδίνη (Alara et al., 2021).



Εικόνα 8: Βασική δομή φλαβονοειδών ενώσεων (Kumar & Pandey, 2013)

Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της δομής τους, τα φλαβονοειδή διακρίνονται στις παρακάτω 6 βασικές κατηγορίες (Alara et al., 2021):

- Φλαβονόλες: είναι μερικά από τα συνηθέστερα είδη φλαβονοειδών σε τρόφιμα, με κυρίαρχες ενώσεις την μυρικετίνη, την καμπφερόλη και την κερσετίνη.
- Ανθοκυανιδίνες: πρόκειται για την πιο μελετημένη κατηγορία φλαβονοειδών. Εμφανίζονται σε πληθώρα τροφίμων ως χρωστικές ουσίες, προσδίδοντας μωβ, κόκκινο, ροζ ή κυανό χρώμα. Αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης του ιόντος του φλαβυλίου.
- Φλαβανόνες: αποτελούν τα κύρια φλαβονοειδή που απαντώνται στα εσπεριδοειδή. Κατά την γλυκοζυλίωση τους προσδίδουν την πικρή γεύση που φέρουν οι φλοιοί των φρούτων αυτών.
- Φλαβόνες: γλυκοζίτες της απιγενίνης και της λουτεολίνης. Εντοπίζονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και σε περιορισμένα φυτά και τρόφιμα.
- Φλαβανόλες ή κατεχίνες: εμφανίζονται είτε ως κατεχίνες είτε ως προανθοκυανιδίνες. Προκύπτουν από τις πολλαπλές υδροξυλιώσεις του δακτυλίου A στις θέσεις 5 και 7 και του δακτυλίου B στις θέσεις 3', 4' και 5'. Στις φλαβανόλες η 3-θέση του C δακτυλίου συχνά εστεροποιείται με γαλλικό οξύ ή υδροξυλιώνεται. Κατεχίνες περιέχονται στο κόκκινο κρασί, το πράσινο τσάι, την σοκολάτα και σε φρούτα.
- Ισοφλαβόνες: δρουν ως φυτοοιστρογόνα, λόγω της συγγένειας που εμφανίζουν με υποδοχείς οιστρογόνων. Δεν αποτελούν στεροειδή, ενώ η βασική διαφορά μεταξύ των ισοφλαβονών και των υπόλοιπων φλαβονοειδών είναι η θέση του βενζολικού δακτυλίου B στο C3 του δακτυλίου C.

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται οι δομές ορισμένων από τα κυριότερα φλαβονοειδή των φυτικών οργανισμών, όπως η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η κερσετίνη, η καμπφερόλη, η ναρινγενίνη, η κατεχίνη και άλλες.

Ομάδα	Βασική δομή	Παραδείγματα		
Φλαβόνες				
Φλαβονόλες				
Φλαβανόνες				
Διύδρο- φλαβονόλες				
Ισοφλαβόνες				
Φλαβανόλες Κατεχίνες				

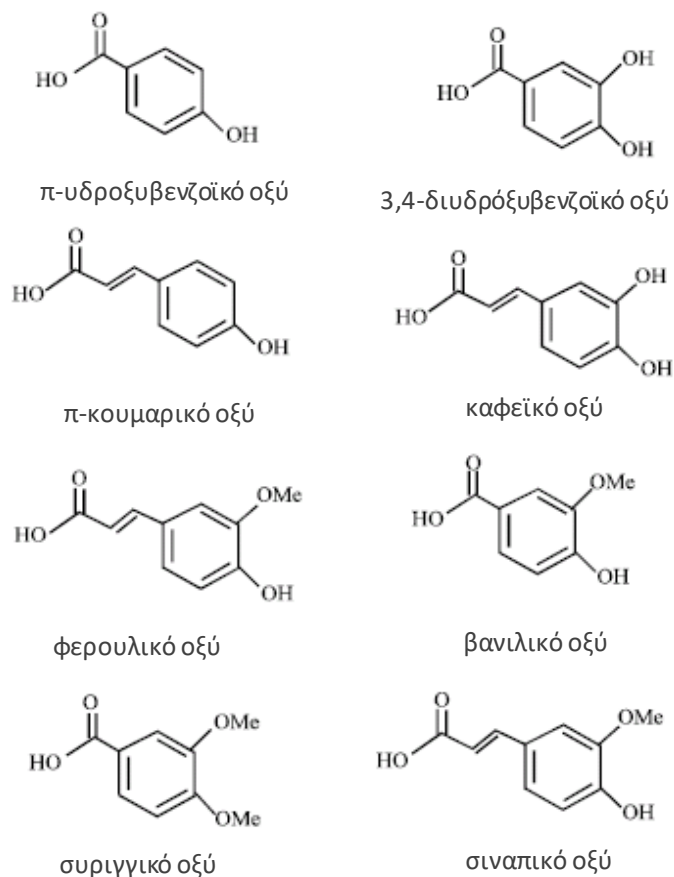
Εικόνα 9: Δομές των βασικών υποκατηγοριών των φλαβονοειδών και κυριότερες ενώσεις τους (Kumar & Pandey, 2013)

Τα μόρια των φλαβονοειδών στα τρόφιμα προσδίδουν χρώμα και γεύση, ενώ παρεμποδίζουν τον οξειδωτικό ταγγισμό των λιπαρών και προστατεύουν τις βιταμίνες και τα ένζυμα στα φυτικά κύτταρα. Έχουν δηλαδή προστατευτικό και ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Παρέχουν ηπατοπροστατευτική, αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση, μέσω της εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, ενώ εμφανίζουν αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Kumar & Pandey, 2013).

2.3.2 Φαινολικά Οξέα

Ως φαινολικά οξέα ορίζονται οι φαινολικές ενώσεις που φέρουν τουλάχιστον μία ομάδα καρβοξυλίου. Τέτοιου είδους ενώσεις περιέχονται στους φλοιούς και στους σπόρους των φρούτων, στα φύλλα των λαχανικών αλλά και στους καρπούς και στα φύλλα ορισμένων φυτών. Συνήθως εντοπίζονται με την μορφή αμιδίων, εστέρων και γλυκοζιτών και σπανιότερα σε ελεύθερη μορφή, ενώ διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες: τα παράγωγα του υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του υδροξυ-κινναμωμικού οξέος.

Τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν μια κοινή δομή C₆-C₁ και βρίσκονται σε διαλυτή μορφή, συζευγμένα με σάκχαρα ή οργανικά οξέα, και συχνά συνδεδεμένα με τμήματα λιγνίνης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Οι πιο κοινές ενώσεις είναι το π-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχοϊκό, το βανιλικό και το συριγγικό οξύ. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, εντοπίζονται στα τρόφιμα εστεροποιημένα με κινικό οξύ ή γλυκόζη. Σε μεγαλύτερη αφθονία βρίσκεται συνήθως το χλωρογενικό οξύ, που προκύπτει από τον συνδυασμό του καφεϊκού και του κινικού οξέος, ενώ τα συνηθέστερα είναι το φερουλικό, το καφεϊκό, το π-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ (Kumar & Goel, 2019).



Εικόνα 10: Χημικές δομές των κυριότερων φαινολικών οξέων

Όπως και τα φλαβονοειδή, έτσι και τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν πληθώρα ιδιοτήτων που τα καθιστούν αυξανόμενης ζήτησης για την χρήση τους σε συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά και φυτικά θεραπευτικά σκευάσματα. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή τους δράση, ενώ επίσης έχουν και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Η παρουσία τους στα φυτά εξυπηρετεί την άμυνα τους ενάντια σε ιούς, βακτήρια και μύκητες, την προστασία τους από την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου, αλλά και την κυτταρική τους ανάπτυξη (Kumar & Goel, 2019).

2.3.3 Τανίνες

Οι τανίνες αποτελούν πολυφαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, που εντοπίζονται σε διάφορα φυτά, καρπούς και φλοιούς δέντρων, όπως στον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου. Πρόκειται για ενώσεις, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να μετουσιώνουν μικροβιακά ένζυμα και να συνδέονται με μέταλλα και πρωτεΐνες, εμποδίζοντας την ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων και ενισχύοντας κατά αυτόν τον τρόπο την άμυνα των φυτών ενάντια σε μικροοργανισμούς, προστατεύοντας ταυτόχρονα το φυτό σε περιόδους ξηρασίας. Οι ενώσεις αυτές διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, στις συμπυκνωμένες τανίνες ή προανθοκυανιδίνες, οι οποίες αποτελούν ολιγομερή της φλαβαν-3-όλης, και προκύπτουν μέσω οξειδωτικής συμπύκνωσης φλαβονοειδών, και στις υδρολυόμενες τανίνες, οι οποίες αποτελούν ολιγομερή πολυφαινόλης, και προκύπτουν από την σύνδεση μορίων γαλλικού, μετα-διαγαλλικού και εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος με σακχάρα (Gurta & Pandey, 2020, Pizzi, 2021). Οι υδρολυόμενες τανίνες περιέχουν εστερικούς ή γλυκοζιτικούς δεσμούς και αποσυντίθενται εύκολα παρουσία οξέων, ενώ οι συμπυκνωμένες τανίνες διαθέτουν βενζολικό πυρήνα. Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι αυτές που φέρουν τις κύριες φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα την αντικαρκινική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη και ηπατοπροστατευτική δράση (Pizzi, 2021).

- Ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.* έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς το περιεχόμενο του σε βιοδραστικές ενώσεις, μέσω *in vivo* και *in vitro* ελέγχων, και έχει διαπιστωθεί η φαρμακολογική δράση που εμφανίζουν τα εκχυλίσματά του. Η ευεργετική δράση του καρπού, όχι μόνο στην πρόληψη αλλά και στην θεραπεία ενός διευρυμένου φάσματος ασθενειών, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, η παχυσαρκία, το Alzheimer και διάφορες λοιμώδεις καρδιαγγειακές, νεφρικές και ηπατικές παθήσεις (Moldovan et al., 2021), τον καθιστούν ενδιαφέρουσα πρώτη ύλη στη σύγχρονη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : Αντιοξειδωτική Δράση Βιοδραστικών Μορίων

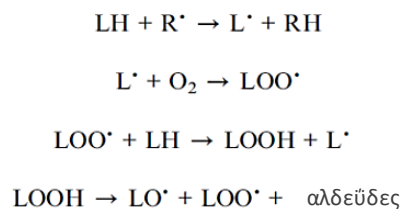
3.1 Ελεύθερες Ρίζες

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί αιτία για πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών, όπως ο καρκίνος, διάφορες καρδιαγγειακές και νευρολογικές παθήσεις και ασθένειες ανοσοανεπάρκειας, διότι αφορά στην οξείδωση πρωτεϊνών, ενζύμων, λιπιδίων αλλά και μορίων DNA. Συνήθως, το οξειδωτικό στρες προκύπτει ως αποτέλεσμα:

1. Της αύξησης της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)
2. Της ανεπάρκειας αντιοξειδωτικών χαμηλού μοριακού βάρους
3. Της αδρανοποίησης των ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτελούν ελεύθερες ρίζες, δηλαδή άτομα, μόρια ή και ιόντα τα οποία διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην στοιβάδα σθένους και χαρακτηρίζονται από υψηλή αστάθεια και δραστηριότητα (Flieger et al., 2021). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να συσσωρεύονται στον οργανισμό, ενώ δημιουργούνται από τις φυσιολογικές βιοχημικές αντιδράσεις του οργανισμού, και πολλαπλασιάζονται από την αυξημένη έκθεση σε ανθυγιεινό περιβάλλον και τα υψηλά επίπεδα ξενοβιοτικών στα τρόφιμα (Nimse & Pal, 2015). Τα δραστικά αυτά είδη μπορούν να ενεργούν στο περιβάλλον τους είτε ως οξειδωτικοί παράγοντες, λαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο, είτε ως αναγωγικοί παράγοντες προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο και αποτελούν συνήθως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αζώτου (RNS) ή και θείου (RSS) (Flieger et al., 2021).

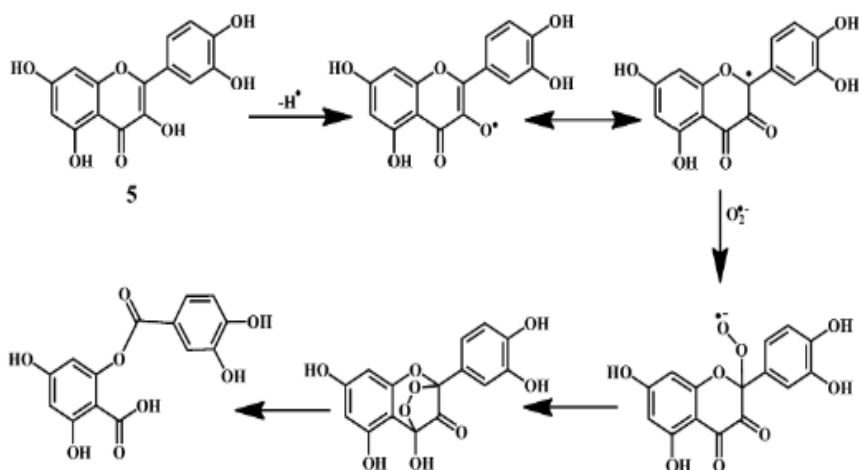
Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν πληθώρα ενώσεων και αντιδρούν με διάφορους μηχανισμούς. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται ο μηχανισμός λιπιδικής υπεροξείδωσης από μία ελεύθερη ρίζα R.



Εικόνα 11: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξείδωσης (Nimse & Pal, 2015)

3.2 Ο Ρόλος και η Δράση των Αντιοξειδωτικών Μορίων

Ως αντιοξειδωτικές ενώσεις ορίζονται αυτές που φέρουν την ιδιότητα να επιδρούν παρεμποδιστικά και ανασταλτικά στην οξείδωση διαφόρων ευοξειδωτων υποστρωμάτων, περιορίζοντας ή καταστέλλοντας τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και προστατεύοντας την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά μόρια είτε καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες, είτε τις μετατρέπουν σε λιγότερο δραστικές και επικίνδυνες μορφές τους, είτε απενεργοποιούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις τους. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την προσφορά ριζών υδρογόνου ή ηλεκτρονίων, επιδρώντας ως αναγωγικά. Η δράση των ενώσεων αυτών παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Nimse & Pal, 2015). Ένα παράδειγμα του μηχανισμού δράσης του φυσικού αντιοξειδωτικού κερσετίνη στην απενεργοποίηση του υπεροξειδικού ανιόντος παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12: Μηχανισμός απενεργοποίησης της ελεύθερης ρίζας του ανιόντος υπεροξειδίου από την κερσετίνη (φυσικό αντιοξειδωτικό) (Nimse & Pal, 2015)

Λόγω της προστατευτικής τους δράσης ενάντια στο οξειδωτικό στρες, τα αντιοξειδωτικά αποτελούν συστατικά συνεχούς αυξανόμενης ζήτησης τόσο σε τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής, όσο και σε προϊόντα καλλυντικής αλλά και φαρμακευτικής χρήσης.

3.3 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών Ενώσεων

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε τεχνητά και φυσικά. Τα τεχνητά αντιοξειδωτικά παράγονται μέσω χημικών διεργασιών και αξιοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων για την προστασία των προϊόντων από οξειδωτικά φαινόμενα

και συνεπώς ποιοτική υποβάθμιση. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα τεχνητά αντιοξειδωτικά είναι η τριτοταγής βουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) (Flieger et al., 2021).

Οι φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι κυρίως φυτικές και εντοπίζονται σε όλα τα μέρη του φυτού - στο ξύλο, στο φλοιό, στους μίσχους, στα φύλλα, στους καρπούς, στις ρίζες, στα άνθη, αλλά και τους σπόρους. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές ελεύθερων ριζών, ως συμπλοκοποιητές προσοξειδωτικών μετάλλων και ως κατασταλτικοί παράγοντες του σχηματισμού του οξυγόνου, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα και την ομαλή τους λειτουργία. Τα πιο κοινά φυσικά αντιοξειδωτικά είναι πολυφαινολικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή (φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, φλαβόνες, κατεχίνες, φλαβονόνες), τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος, οι κουμαρίνες, τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες και οι βιταμίνες (Flieger et al., 2021).

Από τα τέλη του 20^{ου} αιώνα, η χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών προσθέτων άρχισε να περιορίζεται λόγω της υποψίας τοξικών και καρκινογόνων επιδράσεων. Για τον λόγο αυτό η ανάγκη για φυσικά αντιοξειδωτικά αυξάνεται διαρκώς. Γενικά, τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι πολύπλοκα μόρια και εμφανίζουν πολλές δυσκολίες κατά τη σύνθεση τους, για αυτό και αποτελεσματικότερη και οικονομικότερη λύση αποτελεί η άντληση τους απευθείας από φυσικές πηγές (Jiménez et al., 2017).

Πέραν της παραπάνω ταξινόμησης, οι φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις διακρίνονται σε εξωγενείς και ενδογενείς. Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά υπάγονται οι βιταμίνες, οι πολυφαινολικές ενώσεις και τα καροτενοειδή. Πρόκειται για ουσίες που αντλούνται εξωγενώς από φυσικές πηγές, μέσω της διατροφής. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται βάσει του μηχανισμού δράσης τους σε ενζυμικά (αντιοξειδωτικά ένζυμα) και μη ενζυμικά (Flieger et al., 2021). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα δρουν διασπώντας και απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Μετατρέπουν επικίνδυνα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και στη συνέχεια σε νερό, μέσω μίας πολλαπλών σταδίων διαδικασίας παρουσία συμπαραγόντων όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο σίδηρος (Nimse & Pal, 2015). Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι είτε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που παράγονται στο σώμα, είτε πρωτεΐνες στις οποίες προσδένονται μεταλλικά στοιχεία, όπως η φερριτίνη (Flieger et al., 2021). Η δράση των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών αφορά στον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών, δηλαδή στην παρεμπόδιση του μηχανισμού μετάδοσης τους (Nimse & Pal, 2015).

Όταν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά καταπολεμούν και καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες δεν είναι εφικτό να προστατεύσουν τον οργανισμό και από τις δραστικές μορφές οξυγόνου. Σε αυτήν την περίπτωση απαιτείται η πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών για την ενίσχυση της άμυνας και τον περιορισμό των ROS (Flieger et al., 2021).

3.4 Βιταμίνη C

Το ασκορβικό οξύ, γνωστό και ως βιταμίνη C, είναι ένα υδρόφιλο μόριο με αντιοξειδωτική δράση. Το όνομα της ένωσης προέρχεται από το σκορβούτο, μια ασθένεια που οφείλεται στην έλλειψη της βιταμίνης και χαρακτηρίζεται από ευθραυστότητα των ιστών και αδυναμία επούλωσης. Λόγω των ιδιοτήτων της, η βιταμίνη C αποτελεί πολύτιμο συστατικό στη βιομηχανία των τροφίμων, των καλλυντικών, αλλά και των φαρμάκων. Στον οργανισμό εντοπίζεται είτε στην ανηγμένη του μορφή (ασκορβικό οξύ), είτε στην οξειδωμένη του μορφή (δεϋδροασκορβικό οξύ). Η βιταμίνη C λαμβάνεται μόνο μέσω της διατροφής (εξωγενές αντιοξειδωτικό) και επιτελεί ουσιαστικές μεταβολικές διαδικασίες στον ανθρώπινο οργανισμό (Caritá et al., 2020).

Πιο συγκεκριμένα, το μόριο της βιταμίνης C ανάγει ασταθείς μορφές οξυγόνου, προσφέροντας ηλεκτρόνια, και τελικά περιορίζει το οξειδωτικό στρες. Είναι γνωστό για την προστατευτική του δράση ενάντια στην υπεροξειδωση των λιπιδίων αλλά και την ικανότητα του να αναγεννά διαφορετικά αντιοξειδωτικά, όπως η άλφα-τοκοφερόλη, ή αλλιώς η βιταμίνη E. Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ ευνοεί την απορρόφηση του σιδήρου, του ασβεστίου αλλά και του φυλλικού οξέος, ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού και περιορίζοντας αλλεργικές αντιδράσεις. Η έλλειψη σε βιταμίνη C μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, καθώς είναι απαραίτητη ένωση για την σύνθεση των ανοσοσφαιρινών, για την παραγωγή της ιντερφερόνης και για την καταστολή της ιντερλευκίνης-18 (ρυθμιστικός παράγοντας στους κακοήθεις όγκους) (Caritá et al., 2020).

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα από τα κυρίαρχα βιοδραστικά συστατικά του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου. Πιο συγκεκριμένα, έχει προσδιοριστεί περίπου 4 φορές υψηλότερη συγκέντρωση βιταμίνης C στον καρπό του *Rosa canina L.* συγκριτικά με το πορτοκάλι. Ωστόσο, η συγκέντρωση αυτή εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως για παράδειγμα το υψόμετρο, το εκάστοτε είδος άγριου τριαντάφυλλου, την υγρασία, την τοποθεσία και την περίοδο συγκομιδής. Οι διακυμάνσεις της περιεκτικότητας της βιταμίνης C στα φυτά μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα του επιπέδου του οξυγόνου, της ηλιακής ακτινοβολίας, της θερμοκρασίας αλλά και των μεταβολών των ενδογενών ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών (Roman et al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Εκχύλιση Βιοδραστικών Ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, οι βιοδραστικές ενώσεις των φυτών, όπως οι φαινολικές ενώσεις, αποτελούν συστατικά αυξανόμενης ζήτησης τόσο στην βιομηχανία των φαρμάκων όσο και των καλλυντικών. Η συνήθης διεργασία που επιλέγεται για την άντληση των ενεργών αυτών συστατικών από τις πηγές τους είναι η εκχύλιση. Πρόκειται για μία διεργασία διαχωρισμού, μέσω της οποίας απομακρύνονται από τα φυτά διαλυτοί μεταβολίτες. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιείται χάρη στην αλληλεπίδραση της πρώτης ύλης με κάποιον διαλύτη. Ο διαλύτης εισχωρεί στην πρώτη ύλη, διαλυτοποιεί ορισμένα συστατικά της και τα απομακρύνει από την κύρια μάζα της, δημιουργώντας μία νέα υγρή φάση, την φάση του εκχυλίσματος (Chanioti et al., 2014). Η απόδοση της εξαρτάται τόσο από την διαλυτότητα όσο και από την σταθερότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών, ενώ επίσης σημαντικό ρόλο παίζουν και η μέθοδος εκχύλισης αλλά και οι συνθήκες της διεργασίας (Alirezalu et al., 2020).

Πριν την εκχύλιση, η πρώτη ύλη υφίσταται μία προκατεργασία, η οποία συνήθως αποτελείται από τα παρακάτω στάδια (da Silva et al., 2022):

1. Πλύση, για απομάκρυνση ακαθαρσιών και άλλων υλικών
2. Ξήρανση, για απομάκρυνση της υγρασίας και επίτευξη μεγαλύτερης διατηρησιμότητας του υλικού
3. Άλεση, για ομοιογένεια και αύξηση της επιφάνειας επαφής του υλικού με τον εκάστοτε διαλύτη

Αφότου ληφθεί το εκχύλισμα, ακολουθούν περαιτέρω διαδικασίες διαχωρισμού, προκειμένου να απομονωθούν οι επιθυμητές ενώσεις, και στη συνέχεια πραγματοποιείται η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως τελικό στόχο την επίτευξη των ακολούθων (Gligor et al., 2019):

1. Ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων με φαρμακευτικές ιδιότητες
2. Βελτίωση της εκλεκτικότητας των αναλυτικών μεθόδων ως προς τις επιθυμητές ενώσεις
3. Εύρεση μίας τελικής μεθόδου ανίχνευσης και διαχωρισμού, η οποία παραμένει συνεπής και αξιόπιστη, ανεξάρτητα από την προέλευση των χρησιμοποιούμενων δειγμάτων.

4.1 Εφαρμογή της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυτά στην ανάπτυξη καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων

Όπως αναφέρθηκε, η εκχύλιση είναι μία αποτελεσματική και εύκολη διεργασία για την παραλαβή των επιθυμητών συστατικών από φυτικές πρώτες ύλες. Για τον λόγο

αυτό, χρησιμοποιείται κατά κόρον στην παραγωγή καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά.

Η διαδικασία ανάπτυξης και παραγωγής προϊόντων από φυτικά εκχυλίσματα συνίσταται συνήθως από τα παρακάτω βήματα (Azmir et al., 2013):

1. Επιλογή του κατάλληλου είδους φυτού: ελέγχεται ένα σύνολο φυτών, τα οποία κατά παράδοση χρησιμοποιούνται στην φαρμακευτική, και επιλέγεται το κατάλληλο ανάλογα με το τελικό προϊόν-στόχο.
2. Εκτίμηση τοξικότητας και κινδύνου: το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την συλλογή δεδομένων σχετικά με την τοξικότητα αλλά και την εφαρμογή πρωτοκόλλων τοξικολογικής ανάλυσης.
3. Προετοιμασία του δείγματος για εκχύλιση και στοιχειακή ανάλυση: το δείγμα συλλέγεται, προετοιμάζεται σύμφωνα με την διαδικασία που αναλύθηκε ανωτέρω, και εκχυλίζεται με διαφορετικές μεθόδους ούτως ώστε να επιλεγεί εκείνη με την μέγιστη απόδοση και την υψηλότερη εκλεκτικότητα ως προς τα επιθυμητά ενεργά συστατικά. Επιπλέον πραγματοποιείται στοιχειακή ανάλυση της πρώτης ύλης.
4. Βιολογικός Έλεγχος: επιλέγεται ή αναπτύσσεται ένα πρωτόκολλο για έναν κατάλληλο βιολογικό έλεγχο και στην συνέχεια αναλύεται η *in-vitro* βιολογική δράση του εκχυλίσματος.
5. Απομόνωση ενεργών συστατικών: απομονώνονται και χαρακτηρίζονται οι βιοδραστικές ενώσεις, ενώ ελέγχεται η δράση τους παρουσία άλλων βιοενεργών συστατικών για την εκτίμηση ενδεχόμενης συνεργιστικής δράσης.
6. *In-vivo* ανάλυση: χρήση ζωικών μοντέλων για την ανάλυση της βιοδραστικότητας αλλά και την εκτίμηση της ασφάλειας και της τοξικότητας των ενώσεων σε ζωντανούς οργανισμούς. Εάν τα αποτελέσματα εγκριθούν, τότε πραγματοποιούνται μελέτες και σε ανθρώπους.
7. Εμπορική κυκλοφορία προϊόντος: το τελικό στάδιο προϋποθέτει την εύρεση της κατάλληλης δόσης των ενεργών συστατικών στο προϊόν, την ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας και την εύρεση βιώσιμων διεργασιών βιομηχανικής παραγωγής.

Βάσει των παραπάνω βημάτων, είναι εφικτή η αξιοποίηση φαρμακευτικών φυτών όπως το άγριο τριαντάφυλλο, η μέντα, η αλόη, το σκόρδο, η ρίγανη και το δεντρολίβανο, για τον εμπλουτισμό προϊόντων, τα οποία ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, ενεργούν ως αντιμικροβιακά, αντικαρκινικά ή και αντιφλεγμονώδη και προσφέρουν εναλλακτικές έναντι των συνθετικών φαρμάκων (Alirezalu et al., 2020). Επιπλέον, πολλές φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες αλλά και αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται συχνά και σε καλλυντικές κρέμες, αντηλιακά αλλά και μάσκες προσώπου και μαλλιών, καθώς παρουσιάζουν αντιγηραντικές, αναπλαστικές και ενυδατικές ιδιότητες.

4.2 Μέθοδοι Εκχύλισης

Η εκχύλιση αποτελεί μία από τις κυρίαρχες και πιο κρίσιμες διεργασίες στην παραγωγή και αξιοποίηση ενεργών συστατικών από φυτικά προϊόντα, ωστόσο η μέθοδος εκχύλισης που επιλέγεται κάθε φορά επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό τις βιοδραστικές ενώσεις που λαμβάνονται από το δείγμα, τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών συνήθως πραγματοποιούνται εκχυλίσεις σε διαφορετικές συνθήκες και με διαφορετικές μεθόδους (Jha & Sit, 2022). Οι μέθοδοι διακρίνονται σε συμβατικές και μη συμβατικές.

4.2.1 Συμβατική Εκχύλιση

Η συμβατική εκχύλιση πραγματοποιείται παρουσία οργανικών διαλυτών, ενώ απαιτεί μεγάλους χρόνους αντίδρασης και υψηλές θερμοκρασίες (da Silva et al., 2022). Η αποτελεσματικότητα μίας συμβατικής εκχύλισης εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, η οποία πραγματοποιείται με βασικότερο κριτήριο την πολικότητα των ενώσεων-στόχων. Ο διαλύτης θα πρέπει να εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τις εκχυλιζόμενες ουσίες, ενώ επίσης θα πρέπει να είναι χαμηλού κόστους, ώστε η διεργασία να είναι οικονομικά βιώσιμη. Τέλος, κατά την επιλογή του διαλύτη λαμβάνονται υπόψιν και οι παράγοντες της τοξικότητας αλλά και της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης που συνεπάγεται η χρήση του (Azmir et al., 2013). Για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών, όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα καρτενοειδή και τα αντιοξειδωτικά, και την ενσωμάτωσή τους σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα, απαιτούνται πολικοί διαλύτες.

Οι κυριότερες κατηγορίες συμβατικής εκχύλισης είναι οι εξής (Alirezalu et al., 2020):

- Εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid-liquid extraction, SLE)
- Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction, LLE)

Εκχύλιση στερεού-υγρού

Πρόκειται για την δημοφιλέστερη μέθοδο ανάκτησης βιοδραστικών ενώσεων από φυτά. Αφορά την ταχεία εκχύλιση ουσιών είτε από φρέσκια, είτε από αποξηραμένη στερεή πρώτη ύλη με χρήση οργανικών διαλυτών, όπως είναι η αιθανόλη, η ακετόνη και η μεθανόλη, ή με μείγματα οργανικών διαλυτών με το νερό (Alirezalu et al., 2020). Κατά την εκχύλιση στερεού-υγρού τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα είναι τα εξής (Chanioti et al., 2014):

1. Μεταφορά του διαλύτη από τον κύριο όγκο του δοχείου προς την επιφάνεια του εκχυλιζόμενου στερεού

2. Διάχυση του διαλύτη στο εσωτερικό του στερεού μέσω του πορώδους
3. Διάλυση των διαλυτών συστατικών του στερεού από τον διαλύτη
4. Μεταφορά του διαλύτη, και συνεπώς και των συστατικών που έχουν διαλυτοποιηθεί, από το εσωτερικό του στερεού προς την επιφάνεια του
5. Μεταφορά του εκχυλίσματος στον κύριο όγκο του υγρού

Γενικότερα, η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μία διεργασία, η οποία επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας τόσο στον κύριο όγκο του υγρού όσο και στην επιφάνεια και στην κύρια μάζα του στερεού.

Σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης στερεής ύλης από υγρή φάση εμφανίζουν (Alirezalu et al., 2020, Chanioti et al., 2014):

- α) το είδος του διαλύτη και οι ιδιότητες του: το ιξώδες, η πολικότητα και η εκλεκτικότητα του ως προς την διάλυση των επιθυμητών ενώσεων
- β) το μέγεθος των σωματιδίων του εκχυλιζόμενου στερεού: το μικρότερο μέγεθος κόκκων ευνοεί την διάχυση του διαλύτη εντός του στερεού και αυξάνει την επιφάνεια επαφής του με αυτό
- γ) η υγρασία του στερεού υλικού: παρουσία νερού επηρεάζονται συνήθως αρνητικά τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας της διεργασίας
- δ) η θερμοκρασία της εκχύλισης: συνήθως με την άνοδο της θερμοκρασίας αυξάνεται και η διαλυτότητα των συστατικών, ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί, καθώς ορισμένα συστατικά είναι θερμοευαίσθητα
- ε) ο ρυθμός ανάδευσης του μίγματος στερεού-υγρού: όσο αυξάνεται ο ρυθμός ανάδευσης τόσο αυξάνεται και η τυρβώδης διάχυση του διαλύτη στο στερεό, συνεπώς και ο ρυθμός της μεταφοράς μάζας
- στ) ο χρόνος εκχύλισης: γενικότερα οι μεγαλύτεροι χρόνοι επιτρέπουν την απομάκρυνση περισσότερων ουσιών, ωστόσο μετά το πέρας ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος η εκχύλιση περατώνεται και πλέον δεν εκχυλίζονται περισσότερα συστατικά, ενώ για πολύ μεγάλους χρόνους υπάρχει και το ενδεχόμενο καταστροφής ή οξειδωσης κάποιων επιθυμητών ενώσεων
- ζ) η αναλογία στερεού-διαλύτη: οι υψηλές συγκεντρώσεις στερεού συνήθως απαιτούν και μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, καθώς το σύστημα διαλύτη-στερεού είναι πιο ιξώδες και προκύπτουν παρεμποδίσεις του ρυθμού μεταφοράς μάζας

Γενικότερα, οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης αποτελούν τον πυρήνα για την βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης, ωστόσο γίνεται μία προσπάθεια βελτίωσης ή και αντικατάστασης τους λόγω της μεγάλης διάρκειας εκχύλισης, των μη φιλικών προς το περιβάλλον και συχνά τοξικών διαλυτών, της χαμηλής εκλεκτικότητας και συνεπώς αποτελεσματικότητας, του κινδύνου αποσύνθεσης

θερμοευαίσθητων ενώσεων, αλλά και της απαίτησης διαλυτών υψηλής καθαρότητας (Alirezalu et al., 2020, Gligor et al., 2019).

4.2.2 Μη Συμβατική Εκχύλιση

Οι μη συμβατικές εκχυλίσεις αποτελούν νέες, βελτιωμένες και φιλικότερες προς το περιβάλλον διεργασίες, καθώς αξιοποιούν μη τοξικούς διαλύτες και επιτυγχάνουν μικρότερους χρόνους εκχύλισης με αυξημένη απόδοση και χαμηλότερο ενεργειακό κόστος (da Silva et al., 2022).

Στις μη συμβατικές εκχυλίσεις ανήκουν οι παρακάτω (da Silva et al., 2022):

- Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted extraction, UAE)
- Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted extraction, MAE)
- Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού (Supercritical fluid extraction, SFE)
- Εκχύλιση Υγρού υπό Πίεση (Pressurized fluid extraction, PLE)
- Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Παλμικό Ηλεκτρικό Πεδίο (Electric field pulse assisted extraction (PEF)
- Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (Enzyme-assisted extraction, EAE)

4.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE)

4.3.1 Στοιχεία της μεθόδου

Τα βιοενεργά συστατικά των φυτών εντοπίζονται ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα, δηλαδή στον ενδοκυτταρικό χώρο, ο οποίος προστατεύεται από το κυτταρικό τοίχωμα, ενώ άλλα βρίσκονται εντός του κυτταρικού τοιχώματος, στο δίκτυο που σχηματίζουν η λιγνίνη, η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη, τα δομικά συστατικά του τοιχώματος. Η πρόσβαση ενός διαλύτη στα σημεία αυτά δεν είναι πάντα εύκολη, επομένως για την άντληση των συγκεκριμένων συστατικών επιστρατεύονται συχνά διαφορετικές μέθοδοι, όπως η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (EYE) (Azmir et al., 2013).

Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ικανότητα των ενζύμων (βιοκαταλύτες) να επιταχύνουν αντιδράσεις επιδεικνύοντας υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα τους και σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας. Ουσιαστικά, κατά την εφαρμογή της EYE, τα ένζυμα υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα σε ορισμένα σημεία, τα οποία καθορίζονται από το είδος του ενζύμου, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται ευκολότερα και ταχύτερα οι ενδοκυτταρικές ενώσεις (Cheng et al., 2015). Αναλυτικότερα, το ένζυμο προσδένεται σε συγκεκριμένες θέσεις του

κυτταρικού τοιχώματος και μεταβάλλει το σχήμα του με τέτοιο τρόπο ώστε το υπόστρωμα να συνδεθεί με το ενεργό του κέντρο, εξασφαλίζοντας τη μέγιστη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Όταν το ένζυμο αλλάξει και πάλι σχήμα, το υπόστρωμα αποσπάται από το κυτταρικό τοίχωμα, προκαλώντας την διάρρηξη του, και τα συστατικά που εσωκλείονται διαρρέουν από το κύτταρο (Nadar et al., 2018).

Τα συνήθη στάδια που ακολουθούνται κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση είναι τα εξής (da Silva et al., 2022):

1. Επιλογή και προετοιμασία της πρώτης ύλης
2. Ξήρανση, άλεση και δημιουργία ομοιογενούς πούδρας
3. Προσαρμογή βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας και pH και προσθήκη κατάλληλου διαλύτη
4. Προσθήκη ενζύμου και επώαση
5. Αδρανοποίηση ενζύμου ώστε να διακοπεί η εκχύλιση
6. Φυγοκέντρηση ή/και φίλτρανση
7. Συλλογή υδατικής φάσης εκχυλίσματος
8. Περαιτέρω επεξεργασία αναλόγως με το επιθυμητό τελικό προϊόν

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιομορίων αποτελεί μία μη συμβατική μέθοδο εκχύλισης που παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως (Gligor et al., 2019):

- υψηλή αποτελεσματικότητα λόγω αυξημένης εκλεκτικότητας
- μειωμένους χρόνους εκχύλισης
- ήπιες συνθήκες αντίδρασης
- χαμηλότερο ενεργειακό κόστος
- αυξημένη απόδοση διεργασίας
- απλοποιημένη διαδικασία επεξεργασίας
- δυνατότητα επεξεργασίας και αξιοποίησης όλων των τμημάτων του φυτού
- χρήση φιλικών προς το περιβάλλον και μη τοξικών διαλυτών

Όλα τα παραπάνω καθιστούν την EYE ιδιαίτερα δημοφιλή μέθοδο άντλησης βιοδραστικών συστατικών.

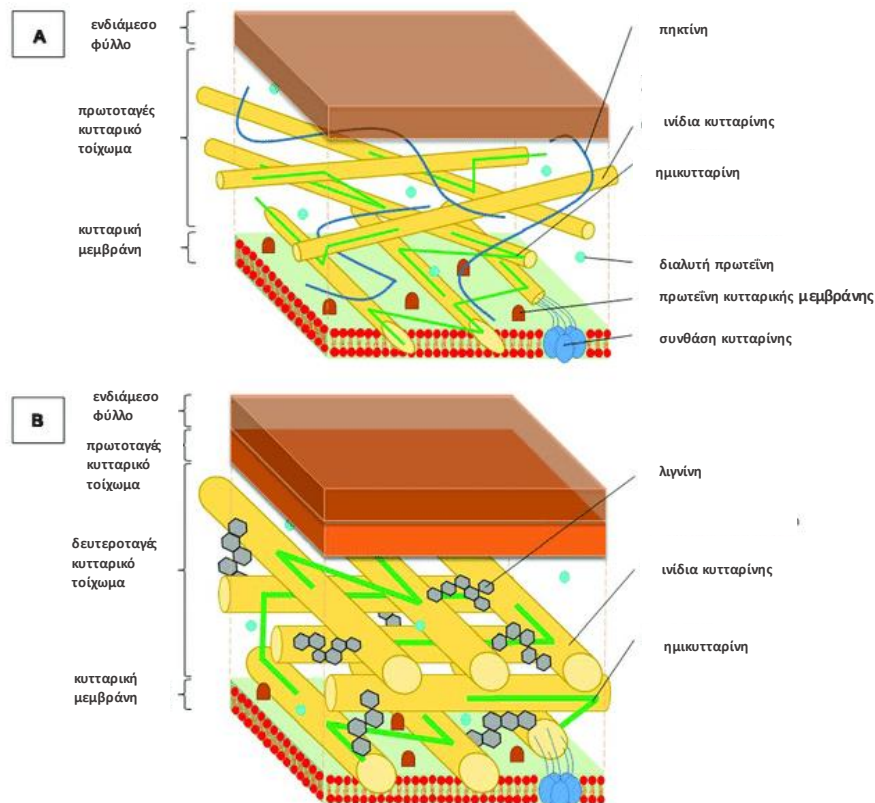
4.3.2 Ένζυμα και Κυτταρικό Τοίχωμα

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργούν ως βιολογικοί καταλύτες, επιταχύνουν δηλαδή ορισμένες αντιδράσεις. Για να γίνει κατανοητή η δράση των ενζύμων σε τέτοιου είδους διεργασίες θα πρέπει αρχικά να αναλυθεί η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, δηλαδή του υποστρώματός τους. Τα φυτικά κύτταρα περιβάλλονται από ένα άκαμπτο σύμπλεγμα (Εικόνα 13), το οποίο δομείται από τα παρακάτω συστατικά (Cheng et al., 2015, Gligor et al., 2019) :

- Κυτταρίνη: πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, του οποίου τα μονομερή συνδέονται με β -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς

- Ημικυτταρίνη: διακλαδωμένο πολυμερές πεντοζών, δομείται από διαφορετικά ετερογενή πολυμερή υδρογοναναθράκων, ομόλογα της κυτταρίνης
- Πηκτίνη: πολυσακχαρίτης του α-D-γαλακτουρονικού οξέος και της L-ραμνόζης-προσφέρει ακαμψία και συνοχή κατά την σύνδεση της με την κυτταρίνη
- Λιγνίνη: πολύπλοκο, αρωματικό πολυμερές, το οποίο δομείται από φαινολικά μονομερή, όπως η συναπλική αλκοόλη και η π-κουμαρυλική αλκοόλη-προσδίδει σταθερότητα και ακαμψία στο κυτταρικό τοίχωμα
- Πρωτεΐνες: απαραίτητα δομικά και λειτουργικά συστατικά

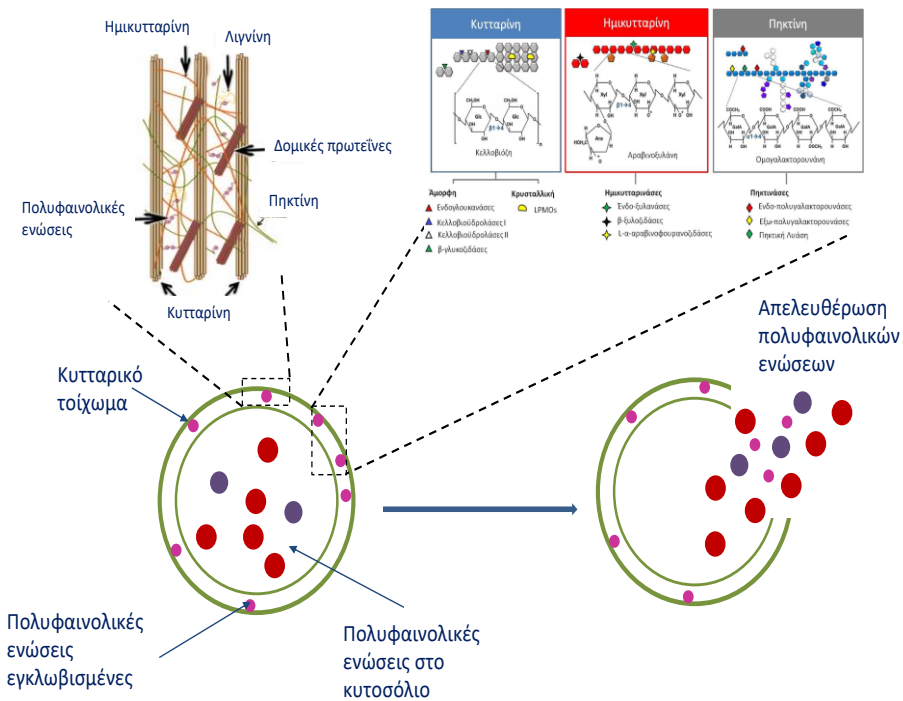
Τα παραπάνω πολυμερή αλληλεπιδρούν με κατάλληλο τρόπο και σχηματίζουν μία δομή, η οποία προσφέρει στο κύτταρο σταθερότητα, συγκρατώντας στο εσωτερικό του κυττάρου τα βιοδραστικά και γενικότερα όλα τα χρήσιμα για την επιβίωση του συστατικά (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων (Loix et al., 2017)

Η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη αποτελούν πολυσακχαρίτες, οι οποίοι εάν υδρολυθούν, δημιουργούνται κενά στο κυτταρικό τοίχωμα. Μέσω αυτών των κενών μπορούν να διαφύγουν μόρια από το εσωτερικό του κυττάρου, αλλά και του κυτταρικού τοιχώματος, προς τον εξωκυττάριο χώρο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το

μεγαλύτερο ποσοστό των φαινολικών ενώσεων ενός φυτικού κυττάρου εντοπίζεται μεταξύ των πολυσακχαριτών του ιστού του κυτταρικού τοιχώματος (Gligor et al., 2019). Η βασική αρχή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης πολυφαινολικών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά κύτταρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Βασική αρχή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες

Συνεπώς, στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση γίνεται χρήση ενζύμων, με σκοπό την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και την επιτάχυνση της άντλησης πολυφαινολικών ενώσεων. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό στη βιομηχανία ανήκουν σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες (Gligor et al., 2019):

- **Κυτταρινάσες:** καταλύουν την υδρόλυση της κυτταρίνης, διασπώντας τους β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα ένζυμα αυτά συνίστανται από διάφορες υπομονάδες με διαφορετικές δομές και λειτουργίες και συνεπώς ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες βάσει της λειτουργικότητάς τους, της κρυσταλλικής τους δομής ή της ικανότητάς τους να τέμνουν την κυτταρίνη στα άκρα ή στη μέση των πολυμερικών της μονάδων
- **Ημικυτταρινάσες:** πρόκειται κυρίως για υδρολάσες, εστεράσες και ξυλανάσες. Στο εμπόριο προσφέρονται συνήθως υπό μορφή ενζυμικών μειγμάτων, παρουσιάζοντας συνεργιστική δράση με άλλα ένζυμα
- **Πηκτινάσες:** υδρολύουν την πηκτίνη, περιλαμβάνουν υδρολάσες και λυάσες και εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων.

4.4 Κρίσιμες Παράμετροι της Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης Στερεού-Υγρού

Όπως αναλύθηκε και στην παράγραφο 4.2.1, η απόδοση της εκχύλισης είναι συνάρτηση πολλών κρίσιμων παραμέτρων. Η φύση και οι ιδιότητες του διαλύτη, η φύση του εκχυλιζόμενου υλικού, η διάρκεια της εκχύλισης, η θερμοκρασία, η κοκκομετρία του υλικού και η αναλογία διαλύτη-υποστρώματος μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα αλλά και την ποιότητα των συστατικών που θα εκχυλιστούν (Alara et al., 2021).

Οι κύριες παράμετροι που μελετώνται βιβλιογραφικά στις εκχυλίσεις στερεού-υγρού είναι οι εξής:

1. Θερμοκρασία και pH Εκχύλισης

Σε μία ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, η θερμοκρασία και το pH επιλέγονται βάσει του εύρους θερμοκρασίας και pH, στα οποία το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει μέγιστη δράση. Η μικρή αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως είναι ευνοϊκή για την εκχύλιση, καθώς συνεπάγεται αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας και μείωση του ιξώδους του διαλύτη. Ωστόσο, μεγαλύτερη αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή θερμοευαίσθητων βιοενεργών συστατικών, όπως η βιταμίνη C, αλλά και σε μετουσίωση, δηλαδή καταστροφή της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου. Όσον αφορά το pH, συνήθως προτιμάται όξινο περιβάλλον καθώς αυτό συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση των δεσμών υδρογόνου του κυτταρικού τοιχώματος, καθιστώντας το πιο εύκαμπτο και ευάλωτο στην υδρόλυση. Ένα ιδιαίτερα όξινο pH όμως μπορεί να οδηγήσει και αυτό σε ενζυμική μετουσίωση ή να επηρεάσει την εκλεκτικότητα του ενζύμου αρνητικά. Επιλέγονται λοιπόν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης για το εκάστοτε ένζυμο, ώστε να μην υπάρχει ο κίνδυνος καταστροφής της δομής του και συνεπώς απώλειας της λειτουργικότητάς του (Casas & Domínguez González, 2017, Gligor et al., 2019).

2. Χρόνος Εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης βελτιστοποιείται ως προς το εκάστοτε σύστημα εκχύλισης (διαλύτης, πρώτη ύλη, ενζυμικό σκεύασμα). Αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης, και επομένως επώασης του ενζύμου στο υπόστρωμα του, επιτυγχάνονται συνήθως και μεγαλύτερες αποδόσεις, ωστόσο οι αρκετά μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης μπορούν να οδηγήσουν σε υποβάθμιση των επιθυμητών συστατικών (Casas & Domínguez González, 2017).

3. Συγκέντρωση Στερεού

Η συγκέντρωση του εκχυλιζόμενου στερεού είναι μία ακόμα σημαντική παράμετρος της διεργασίας της εκχύλισης που χρήζει βελτιστοποίησης.

Διαμορφώνει όχι μόνο την απαιτούμενη ποσότητα του ενζύμου αλλά και τον χρόνο εκχύλισης. Τα πιο πυκνά διαλύματα απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας και υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου λόγω μειωμένης επιφάνειας επαφής διαλύτη-πρώτης ύλης και αυξημένου ιξώδους. Τα αραιότερα διαλύματα ωστόσο, απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών και συνεπώς μεγάλους όγκους αντίδρασης (Casas & Domínguez González, 2017).

4. Είδος Ενζυμικού Σκευάσματος

Είναι επιθυμητή η επιλογή ενζυμικού σκευάσματος που αποτελείται από μίγμα ενζύμων με συνεργιστική και συμπληρωματική δράση, ώστε να καθίσταται ευκολότερη η διάσπαση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Η επιλογή γίνεται βάσει του εκάστοτε υποστρώματος, δηλαδή της πρώτης ύλης (Gligor et al., 2019).

5. Ενζυμικό Φορτίο

Η συγκέντρωση του ενζύμου στο σύστημα της εκχύλισης αποτελεί παράμετρο άμεσα συνδεδεμένη με τον χρόνο εκχύλισης. Τα δύο μεγέθη είναι αντιστρόφως ανάλογα, ωστόσο η αύξηση της ενζυμικής συγκέντρωσης περιορίζεται και λόγω οικονομικών κριτηρίων, καθώς τα ένζυμα έχουν υψηλό κόστος. Συνήθως επιλέγονται συγκεντρώσεις 1-3% (Gligor et al., 2019).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

5.1.1 Όργανα και Συσκευές

Επωαστήρες

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

Ζυγοί

- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας Bell Engineering (Ιταλία), KernABS (Γερμανία)

Ξηραντήρες

- Ξηραντήρας WTEbinder 7200 Tutteigen (Γερμανία)

Πυριαντήριο

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

Συσκευές

- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μεγάλη Βρετανία)
- Θερμοστατούμενοι ηλεκτρικοί αναδευτήρες
- Θερμομίξερ Thermomixer comfort της εταιρίας Eppendorf

Φυγόκεντροι

- Φυγόκεντρος TJ-6 της Beckman Counter (ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)

Φωτόμετρα

- Φωτόμετρο S-22-UV-VIS Spectrophotometer (Γερμανία)
- Φωτόμετρο Hitachi UV 2000

5.1.2 Πρώτη Ύλη

Οι καρποί του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L* παρελήφθησαν σε ξηρή μορφή. Αρχικά διαχωρίστηκαν οι σπόροι από το περικάρπιο (Εικόνα 15) και στη συνέχεια το

ξηρό περικάρπιο τεμαχίστηκε ώστε να προκύψουν δείγματα με διαφορετικές κοκκομετρίες.



Εικόνα 15: Καρποί του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.*

5.1.3 Αντιδραστήρια- Τυποποιημένα Χημικά Παρασκευάσματα

Τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια και παρασκευάσματα προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma (Η.Π.Α), Aldrich και Novozymes.

- Μεθανόλη (MeOH) (absolute και 98% καθαρότητας)
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Γαλλικό οξύ
- Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2)
- Χλωριούχο Αργίλιο (AlCl_3)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)
- Κατεχίνη
- Ώξινο Φωσφορικό Νάτριο (Na_2HPO_4)
- Κιτρικό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- Ενζυμικό σκεύασμα *Viscoferm* της Novozymes
- Ενζυμικό σκεύασμα *Pectinex Ultra Color* της Novozymes
- Τρυπτόνη
- Άγαρ
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Εκχύλισμα μαγιάς

5.2 Μέθοδοι

5.2.1 Συμβατική Εκχύλιση

Η συμβατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με υδροαιθανολικό διάλυμα (αιθανόλη/νερό, 70/30 %/v) σε πρώτη ύλη κοκκομετρίας <500μm και στο εύρος συγκεντρώσεων 1-7% w/v. Η εκχύλιση έγινε σε θερμοκρασία 40 °C, για 1 ώρα, εντός θερμοστατούμενου αναδευτήρα (θερμομίξερ) και υπό ανάδευση 900 rpm. Με το πέρας της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) και την αντιοξειδωτική τους δράση.

5.2.2 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

Τα ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική μελέτη της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν το Viscoferm και το Pectinex Ultra Color της Novozymes. Τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Στοιχεία ενζυμικών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης

Εμπορικό Όνομα	Είδος Ενζύμου (κύρια δράση)	Συστατικά	Ενεργότητα	Συνθήκες βέλτιστης δράσης
Viscoferm (Novozymes)	Κυτταρινολυτικό	Ξυλανάσες, κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες	13 FPU/mL	T: 30-80 °C pH: 5.5-6.5
Pectinex Ultra Color (Novozymes)	Πηκτινολυτικό	Πηκτινάσες, ημικυτταρινάσες	616 U pectin lyase/mL	T: 50-60 °C pH: 3.0-6.5

Πραγματοποιήθηκαν πέντε πειραματικές σειρές, σε κάθε μία από τις οποίες μελετήθηκε σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης μία παράμετρος που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας. Η επιλογή της θερμοκρασίας και του pH της εκχύλισης βασίστηκε στις βέλτιστες συνθήκες του εκάστοτε ενζυμικού σκευάσματος. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος και όξινου φωσφορικού νατρίου 50 mM, με pH 5.5, ενώ ως θερμοκρασία εκχύλισης επιλέχθηκαν οι 50°C. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο επωαστήρα. Δειγματοληψίες έγιναν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (2500 rpm) και λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό, στο οποίο πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) και την αντιοξειδωτική του δράση

(IC₅₀). Επιπλέον, ελέγχθηκαν ποιοτικά οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του εκχυλίσματος της πρώτης ύλης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

Μελέτη Επίδρασης της Κοκκομετρίας του Στερεού

Εξετάστηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης για σταθερή συγκέντρωση στερεού 3% w/v και υπό σταθερό ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης του σκευάσματος Viscoferm. Το αποξηραμένο περικάρπιο του καρπού *Rosa canina L.* αλέστηκε και διήλθε από κόσκινο, έτσι ώστε να προκύψουν 3 διαφορετικά εύρη κοκκομετρίας: <500 μm, 500-600 μm και 800-1000 μm. Ο ρυθμός ανάδευσης των διαλυμάτων στον επωαστήρα ήταν 180 rpm και ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 48 h. Δειγματοληψίες έγιναν τις χρονικές στιγμές t=2, 4, 6, 24 και 48 h.

Μελέτη Επίδρασης Συγκέντρωσης του Στερεού

Εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης υπό σταθερό ενζυμικό φορτίο 2.5 FPU/g πρώτης ύλης του σκευάσματος Viscoferm. Χρησιμοποιήθηκε στερεό κοκκομετρίας <500 μm σε συγκεντρώσεις στερεού 1, 3, 5 και 7% w/v. Ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ήταν 180 rpm και ο συνολικός χρόνος εκχύλισης 48 h. Δείγματα λήφθηκαν τις χρονικές στιγμές t=2, 4, 6, 8, 24, 48 h.

Μελέτη Επίδρασης Υψηλών Συγκεντρώσεων του Στερεού

Μελετήθηκε η επίδραση υψηλών τιμών συγκέντρωσης της πρώτης ύλης υπό σταθερή συγκέντρωση ενζύμου 1% v/v Viscoferm. Για τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκε στερεό κοκκομετρίας <500 μm σε συγκεντρώσεις 20, 25, 33 και 50% w/v και υπό ενζυμικό φορτίο 0.65, 0.52, 0.39 και 0.26 FPU/g πρώτης ύλης αντίστοιχα. Ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ήταν 180 rpm και ο συνολικός χρόνος εκχύλισης 48 h. Δείγματα λήφθηκαν τις χρονικές στιγμές t=6, 24 και 48 h.

Μελέτη επίδρασης Συνεργιστικής Δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color

Διερευνήθηκε η συνεργιστική δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color για σταθερή συγκέντρωση στερεού 25% w/v και με στερεό κοκκομετρίας <500 μm. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν: α) ενζυμικές εκχυλίσεις στις οποίες προστέθηκε σε χρόνο t=0 h: 1% v/v Pectinex Ultra Color (24.64 U pectin lyase/g πρώτης ύλης) και σε χρόνο t=12h: 1% v/v Viscoferm (0.52 FPU/g πρώτης ύλης),

β) ενζυμικές εκχυλίσεις στις οποίες προστέθηκε σε χρόνο $t=0h$: 1% v/v Pectinex Ultra Color και σε χρόνο $t=24h$: 1% v/v Viscoferm. Ο ρυθμός ανάδευσης στον επωαστήρα ήταν 180 rpm, ενώ ο συνολικός χρόνος εκχύλισης 48 h. Δείγματα λήφθηκαν τις χρονικές στιγμές $t=6, 12, 24$ και 48 h. Σημειώνεται ότι οι δειγματοληψίες σε χρόνους $t=12h$ και $t=24h$, έγιναν προτού το Viscoferm προστεθεί στο 1^ο και στο 2^ο ζεύγος εκχυλίσεων αντίστοιχα.

Μελέτη της επίδρασης του Ενζυμικού Φορτίου κατά την Συνεργιστική Δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color

Ο Σύνθετος Πειραματικός Σχεδιασμός (Box-Wilson Central Composite Design) αποτελεί σχέδιο τριών επιπέδων γραμμένο ως παραγοντικό σχέδιο 3^k , που σημαίνει ότι λαμβάνονται υπόψη k παράγοντες, ο καθένας σε τρία επίπεδα, αναφερόμενα ως χαμηλά, ενδιάμεσα και υψηλά επίπεδα. Αυτά τα επίπεδα εκφράζονται αριθμητικά ως -1, 0 και +1 αντίστοιχα. Ο συγκεκριμένος πειραματικός σχεδιασμός εφαρμόστηκε προκειμένου να διερευνηθεί η συνεργιστική επίδραση των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, X_1 : ενζυμικό φορτίο σκευάσματος Viscoferm (% v/v) και X_2 : ενζυμικό φορτίο σκευάσματος Pectinex Ultra Color (% v/v), στις εξαρτημένες μεταβλητές Y_1 : ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), Y_2 : ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) και Y_3 : δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}).

Η σχέση μεταξύ των κωδικοποιημένων τιμών των μεταβλητών και των πραγματικών τιμών περιγράφεται από την Εξίσωση 1.

$$X_i = \frac{(A_i - A_0)}{\Delta A} \quad (1)$$

Όπου,

X_i : είναι η κωδικοποιημένη τιμή της μεταβλητής

A_i : η πραγματική τιμή της μεταβλητής

A_0 : η κεντρική τιμή της μεταβλητής A_i και

ΔA : το βήμα μεταβολής των τιμών της μεταβλητής.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές καθώς και τα επίπεδα τους (κωδικοποιημένες τιμές). Δημιουργήθηκε η μήτρα σχεδιασμού, η οποία περιλαμβάνει 9 διακριτά πειράματα (Πίνακας 3).

Πίνακας 2: Μεταβλητές και επίπεδα πειραματικού σχεδιασμού

Ανεξάρτητες Μεταβλητές	Κωδικοποίηση	Επίπεδα		
		-1	0	1
Viscoferm (% v/v)	X ₁	0.3	0.6	0.9
Pectinex Ultra Color (% v/v)	X ₂	0.3	0.6	0.9

Πίνακας 3: Μήτρα σχεδιασμού

A/A	X ₁	X ₂
1	+1	+1
2	+1	0
3	+1	-1
4	0	+1
5	0	0
6	0	-1
7	-1	+1
8	-1	0
9	-1	-1

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι πραγματικές τιμές των δύο εξαρτημένων μεταβλητών.

Πίνακας 4: Πραγματικές τιμές μεταβλητών

A/A	X ₁ (% v/v)	X ₂ (% v/v)
1	0.9	0.9
2	0.9	0.6
3	0.9	0.3
4	0.6	0.9
5	0.6	0.6
6	0.6	0.3
7	0.3	0.9
8	0.3	0.6
9	0.3	0.3

Οι τιμές των ενζυμικών φορτίων Viscoferm και Pectinex Ultra Color που αντιστοιχούν στα ποσοστά % v/v παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Τιμές ενζυμικού φορτίου Viscoferm και Pectinex

Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0.3	0.6	0.9
Ενζυμικό φορτίο Viscoferm (FPU/g πρώτης ύλης)	0.16	0.31	0.47
Ενζυμικό φορτίο Pectinex Ultra Color (U pectin lyase/g πρώτης ύλης)	7.39	14.78	22.18

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμομίξερ υπό ρυθμό ανάδευσης 1300 rpm με συγκέντρωση στερεού 25% w/v και για κοκκομετρία <500 μm. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης ήταν 24 h. Δειγματοληψίες έγιναν τις χρονικές στιγμές t=2, 6 και 24h.

Τα πειραματικά αποτελέσματα προσαρμόστηκαν είτε σε γραμμικό είτε σε δευτεροβάθμιο μοντέλο.

Το δευτεροβάθμιο μοντέλο στο οποίο προσαρμόστηκαν τα αποτελέσματα των πειραματισμών περιγράφεται από την Εξίσωση 2.

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

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

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 3.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (3)$$

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.).

5.3 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων

5.3.1 Ανάλυση σύστασης περικαρπίου του καρπού *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 (AOAC, 1990). Ειδικότερα, ο προσδιορισμός της υγρασίας έγινε μετά από ξήρανση του δείγματος για 16 ώρες σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα θερμοκρασίας 105°C. Ακολούθησε ψύξη του δείγματος σε ξηραντήρα και ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό. Η πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kjeldhal (Nx6.25) 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 (Sluiter et al., 2012).

Υδατικό αιώρημα της πρώτης ύλης συγκέντρωσης 5% w/v εκχυλίζεται για 60 λεπτά στους 50°C. Έπειτα πραγματοποιείται 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% w/v αζιδίου του νατρίου και 2.5 mg/g δείγματος του πρωτεολυτικού ενζύμου Pronase (τρυψίνη). Πραγματοποιείται επώαση σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα στους 40°C για 6 ώρες (Lawther et al., 1995). 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/g 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 πηκτίνης πραγματοποιείται με χρήση υδατικού διαλύματος 0.25% w/v οξαλικού αμμωνίου. Χρησιμοποιούνται 50 mL διαλύματος/g 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 (Phatak et al., 1988). 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 g 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 (Lawther et al., 1995). 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 υδατικό διάλυμα NaOH 10% w/v (20 mL διαλύματος/ g δείγματος) ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 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, προστίθεται θειικό 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 (Aravantinos-Zafiridis et al., 1994).

Προσδιορισμός σακχάρων

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

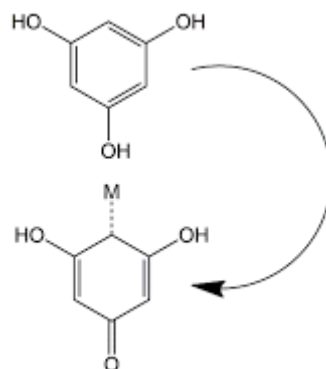
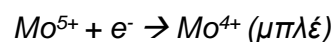
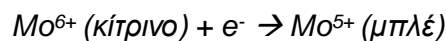
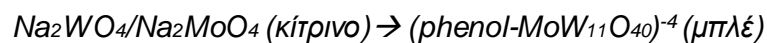
5.3.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Ενώσεων-Μέθοδος Folin Ciocalteu

5.3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η ανάλυση F-C είναι μία απλή και εύκολη μέθοδος, η οποία προτάθηκε το 1927 από τους Otto Folin και Vintila Ciocalteu για την εκτίμηση της τυροσίνης σε δείγματα με πρωτεΐνη μέσω της οξείδωσης της φαινόλης από ένα αντιδραστήριο με μόλυβδο και βολφράμιο. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση Folin-Ciocalteu (F-C) είναι μια οξειδοαναγωγική αντίδραση, που βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και μετρά την αναγωγική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι φωτοευαίσθητο, για αυτό και φυλάγεται σε σκουρόχρωμες φιάλες, ωστόσο εμφανίζει υψηλή σταθερότητα δεδομένης της απουσίας αναγωγικών παραγόντων. Αποτελείται από ένα οξειδωτικό μείγμα φωσφομολυβδαινικών και φωσφοβολφραμικών οξέων, στο οποίο το μολυβδαίνιο και το βολφράμιο βρίσκονται σε οξειδωτική κατάσταση +6. Κατά την αντίδραση τους με ένα αναγωγικό μέσο, το μολυβδαίνιο και το βολφράμιο προσλαμβάνουν ένα ηλεκτρόνιο και μεταβαίνουν σε οξειδωτική κατάσταση +5, σχηματίζοντας το μπλέ του μολυβδαίνιου και το μπλέ του βολφραμίου, κυανά δηλαδή σύμπλοκα, τα οποία προσδιορίζονται φωτομετρικά μετά το πέρας 1 ώρας από την έναρξη της αντίδρασης, εμφανίζοντας μέγιστη απορρόφηση σε μήκη κύματος $\lambda_{\max}=750-760\text{nm}$ (Agbor et al., 2014).

Οι βασικές αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής της μεθόδου Folin-Ciocalteu είναι οι εξής:

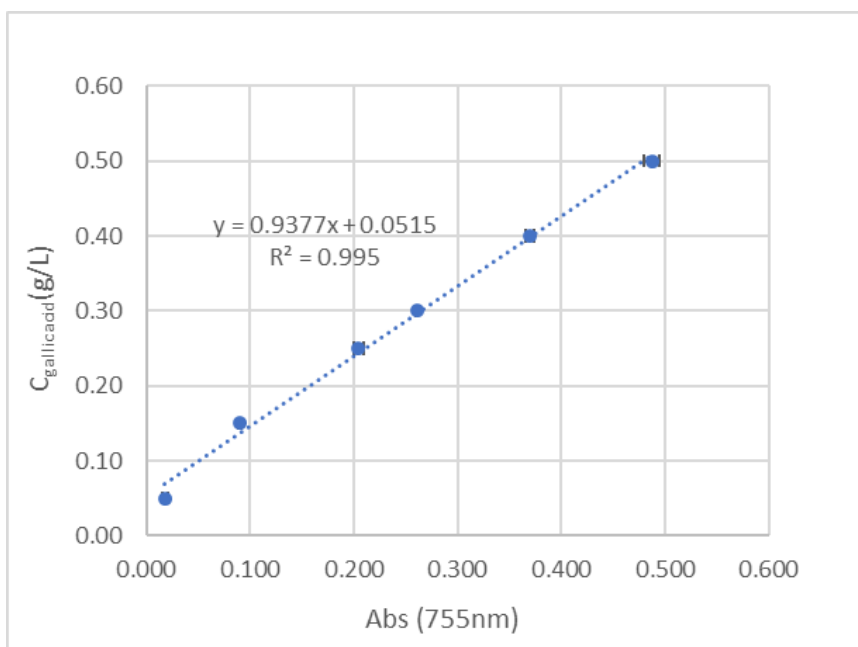


Εικόνα 16: Βασική αντίδραση οξείδωσης της φαινόλης στην μέθοδο F-C από ιόν μετάλλου M, όπου M: βολφράμιο ή μολυβδαίνιο

Η παραπάνω αντίδραση είναι αργή σε όξινο pH, ενώ επιταχύνεται σε βασικό. Για τον λόγο αυτό, η μέθοδος προϋποθέτει προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 , μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου Folin στο προς ανάλυση δείγμα. Πρόκειται για απλή και ευαίσθητη μέθοδο, ωστόσο στερείται υψηλής εκλεκτικότητας καθώς το αντιδραστήριο F-C αντιδρά και με άλλες αναγωγικές ουσίες, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, ασκορβικό οξύ και αρωματικές αμίνες. Η μέθοδος F-C στηρίζεται στην χρήση μίας πολυφαινόλης ως ουσία αναφοράς (συνήθως είναι το γαλλικό οξύ) για την ποσοτικοποίηση των συνολικών φαινολικών ενώσεων, και στον βέλτιστο συνδυασμό θερμοκρασίας και χρόνου αντίδρασης. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη εκτίμηση της περιεκτικότητας τροφίμων φυτικής προέλευσης και βιολογικών δειγμάτων σε φαινόλες/πολυφαινόλες (Agbor et al., 2014).

5.3.2.2 Πειραματική Διαδικασία

Για κάθε δείγμα εκχυλίσματος ολοκληρώθηκε η παρακάτω διαδικασία προσθήκης αντιδραστηρίων (Agbor et al., 2014). Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγονται 50μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος. Στην συνέχεια προστίθενται 3mL νερού και 0.25mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Μετά το πέρας 3 λεπτών ακολουθεί η προσθήκη 0.75mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και 0.95mL απιονισμένου νερού, ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 5mL. Σε κάθε βήμα προσθήκης αντιδραστήριου ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Αφού η διαδικασία ολοκληρωθεί τα δείγματα αφήνονται για 1 ώρα σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα μετριέται η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος με φωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος $\lambda=755\text{nm}$. Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκε και η καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC) για κάθε δείγμα υπολογίζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σύμφωνα με την Εξίσωση 4:

$$Total\ Phenolic\ Content(TPC)\left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{C_{gallic\ acid}\left(\frac{mg}{L}\right) \cdot V_{ext}(L) \cdot D}{m_{rosehip}(g)} \quad (4)$$

Όπου:

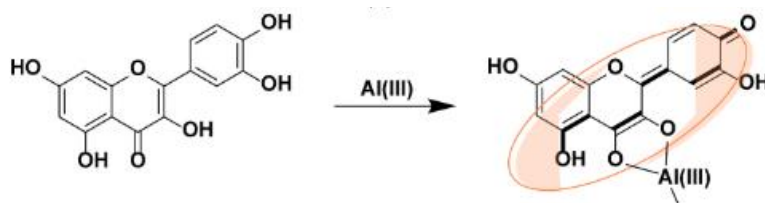
- $C_{gallic\ acid}$: η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 1)
- V_{ext} : ο όγκος του εκχυλίσματος
- D : συντελεστής αραίωσης
- $m_{rosehip}$: η μάζα του δείγματος πρώτης ύλης που εκχυλίστηκε

5.3.3 Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών-Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου

5.3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Στα φυτικά εκχυλίσματα, ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content, TFC), πραγματοποιείται κυρίως με τη φασματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου ($AlCl_3$). Το ιόν αργιλίου Al^{3+} παρουσιάζει υψηλή συγγένεια δέσμευσης με φλαβονοειδή λόγω των ομάδων υδροξυλίου και οξυγόνου που αυτά φέρουν. Πιο συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με τα μεταλλικά ιόντα του Al^{3+} ή $Al(III)$, τα οποία μπορούν να

προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος βέλτιστης απορρόφησης $\lambda_{\max}=510\text{nm}$.



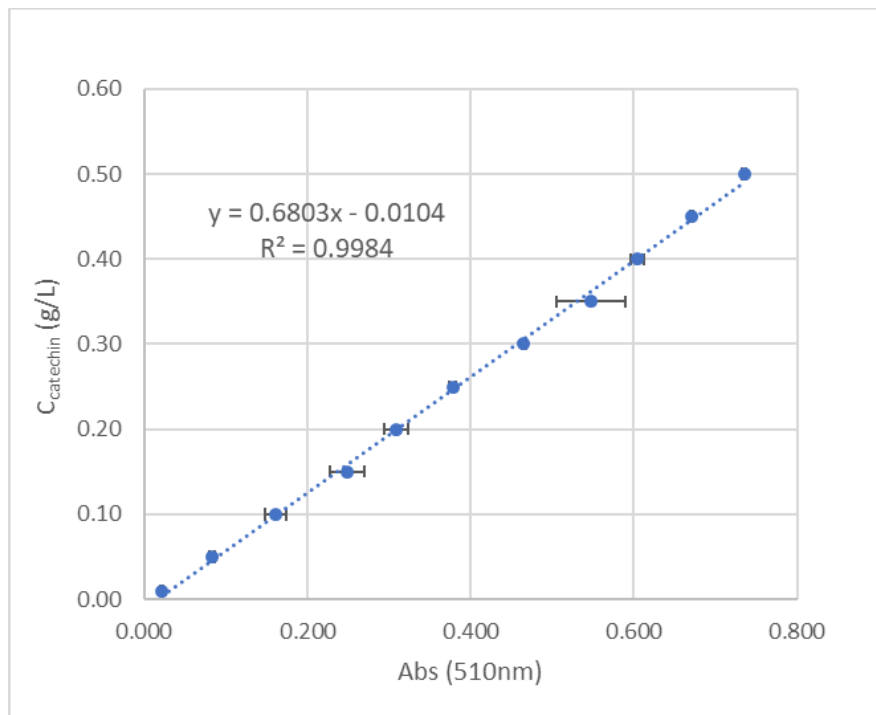
Εικόνα 17: Αντίδραση συμπλοκοποίησης της κερσετίνης (φλαβονοειδής) με το μεταλλικό ιόν Al^{3+} (Shraim et al., 2021)

Η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Christ και Muller το 1960 για τον προσδιορισμό παραγώγων φλαβονόλης σε φάρμακα. Πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον, προκειμένου να ευνοηθεί η αντίδραση, ενώ επίσης απαιτείται και η εισαγωγή νιτρώδους νατρίου (NaNO_2) πριν από την προσθήκη AlCl_3 . Το νιτρώδες νάτριο χρησιμεύει ως νιτρωτικός παράγοντας των δακτυλίων που φέρουν κατεχολική δομή (χαρακτηριστική των φλαβονοειδών), βελτιώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την εκλεκτικότητα της αντίδρασης προς τις φλαβονοειδείς ενώσεις. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ των φλαβονοειδών και του ιόντος αργιλίου φέρει αρχικά κίτρινο χρώμα, το οποίο μετατρέπεται σε ροζ-ερυθρό με την προσθήκη αλκαλικού διαλύματος για την εξασφάλιση βασικού περιβάλλοντος.

Η μέθοδος εξαρτάται από το pH, την θερμοκρασία, τον χρόνο αντίδρασης και τις αναλογίες των αντιδρώντων, ενώ σαν ουσία αναφοράς για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς και επομένως την ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών, επιλέγεται συνήθως η κατεχίνη (Shraim et al., 2021).

5.3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή έγινε με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου με ορισμένες τροποποιήσεις (Apokwuru et al, 2011). Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 100μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος και έπειτα 60μL υδατικού διαλύματος NaNO_2 5% w/v. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 6 λεπτά. Στη συνέχεια εισάγονται 120 μL υδατικού διαλύματος AlCl_3 10% w/v και μετά το πέρας 5 λεπτών 600 μL υδατικού διαλύματος NaOH 1M. Τέλος, στο διάλυμα συμπληρώνονται 120 μL απιονισμένου νερού, ώστε η συνολικός όγκος του δείγματος να είναι 1mL. Μετά από κάθε βήμα προσθήκης αντιδραστήριου ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex. Αφού η διαδικασία ολοκληρωθεί τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα μετρείται η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος με φωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος $\lambda=510\text{nm}$. Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκε και η καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης με τη μέθοδο Χλωριούχου Αργιλίου

Το ολικό περιεχόμενο των δειγμάτων σε φλαβονοειδή εκφρασμένο σε ισοδύναμα κατεχίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με την Εξίσωση 5:

$$Total\ Flavonoid\ Content\ (TFC)\ \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{C_{catechin}\left(\frac{mg}{L}\right) \cdot V_{ext}(L) \cdot D}{m_{rosehip}(g)} \quad (5)$$

Όπου:

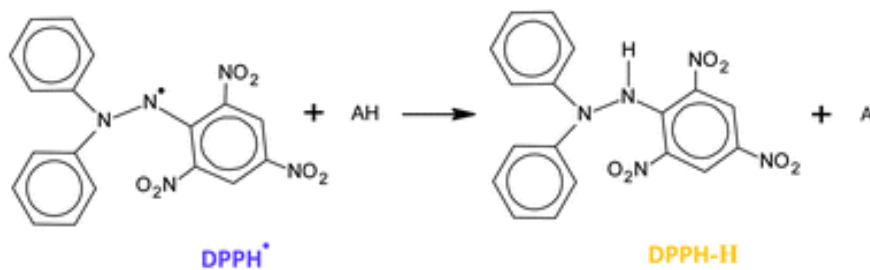
- $C_{catechin}$: η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 2)
- V_{ext} : ο όγκος του εκχυλίσματος
- D : συντελεστής αραίωσης
- $m_{rosehip}$: η μάζα του δείγματος πρώτης ύλης που εκχυλίστηκε

5.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

5.3.4.1 Αρχή της μεθόδου

Μία από τις κύριες μεθόδους προσδιορισμού αντιοξειδωτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών και φρούτων στηρίζεται στην αντίδραση των αντιοξειδωτικών αυτών με την ελεύθερη ρίζα 2,2-διφαινυλλο-1-πικρυδραζυλίου ή αλλιώς ρίζα DPPH σε μεθανολικό διάλυμα. Η ρίζα DPPH διαθέτει χαρακτηριστικό

έντονο ιώδες χρώμα και υψηλή σταθερότητα ωστόσο είναι φωτοευαίσθητη, για αυτό και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμες φιάλες. Ενεργεί ως δέκτης ηλεκτρονίου ή ρίζας υδρογόνου σχηματίζοντας την αδρανή δομή DPPH₂. Η ρίζα DPPH λόγω του έντονου ιώδους χρώματος της απορροφά σε μήκος κύματος 515nm. Καθώς αυτή ανάγεται και μετατρέπεται στην μη δραστική μορφή της, λαμβάνει ανοιχτό κίτρινο χρώμα, το οποίο απορροφά σε πολύ μικρότερο βαθμό στο χαρακτηριστικό μήκος κύματος.



Εικόνα 18: Αντίδραση απενεργοποίησης της ρίζας DPPH από αντιοξειδωτική ένωση AH

Η μέθοδος προσδιορισμού αναφέρθηκε πρώτα από τους Brand-Williams et al (1995) και πλέον έχει δεχτεί τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάζεται ένα μείγμα μεθανολικού διαλύματος της ρίζας DPPH και κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, το οποίο αναδεύεται έντονα και αφήνεται σε σκοτεινό μέρος, προκειμένου να προστατευτεί από το φως και να αντιδράσει. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση απενεργοποίησης της ρίζας, προσδιορίζεται φωτομετρικά ο αποχρωματισμός των μιγμάτων και υπολογίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος μέσω του υπολογισμού του δείκτη αναστολής IC₅₀. Πρόκειται για ένα μέγεθος που εκφράζει την ποσότητα του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την δέσμευση και αναστολή του 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

5.3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος των Brand-Williams et al. με μερικές τροποποιήσεις (Brand-Williams et al., 1995). Αρχικά, παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH. Ζυγίστηκαν 2.5mg DPPH και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία προστέθηκε μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα αναδεύτηκε για να διαλυθεί πλήρως το DPPH και να λάβει έντονο μωβ χρωματισμό. Τα δείγματα των εκχυλισμάτων του περικαρπίου αραιώθηκαν κατάλληλα με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, για κάθε ήδη αραιωμένο δείγμα (συγκέντρωσης C₀) πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι παρακάτω υδατικές αραιώσεις: 0.8C₀, 0.6C₀, 0.4C₀ και 0.2C₀. Μετά την παρασκευή των αραιώσεων αυτών, λήφθηκαν 0.1mL από κάθε συγκέντρωση: C₀, 0.8C₀, 0.6C₀, 0.4C₀ και 0.2C₀ και αναμείχθηκαν με 3,9 mL διαλύματος DPPH υπό ανάδευση σε μηχανήμα τύπου Vortex. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για

κάθε δείγμα εκχυλίσματος εις διπλούν. Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε και ένα τυφλό διάλυμα με 0.1mL απιονισμένου νερού και 3,9 mL διαλύματος DPPH. Τα δείγματα στη συνέχεια αφέθηκαν για επώαση σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αναγωγής της ρίζας. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε φωτόμετρο UV-Vis και σε μήκος κύματος $\lambda=515\text{nm}$.

Με βάση τις τιμές των απορροφήσεων του εκάστοτε δείγματος (για συγκεντρώσεις C_0 , $0.8C_0$, $0.6C_0$, $0.4C_0$ και $0.2C_0$) αλλά και του τυφλού, σχεδιάστηκε για κάθε δείγμα το γράφημα: % Αναστολή ρίζας DPPH-Συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος, όπου:

- % Αναστολή της ρίζας DPPH είναι το ποσοστό της αρχικής ρίζας DPPH που αντέδρασε και υπολογίζεται από την Εξίσωση 6:

$$\% \text{Αναστολή ρίζας DPPH} = \frac{Abs_{\text{τυφλό}} - Abs_{\text{δείγματος}}}{Abs_{\text{τυφλό}}} \cdot 100 \quad (6)$$

- Συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος είναι η συγκέντρωση του αρχικού εκχυλίσματος του εκάστοτε δείγματος στο εκάστοτε φωτομετρούμενο διάλυμα (μL εκχυλίσματος/L διαλύματος)

Για κάθε γράφημα έγινε προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας και από την κλίση της ευθείας και την αποτέμνουσα υπολογίστηκε ο δείκτης IC_{50} , που εκφράζει την συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος που απαιτείται σε ένα διάλυμα, ώστε να αντιδράσει το 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH. Ο δείκτης αναστολής IC_{50} υπολογίζεται από την Εξίσωση 7:

$$IC_{50} \left(\frac{\mu\text{L εκχυλίσματος}}{\text{L διαλύματος}} \right) = \frac{50-b}{a} \quad (7)$$

Όπου:

- α: κλίση της ευθείας του εκάστοτε διαγράμματος %Αναστολή ρίζας DPPH-Συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος
- b: σταθερός όρος της ευθείας του εκάστοτε διαγράμματος %Αναστολή ρίζας DPPH-Συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος

5.4 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων

5.4.1 Υγρό και στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *E. Coli*

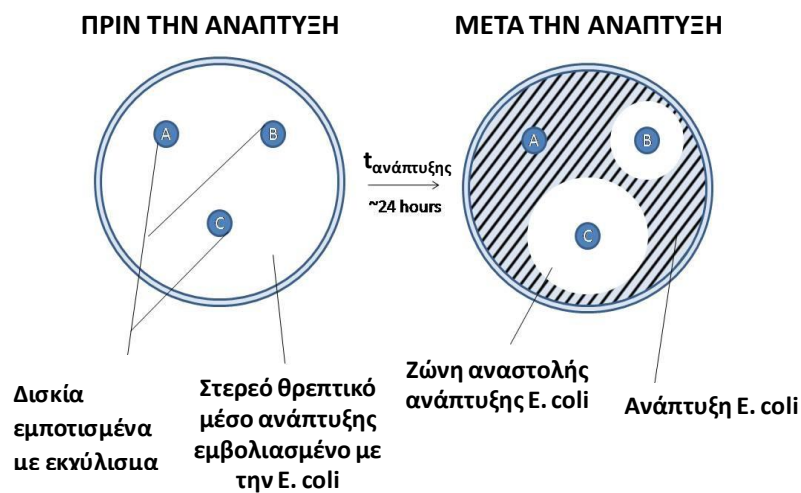
Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων ήταν το βακτήριο *E. coli*. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου ήταν το Luria-Bertan (LB) το οποίο αποτελείται από 1% w/v τρυπτόνη, 1% w/v NaCl και 0.5% w/v εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract) σε απιονισμένο νερό. Το 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 σε 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% w/v άγαρ. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C, 30 min). Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωση τρυβλίων. Κάθε τρυβλίο περιείχε περίπου 25 mL θρεπτικού μέσου.

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

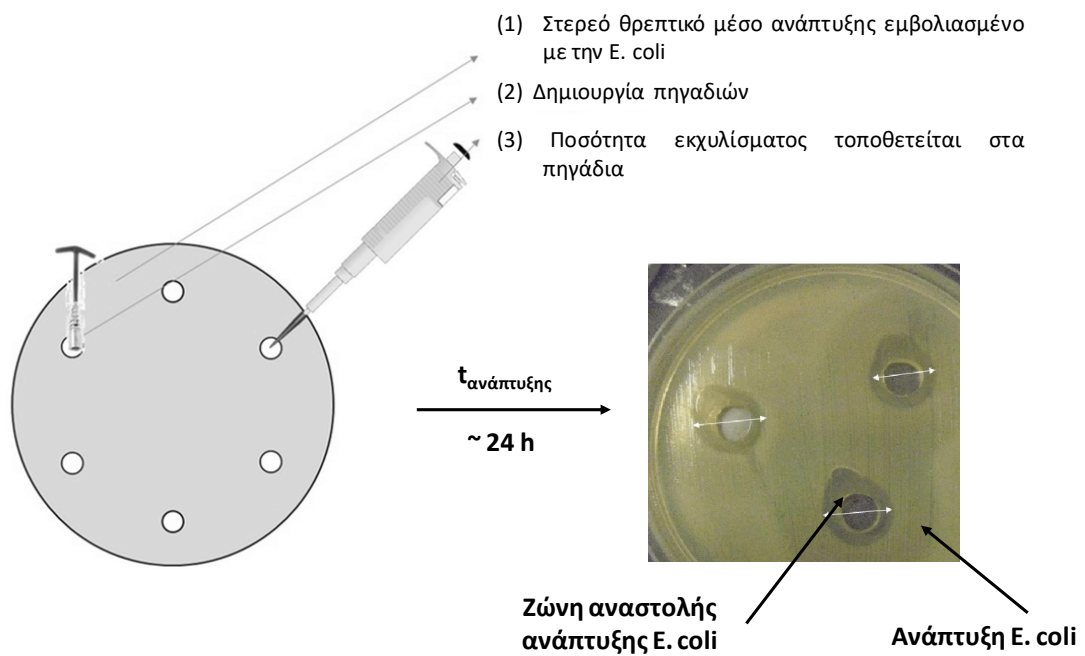
Χρησιμοποιήθηκαν δισκία διαμέτρου 5 mm από φίλτρο Whatman No.1. Τα δισκία εμποτίστηκαν με 250 μL δείγματος εκχυλισμάτων και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων τα οποία είχαν εμβολιαστεί με 100 μL υγρής καλλιέργειας *E. Coli* (συγκέντρωση κυττάρων: 10^6 κύτταρα/mL) (Akin & Saki, 2019). Τα τρυβλία επώζονται για 24 ώρες στους 37°C και παρατηρείται εάν εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Μέθοδος διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method)

5.4.3 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 επώζονται για 24 ώρες στους 37°C και παρατηρείται εάν εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Μέθοδος διάχυσης πηγαδιού (Well Diffusion Method)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: Αποτελέσματα & Συζήτηση

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

Η σύσταση του περικαρπίου του καρπού της *Rosa canina* L. παρουσιάζεται στον Πίνακα 6. Η υγρασία της πρώτης ύλης προσδιορίστηκε στο $6.7 \pm 0.3\%$ w/w. Επιπλέον, δεν ανιχνεύτηκε άμυλο στην πρώτη ύλη.

Πίνακας 6: Σύσταση περικαρπίου του καρπού της *Rosa canina* L.

Συστατικό	Περιεκτικότητα (% w/w, 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 ανιχνεύτηκαν 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. Οι Oghyanov et al., (2022) αναφέρουν ότι η γλυκόζη και φρουκτόζη είναι τα κύρια ελεύθερα σάκχαρα (80% του συνόλου των ελεύθερων σακχάρων) που ανιχνεύτηκαν στους καρπούς της *R. canina* L. (Σμόλιαν, οροσειρά Ροδόπης, Βουλγαρία), ενώ σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύτηκαν η γαλακτόζη και η ξυλόζη.

Βιβλιογραφικά, η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη των καρπών άγριου τριαντάφυλλου διαφόρων ποικιλιών και από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές κυμαίνεται από 2.1% έως 9.7% (Oghyanov et al., 2018, Oghyanov et al., 2022), ενώ το περιεχόμενο σε λιπαρά βρίσκεται στο εύρος 0.7-5.4% (Oghyanov et al., 2018, Fan et al., 2014, Kizil et al., 2018, Demir & Ozcan, 2001).

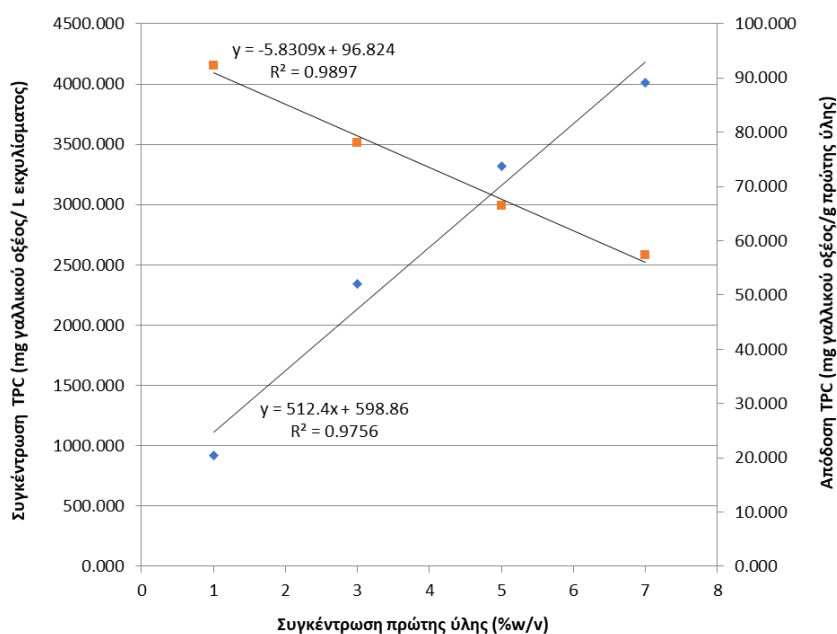
Το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη κυμαίνεται μεταξύ 2.3%-8.45% (Oghyanov et al., 2018, Demir & Ozcan, 2001). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, τις κλιματικές συνθήκες και συσχετίζεται ακόμα και με το υψόμετρο στο οποίο αναπτύσσονται/φύονται τα φυτά (Oghyanov et al., 2018). Τέλος, η περιεχόμενη πηκτίνη εκφρασμένη ως ουρονικά οξέα βρίσκεται στο εύρος 9.6% - 10.5% (Oghyanov et al., 2018, Oghyanov et al., 2022). Γενικά οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύσταση των καρπών της *R. canina* L. αποδίδονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες (περιοχή που φύεται το φυτό) καθώς και στην περίοδο συγκομιδής και τις συνθήκες αποθήκευσης.

6.2 Συμβατική Εκχύλιση

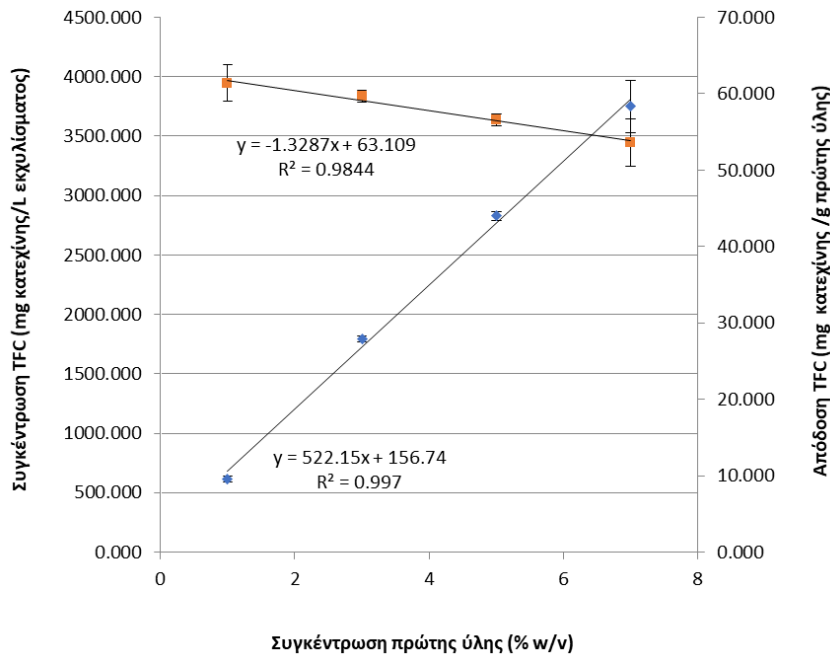
Τα αποτελέσματα της απόδοσης της συμβατικής εκχύλισης σε TPC και TFC παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 και στα Διαγράμματα 3 και 4. Επιπλέον, οι συντελεστές αναστολής IC_{50} , που προέκυψαν από τις εξισώσεις των γραφημάτων του Διαγράμματος 5, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 7: Συγκέντρωση και απόδοση σε TPC και TFC κατά την συμβατική εκχύλιση για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

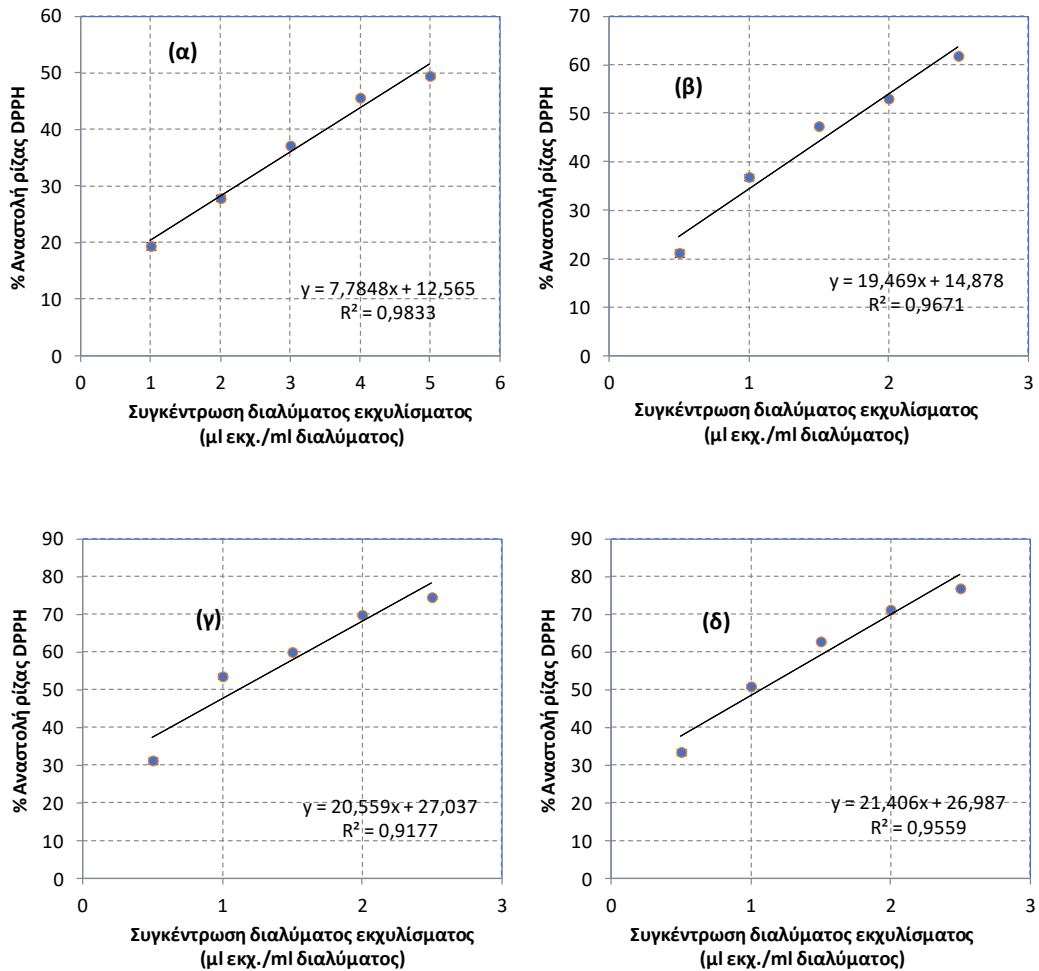
Συγκέντρωση στερεού (% w/v)	Απόδοση TPC, mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης (Συγκέντρωση TPC, mg γαλλικού οξέος/L εκχυλίσματος)	Απόδοση TFC, mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης (Συγκέντρωση TFC, mg κατεχίνης/L εκχυλίσματος)
1	92.3 ± 1.3 (923.3 ± 13.3)	61.3 ± 2.4 (613.7 ± 24.1)
3	78.0 ± 0.2 (2339.0 ± 6.6)	59.7 ± 0.8 (1790.6 ± 24.1)
5	66.4 ± 0.0 (3318.8 ± 0.0)	56.6 ± 0.8 (2828.1 ± 34.5)
7	57.3 ± 0.6 (4012.7 ± 39.8)	53.6 ± 3.1 (3748.9 ± 216.5)



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της συγκέντρωσης και απόδοσης των TPC συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης



Διάγραμμα 4: Μεταβολή της συγκέντρωσης και απόδοσης των TFC συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v και (δ) 7% w/v και για χρόνο επώασης 30 min.

Πίνακας 8: Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων συμβατικής εκχύλισης για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Συγκέντρωση στερεού (% w/v)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)
1	4.80 ± 0.00
3	1.80 ± 0.00
5	1.12 ± 0.01
7	1.07 ± 0.01

Όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 7 αλλά και από τα Διαγράμματα 3 και 4, με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης στο σύστημα εκχύλισης η απόδοση (mg εκχυλιζόμενης ουσίας/ g πρώτης ύλης) εμφανίζει μειούμενη γραμμική τάση, ενώ η συγκέντρωση (mg εκχυλιζόμενης ουσίας/ L εκχυλίσματος) αυξητική γραμμική τάση. Αυτό παρατηρείται τόσο στην περίπτωση των φαινολικών ενώσεων όσο και των φλαβονοειδών. Επιπλέον, ίδια τάση παρουσιάζει και η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (Πίνακας 8), καθώς οι συντελεστές αναστολής της ρίζας DPPH μειώνονται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλιζόμενου στερεού. Αυτό συμβαίνει διότι σε ένα σύστημα εκχύλισης με υψηλότερη συγκέντρωση πρώτης ύλης, διατίθεται και απομακρύνεται μεγαλύτερη συνολική ποσότητα εκχυλιζόμενων ουσιών (άρα αναμένεται μεγαλύτερη συγκέντρωση). Ωστόσο λόγω αυτού, η βαθμίδα συγκέντρωσης της εκάστοτε εκχυλιζόμενης ουσίας μεταξύ στερεής πρώτης ύλης και υγρού όγκου είναι μικρότερη, συνεπώς ανά μονάδα μάζας στερεού εκχυλίζονται λιγότερες ουσίες (άρα αναμένεται μικρότερη απόδοση) (Goula,2013).

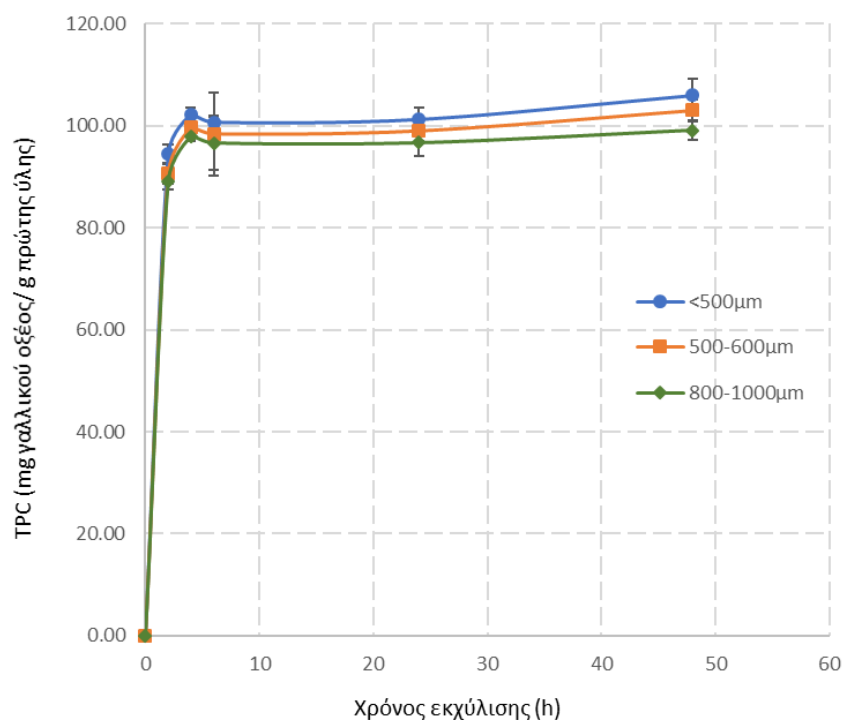
6.3 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE)

6.3.1 Μελέτη Επίδρασης της Κοκκομετρίας του Στερεού

Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε σταθερή συγκέντρωση στερεού 3%^{w/v} με ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης από το σκεύασμα Viscoferm για κοκκομετρίες στερεού στα εύρη: <500, 500-600, 800-1000μm. Δειγματοληψίες έγιναν σε χρόνους t=2, 4, 6, 24 και 48h. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την απόδοση σε TPC (Διαγράμματα 6 και 7), την απόδοση σε TFC (Διαγράμματα 8 και 9) και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Διάγραμμα 10, Πίνακας 9).

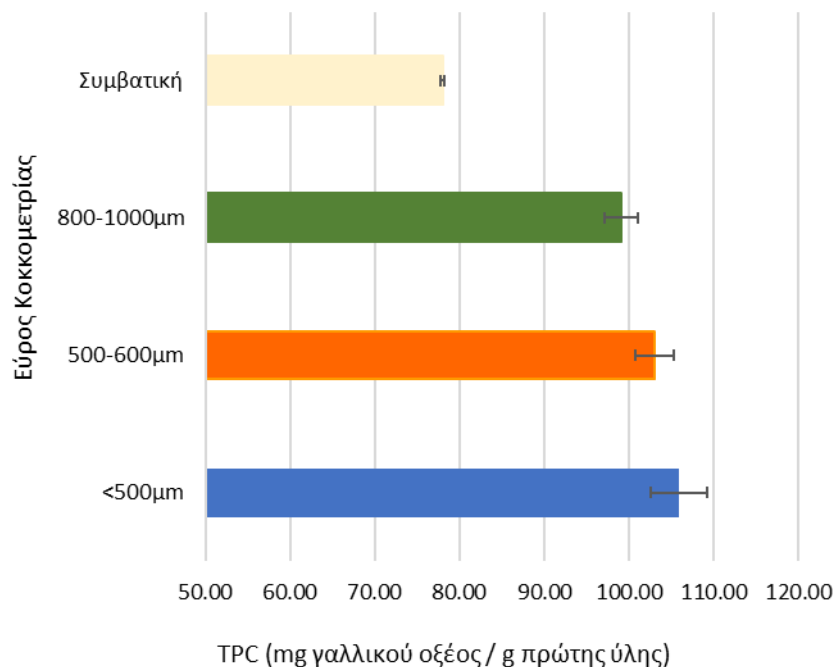
6.3.1.1 Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης σε TPC για κάθε εξετασθείσα συνθήκη εκχύλισης.



Διάγραμμα 6: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας

Αρχικά, παρατηρείται ανοδική τάση των τιμών TPC μέχρι μία οριακή χρονικά στιγμή και έπειτα σταθεροποίηση τους (Διάγραμμα 6). Πρακτικά σε όλα τα συστήματα, ο χρόνος που απαιτείται ώστε να απομακρυνθεί από την πρώτη ύλη το μεγαλύτερο ποσοστό των TPC είναι 4 έως 6 ώρες. Συνεπώς, όσον αφορά στα συγκεκριμένα εύρη κοκκομετρίας που εξετάστηκαν, το μέγεθος των κόκκων του στερεού δεν επηρεάζει σημαντικά την χρονική διάρκεια που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εκχύλισης. Γενικότερα, οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης εμφανίζουν αυξημένες αποδόσεις, καθώς επιτρέπουν αφενός στο διαλύτη να διεισδύσει βαθύτερα στους πόρους της πρώτης ύλης και αφετέρου στο ένζυμο να υδρολύσει σε μεγαλύτερο βαθμό το υπόστρωμα του (Huynh et al., 2014). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι οι αυξήσεις που παρατηρούνται μετά τις 6 ώρες εκχύλισης είναι σχετικά μικρές, της τάξης του 2-5%. Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για τα εύρη κοκκομετρίας που εξετάστηκαν καθώς και η αντίστοιχη τιμή για την συμβατική εκχύλιση.



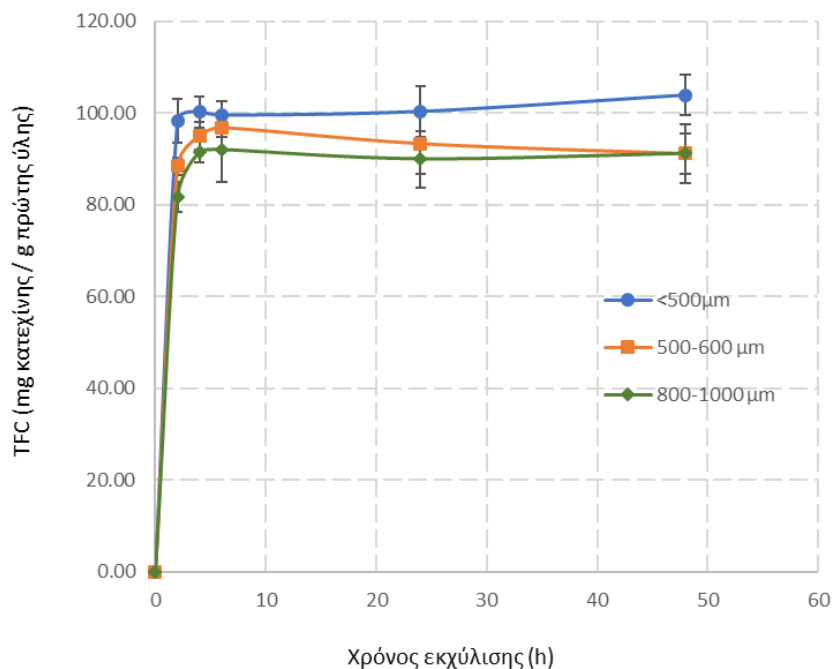
Διάγραμμα 7: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας

Η απόδοση TPC των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 99.2-105.9 mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται και στα Διαγράμματα 6 και 7, μέγιστη απόδοση σε φαινολικές ενώσεις παρουσίασε το εκχύλισμα στερεού κοκκομετρίας <500 µm, ενώ ελάχιστη το εκχύλισμα στερεού κοκκομετρίας 800-1000µm.

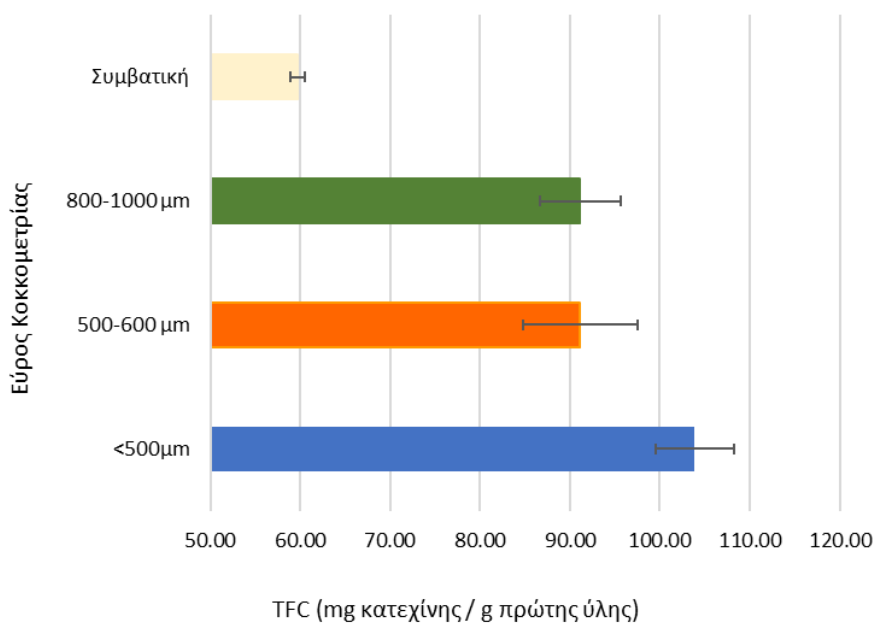
Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αύξησε την απόδοση TPC της εκχύλισης κατά περίπου 35%.

6.3.1.2 Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης σε TFC για κάθε εξετασθείσα συνθήκη εκχύλισης. Βάσει του Διαγράμματος 8, η εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων ολοκληρώνεται πρακτικά σε χρονική διάρκεια 4 έως 6 ωρών. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος στερεού κοκκομετρίας 500-600 µm, παρουσιάζεται μία μικρή μείωση της απόδοσης σε TFC μέχρι το πέρας της εκχύλισης, ενώ στην περίπτωση του στερεού κοκκομετρίας <500µm παρατηρείται μία μικρή αύξηση. Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων για κάθε εξετασθέν εύρος κοκκομετρίας του εκχυλιζόμενου στερεού καθώς και η αντίστοιχη τιμή για την συμβατική εκχύλιση.



Διάγραμμα 8: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας



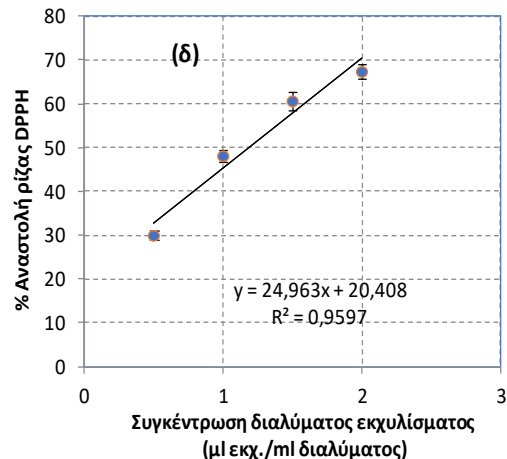
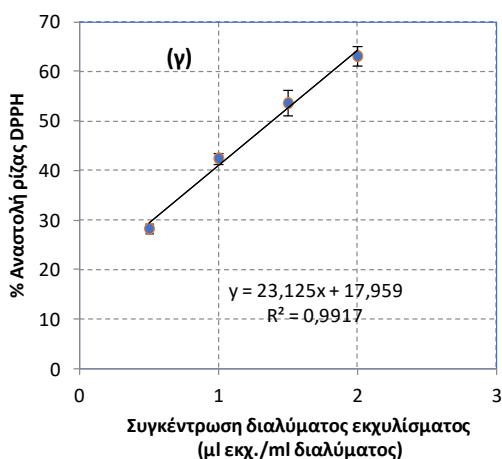
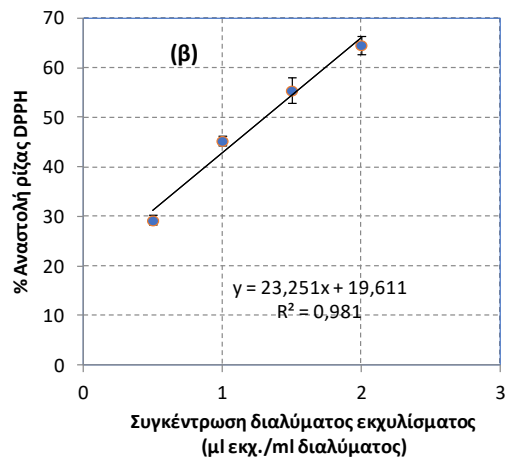
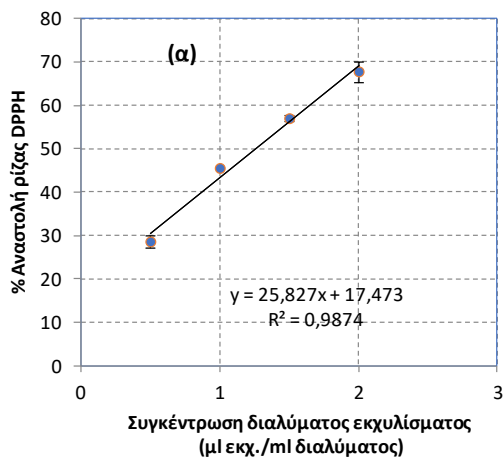
Διάγραμμα 9: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικού εύρους κοκκομετρίας

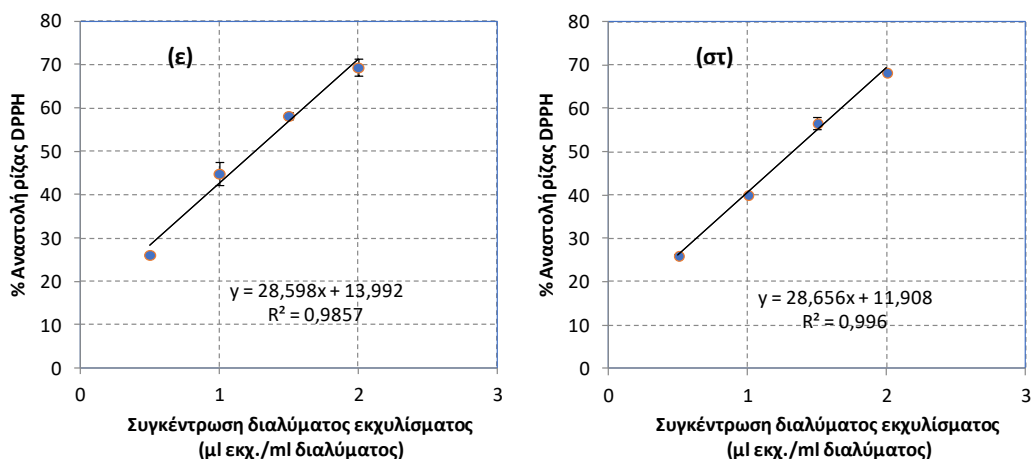
Η απόδοση σε TFC των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 91.1-103.9 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, μέγιστη απόδοση σε φλαβονοειδή παρουσιάζει η εκχύλιση του στερεού της μικρότερης κοκκομετρίας (<500µm), ενώ τα άλλα δύο εύρη κοκκομετρίας που εξετάστηκαν (500-600µm και 800-1000µm) εμφανίζουν πρακτικά ίδια απόδοση.

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αύξησε την απόδοση της εκχύλισης σε TFC κατά περίπου 73%.

6.3.1.3 Αντιοξειδωτική Δράση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα εκχυλίσματα του πειράματος μελέτης της επίδρασης της κοκκομετρίας αναλύθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στο Διάγραμμα 10, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για κάθε εξετασθείσα συνθήκη και σε χρόνους $t=6h$ και $t=48h$ από την έναρξη της εκχύλισης. Βάσει των εξισώσεων που περιγράφουν τα διαγράμματα αυτά, υπολογίστηκαν οι συντελεστές IC_{50} των εκχυλισμάτων (Πίνακας 9).





Διάγραμμα 10: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) κοκκομετρία: <500 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 6 \text{ h}$, (β) κοκκομετρία: 500-600 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 6 \text{ h}$, (γ) κοκκομετρία: 800-1000 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 6 \text{ h}$, (δ) κοκκομετρία: <500 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 48 \text{ h}$, (ε) κοκκομετρία: 500-600 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 48 \text{ h}$, (στ) κοκκομετρία: 800-1000 μm, $t_{\text{δευματολεψίας}} = 48 \text{ h}$.

Πίνακας 9: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων στερεού διαφορετικής κοκκομετρίας σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6\text{h}$ και $t=48\text{h}$

Κοκκομετρία στερεού (μm)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)	
	$t=6\text{h}$	$t=48\text{h}$
<500	1.26 ± 0.02	1.19 ± 0.03
500-600	1.31 ± 0.03	1.26 ± 0.05
800-1000	1.39 ± 0.06	1.33 ± 0.01

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 9, από τις 6 ώρες και έπειτα, η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ενώσεων έχει ολοκληρωθεί, καθώς οι τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων σε χρόνο $t=48\text{h}$ είναι πρακτικά ίδιες με εκείνες σε $t=6\text{h}$. Μέγιστη απόδοση σε αντιοξειδωτικές ενώσεις σημειώνεται για στερεό κοκκομετρίας <500μm και ελάχιστη για στερεό κοκκομετρίας 800-1000μm.

Επιπλέον, παρουσιάζεται 34% μείωση του δείκτη IC_{50} συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση, επιβεβαιώνοντας την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης σε αντιοξειδωτικές ενώσεις παρουσία ενζύμου.

- Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των κόκκων της πρώτης ύλης, τόσο περισσότερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών αλλά και αντιοξειδωτικών μορίων εκχυλίζεται από αυτή. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία και με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα (Bucic et al., 2007). Όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία του προς εκχύλιση στερεού, τόσο μεγαλύτερη είναι η διεπιφάνεια μίας συγκεκριμένης ποσότητας στερεού-υγρού και συνεπώς αίρονται έως ένα βαθμό οι περιορισμοί των φαινομένων μεταφοράς στο σύστημα και ευνοείται η

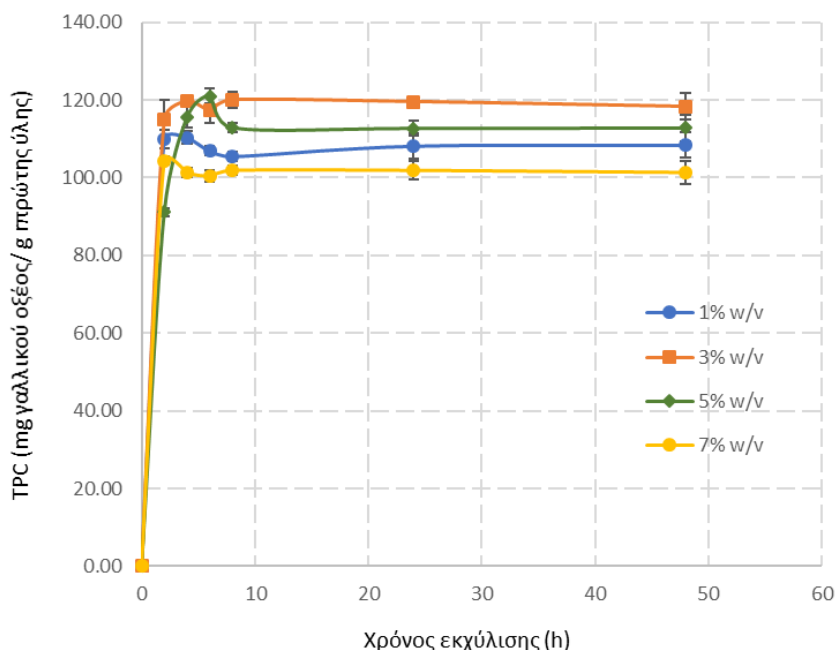
διάχυση των συστατικών από την πρώτη ύλη προς τον κύριο υγρό όγκο (Chanioti et al., 2014). Επιπλέον, για στερεό μικρότερης κοκκομετρίας ευνοείται και η δράση του ενζύμου καθώς είναι πιο εύκολη η αλληλεπίδραση του με το υπόστρωμα και η διείσδυση του στο στερεό (Nadar et al., 2018). Βάσει των συμπερασμάτων που εξήχθησαν αναφορικά με την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών μορίων, θεωρείται ως βέλτιστη συνθήκη η εκχύλιση στερεού κοκκομετρίας <500 μ m.

6.3.2 Μελέτη Επίδρασης της Συγκέντρωσης του Στερεού

Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με στερεό κοκκομετρίας <500 μ m για συγκεντρώσεις 1, 3, 5 και 7% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=5.5. Σε όλα τα πειράματα το ενζυμικό φορτίο ήταν 2.5 FPU/g στερεού του σκευάσματος Viscoferm. Δειγματοληψίες έγιναν σε χρόνους t=2, 4, 6, 8, 24 και 48h. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την απόδοση σε TPC (Διαγράμματα 11 και 12), την απόδοση σε TFC (Διαγράμματα 13 και 14) και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Διαγράμματα 15-17, Πίνακας 10).

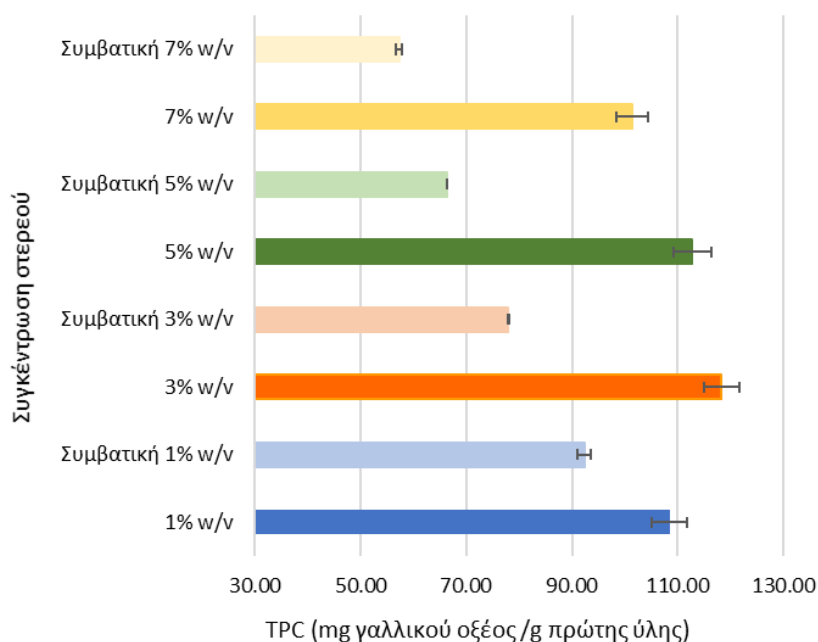
6.3.2.1 Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

Στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης της εκχύλισης σε TPC για κάθε συγκέντρωση στερεού που μελετήθηκε.



Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων σε εκχυλίματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα (Διάγραμμα 11), οι τιμές της απόδοσης σε TPC σταθεροποιούνται μετά από 4 έως 6 ώρες σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν. Επομένως, μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος έχει εκχυλιστεί σχεδόν η μέγιστη δυνατή ποσότητα φαινολικών ενώσεων, υπό τις δεδομένες συνθήκες διεργασίας. Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για κάθε εξετασθείσα συνθήκη.



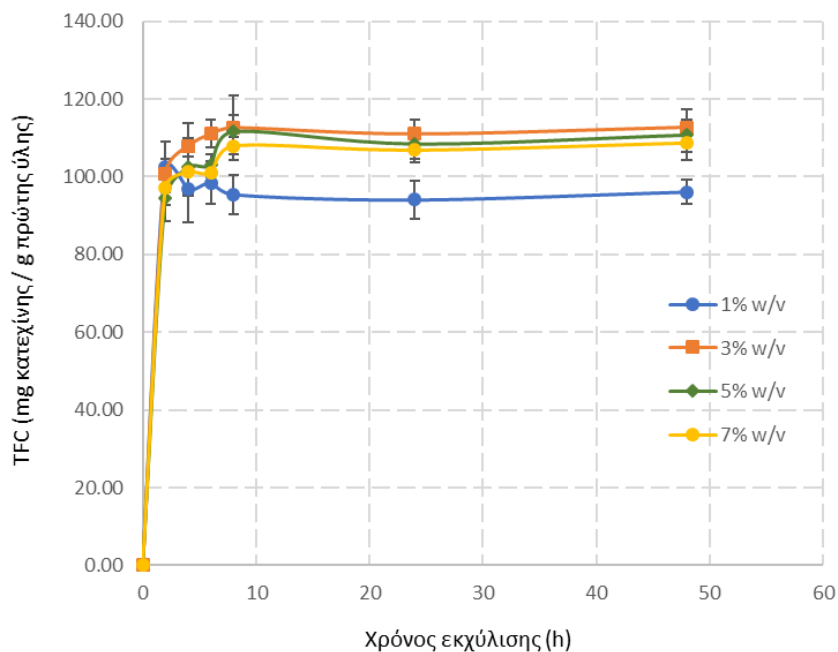
Διάγραμμα 12: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι η απόδοση του εκάστοτε συστήματος σε φαινολικές ενώσεις είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της στερεής πρώτης ύλης σε αυτό (Διαγράμματα 11 και 12). Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 101.3-118.3 mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται ελάχιστη απόδοση για συγκέντρωση πρώτης ύλης 7% w/v, μεγαλύτερη για 5% w/v και μέγιστη για 3% w/v. Συνεπώς, παρατηρείται ανοδική τάση της απόδοσης για μείωση της συγκέντρωσης του στερεού στο σύστημα της εκχύλισης, κάτι που επιβεβαιώθηκε και στα πειράματα συμβατικής εκχύλισης.

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αύξησε την απόδοση της εκχύλισης σε TPC κατά περίπου 17%, 52%, 69% και 77% για τις συγκεντρώσεις στερεού 1, 3, 5 και 7% w/v αντίστοιχα.

6.3.2.2 Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

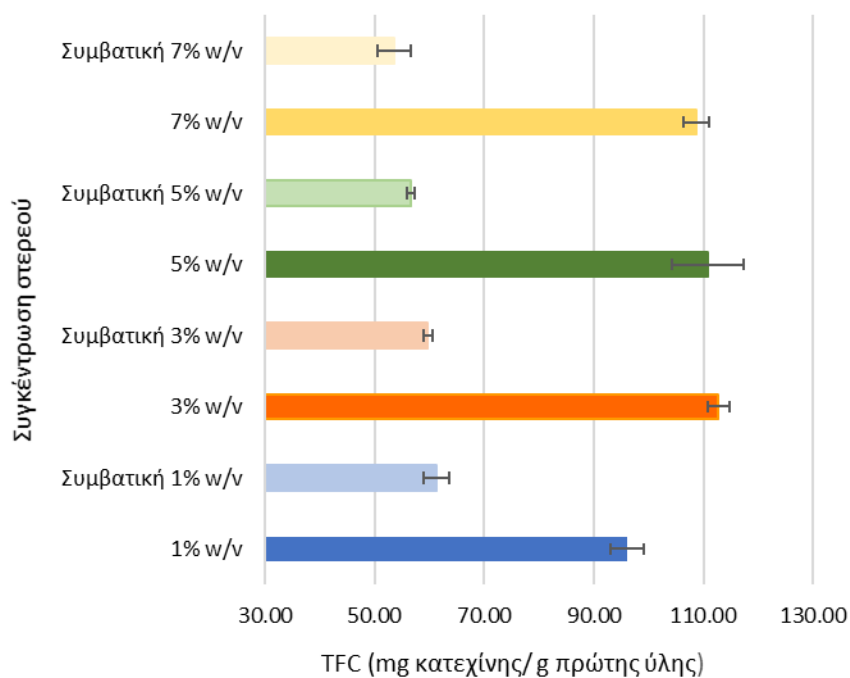
Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης σε TFC για τα συστήματα εκχύλισης που μελετήθηκαν.



Διάγραμμα 13: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Η χρονική παρακολούθηση των τιμών TFC υποδηλώνει ότι σε χρόνο 4 έως 6 ωρών έχει πρακτικά σταματήσει η εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι και τις 6 ώρες από την έναρξη της εκχύλισης παρατηρείται αύξηση με μικρές διακυμάνσεις στις τιμές απόδοσης TFC. Στη συνέχεια ωστόσο, οι τιμές αυτές σταθεροποιούνται.

Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές απόδοσης TFC που μετρήθηκαν στα εκχυλίσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων στερεού.



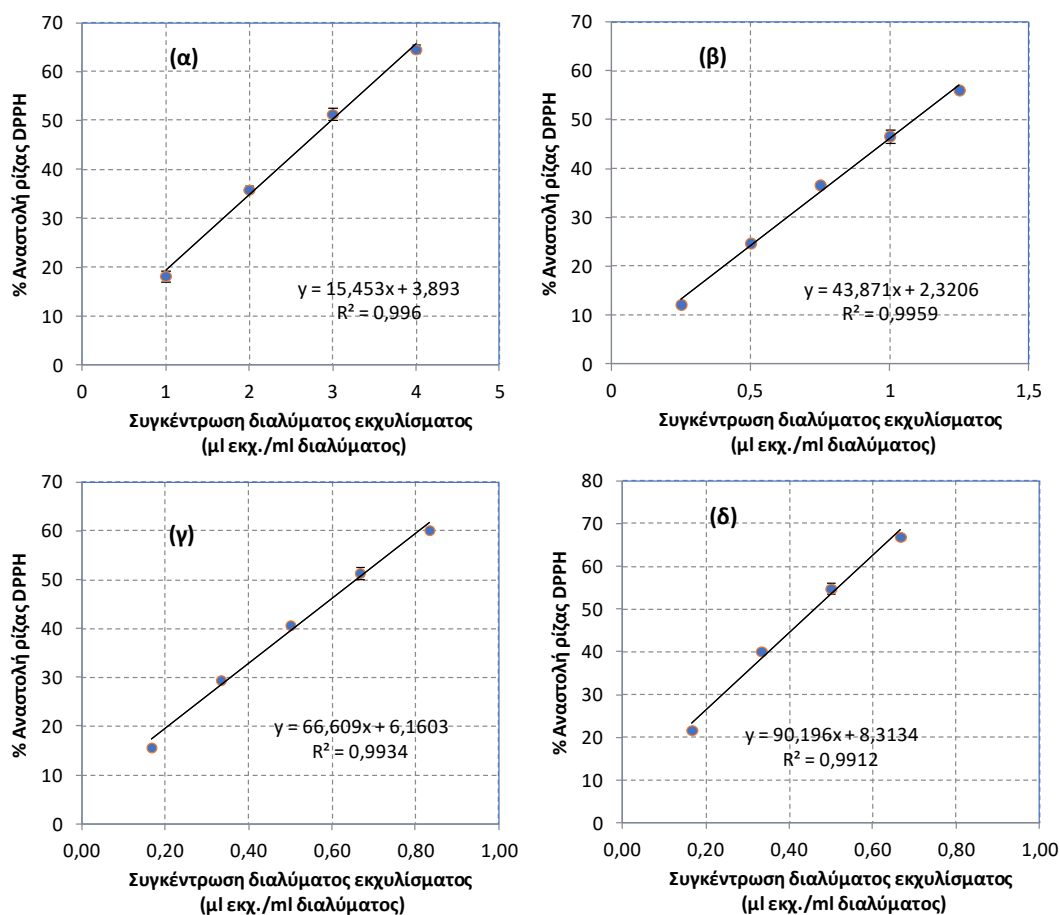
Διάγραμμα 14: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Η απόδοση TFC των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 96.1-112.7 mg κατεχίνης / g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 14, οι τιμές TFC παρουσιάζουν αντίστοιχες τάσεις με τις τιμές TPC. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται υψηλότερες αποδόσεις για μικρότερες συγκεντρώσεις στερεού. Ωστόσο στην περίπτωση των φλαβονοειδών, οι διαφοροποιήσεις είναι μικρότερες.

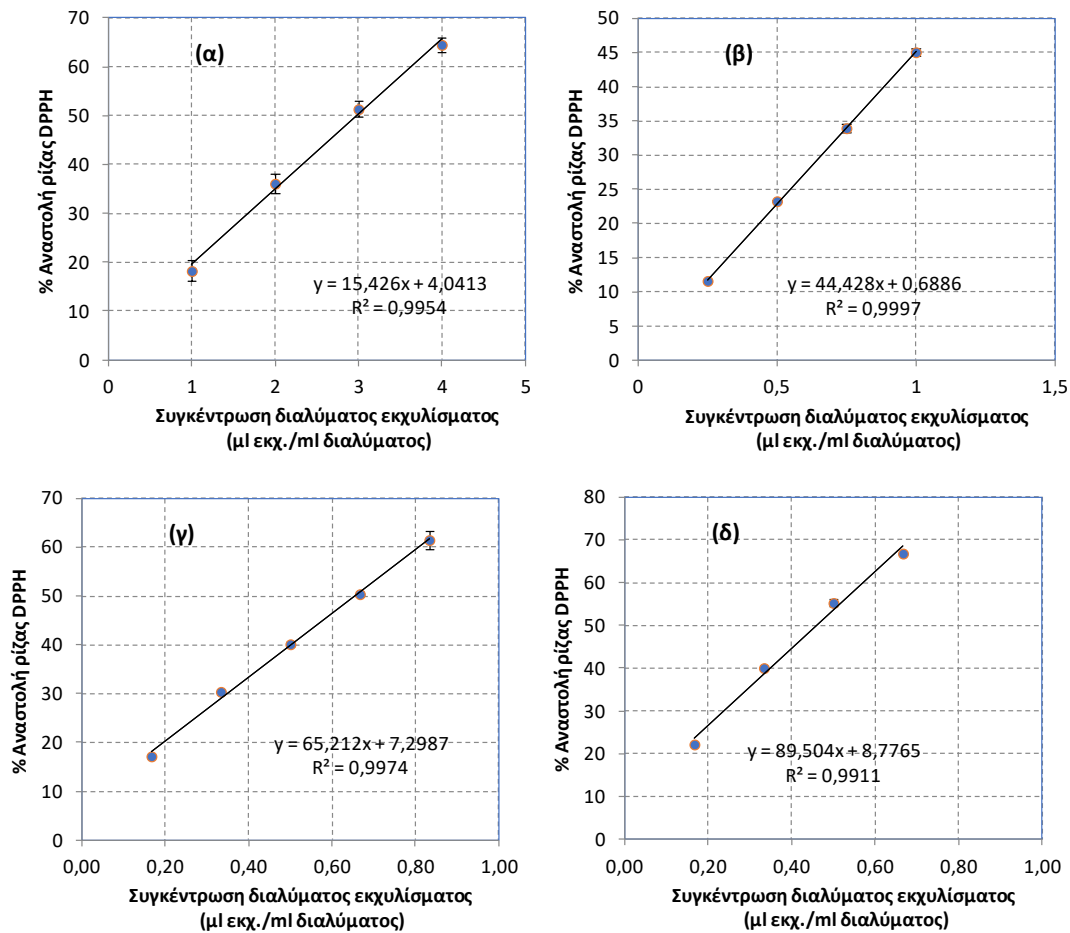
Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αύξησε την απόδοση της εκχύλισης σε TFC κατά περίπου 57%, 88%, 96% και 100% για τις συγκεντρώσεις στερεού 1, 3, 5 και 7%_{w/v}, αντίστοιχα.

6.3.2.3 Αντιοξειδωτική Δράση

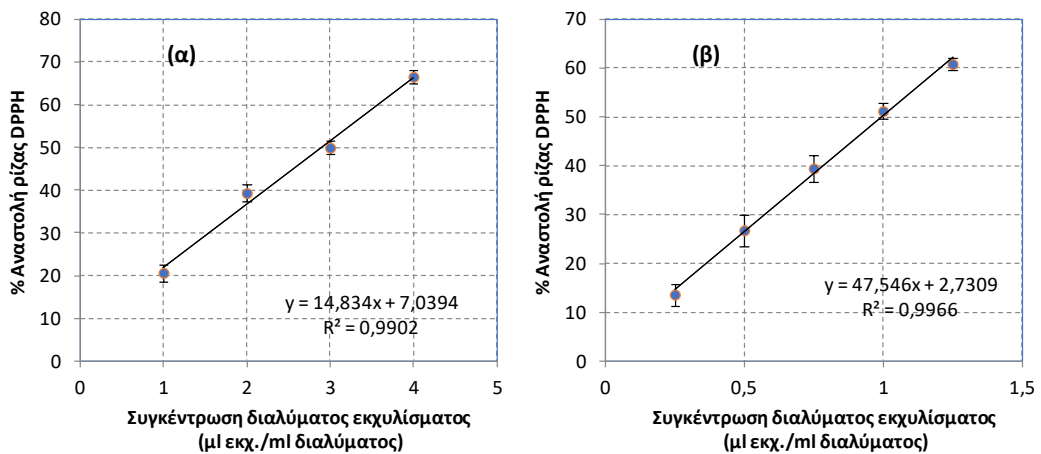
Τα εκχυλίσματα του πειράματος μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης αναλύθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στα Διαγράμματα 15-17, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στο διάλυμα, για κάθε εξετασθείσα συγκέντρωση στερεού και σε χρόνους t=6h, t=8h και t=48h από την έναρξη της εκχύλισης. Βάσει των εξισώσεων που περιγράφουν τα διαγράμματα αυτά υπολογίστηκαν οι συντελεστές IC₅₀ των εκχυλισμάτων (Πίνακας 10).

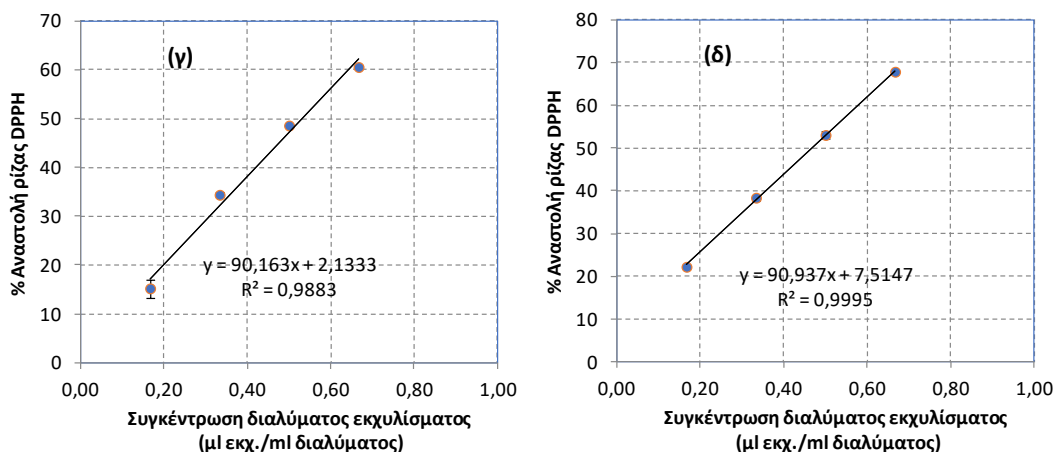


Διάγραμμα 15: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε $t_{\text{δευματολειψίας}}=6h$



Διάγραμμα 16: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε $t_{\text{δευματολειψίας}}=8h$





Διάγραμμα 17: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min και για συγκέντρωση πρώτης ύλης (α) 1% w/v, (β) 3% w/v, (γ) 5% w/v, (δ) 7% w/v σε $t_{\text{δευματοληψίας}}=48h$

Πίνακας 10: Δείκτης IC_{50} για εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού και σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6h$, $t=8h$ και $t=48h$

Συγκέντρωση στερεού (% w/v)	IC_{50} (μL/mL διαλύματος)		
	t=6h	t=8h	t=48h
1	2.98 ± 0.05	2.98 ± 0.03	2.97 ± 0.02
3	1.09 ± 0.01	1.11 ± 0.02	0.99 ± 0.04
5	0.66 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.53 ± 0.00
7	0.46 ± 0.00	0.46 ± 0.00	0.47 ± 0.00

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10, οι διαφορές των IC_{50} των εκχυλισμάτων επιβεβαιώνουν ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης, μειώνεται ο συντελεστής αναστολής μειώνεται και επομένως η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος γίνεται ισχυρότερη. Επίσης, παρατηρείται ότι από τις 6 ώρες και έπειτα, η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών έχει ολοκληρωθεί, καθώς οι τιμές IC_{50} των εκχυλισμάτων σε $t_{\text{δειγματοληψίας}}=8h$ και $t_{\text{δειγματοληψίας}}=48h$ μεταβάλλονται ελάχιστα σε συγκριτικά με εκείνες σε χρόνο $t_{\text{δειγματοληψίας}}=6h$.

Επιπλέον, για τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις ΕΥΕ για συγκεντρώσεις στερεού 1, 3, 5 και 7% w/v, υπολογίστηκε αντίστοιχα 38%, 34%, 53% και 56% μείωση του δείκτη IC_{50} , συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση. Επομένως, επιβεβαιώθηκε η θετική συνεισφορά του ενζυμικού σκευάσματος και στην απόδοση της εκχύλισης σε αντιοξειδωτικές ενώσεις.

- Γενικότερα, αναμένεται ανοδική τάση της συγκέντρωσης σε εκχυλιζόμενες ουσίες και καθοδική τάση της απόδοσης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του στερεού στο σύστημα εκχύλισης (Rajha et al., 2014, Zhang et al., 2021). Η τάση που ακολουθεί η απόδοση της διεργασίας οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που διέπουν το σύστημα. Αναλυτικότερα, όσο μικρότερη είναι η αναλογία στερεού-διαλύτη, τόσο μικρότερο είναι το ιξώδες του συστήματος, και συνεπώς τόσο πιο εύκολη η μεταφορά του διαλύτη και του ενζύμου από τον κύριο όγκο του υγρού προς το στερεό (Casas & Domínguez González, 2017). Επιπλέον, εφόσον για την μεταφορά μάζας μεταξύ της στερεάς πρώτης ύλης και του υγρού διαλύτη οφείλεται η βαθμίδα συγκέντρωσης των εκχυλιζόμενων ουσιών, αναμένεται αυξημένη απόδοση σε αραιότερα συστήματα, όπου η βαθμίδα αυτή είναι μεγαλύτερη και ο κορεσμός του διαλύτη σε εκχυλιζόμενες ουσίες δυσκολότερος (Goula, 2013).

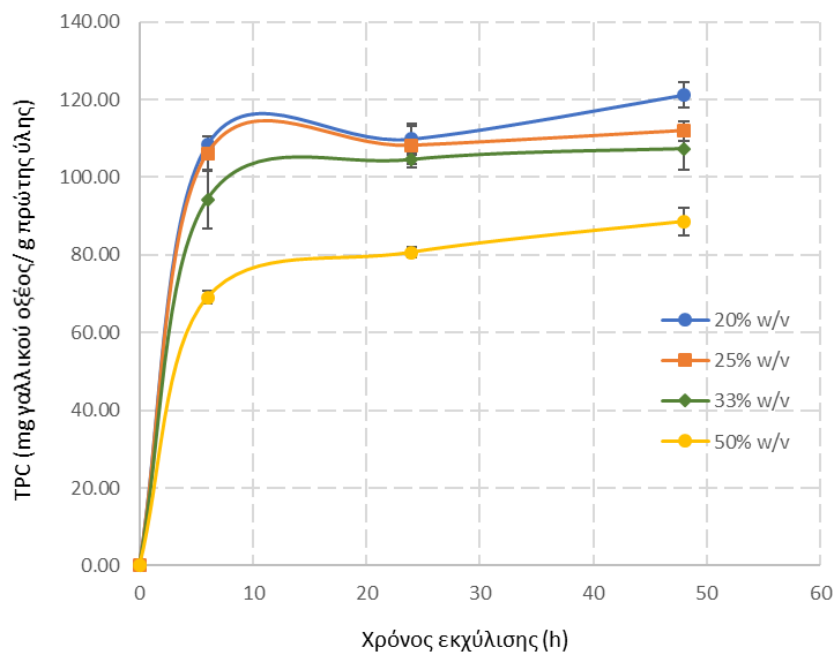
6.3.3 Μελέτη Επίδρασης Υψηλών Συγκεντρώσεων του Στερεού (High Solid)

Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις στερεού κοκκομετρίας <500 μm σε συγκεντρώσεις 20, 25, 33 και 50% w/v και με την προσθήκη ενζυμικού φορτίου 1% v/v Viscofem, δηλαδή 0.65, 0.52, 0.39 και 0.26 FPU/g πρώτης ύλης, αντίστοιχα. Δειγματοληψίες έγιναν σε χρόνους $t=6, 24$ και 48h . Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την απόδοση TPC (Διαγράμματα 18 και 19), την απόδοση TFC (Διαγράμματα 20 και 21) και την αντιοξειδωτική δράση (Διαγράμματα 22 και 23, Πίνακας 11) των εκχυλισμάτων.

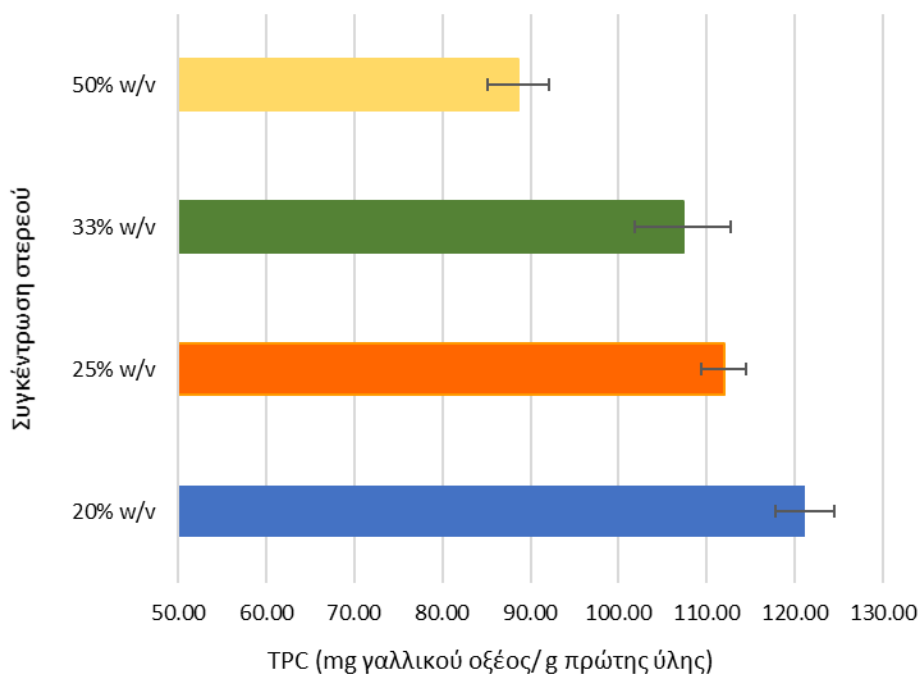
6.3.3.1 Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

Στο Διάγραμμα 18 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της απόδοσης TPC για κάθε σύστημα εκχύλισης που μελετήθηκε.

Βάσει των αποτελεσμάτων καθίσταται σαφές, ότι η συγκέντρωση του στερεού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο την τελική απόδοση της διεργασίας σε φαινολικές ενώσεις αλλά και τον χρόνο που απαιτείται ούτως ώστε να εκχυλιστεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα αυτών από τους κόκκους της πρώτης ύλης (Διάγραμμα 18). Πιο συγκεκριμένα, για τα συστήματα με συγκέντρωση στερεού 20% w/v και 25% w/v απαιτήθηκαν πρακτικά 6 ώρες για την σταθεροποίηση της τιμής του TPC. Η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων στο σύστημα με συγκέντρωση πρώτης ύλης 33% w/v άρχισε να ολοκληρώνεται μετά το πέρας 12 ωρών κατεργασίας, ενώ στο σύστημα με συγκέντρωση στερεού 50% w/v καθυστέρησε ακόμη περισσότερο να ολοκληρωθεί, καθώς χρειάστηκαν περισσότερες από 24 ώρες. Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων που αναλύθηκαν.



Διάγραμμα 18: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού



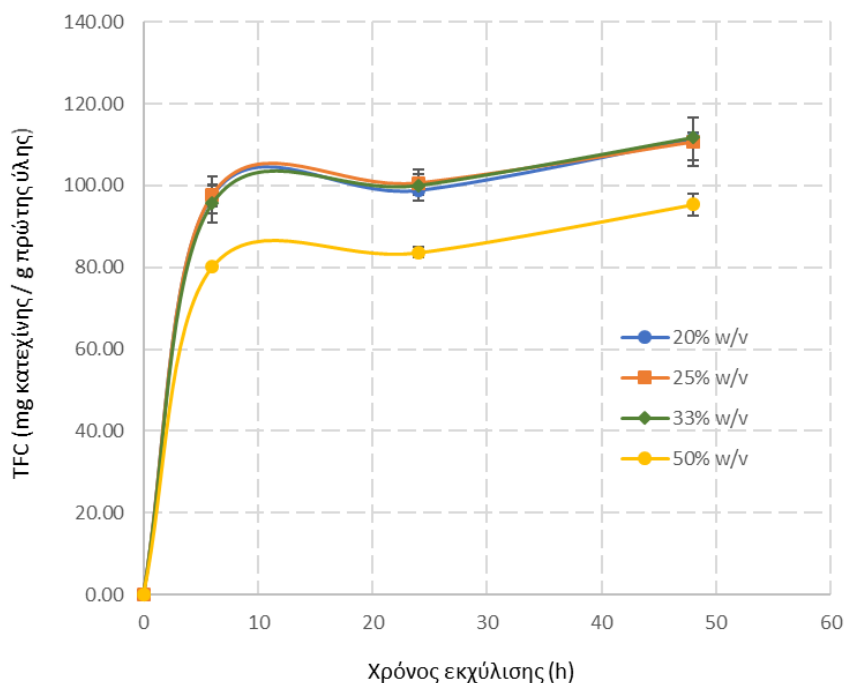
Διάγραμμα 19: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Η απόδοση σε TPC των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 88.6-121.1 mg γαλλικού οξέος / g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Σύμφωνα με τα Διαγράμματα 18 και 19, διαπιστώνεται ότι όσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση του εκχυλιζόμενου στερεού, τόσο μεγαλύτερη είναι και η απόδοση σε φαινολικές ενώσεις. Μάλιστα η διαφορά που παρουσίασε το

εκχύλισμα συγκέντρωσης 20% w/v εμφάνισε περίπου 40% υψηλότερη απόδοση συγκριτικά με το εκχύλισμα 50% w/v.

6.3.3.2 Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

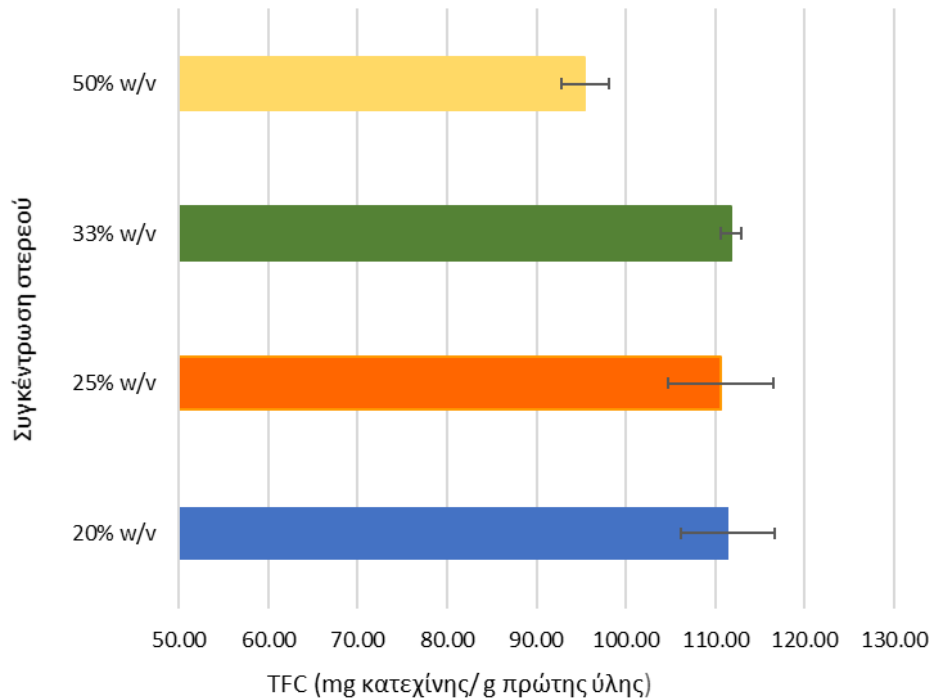
Στο Διάγραμμα 20 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης σε TFC για κάθε σύστημα εκχύλισης που μελετήθηκε.



Διάγραμμα 20: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα συστημάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

Παρατηρείται ότι, στα συστήματα, στα οποία το στερεό βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 20, 25 και 33% w/v, η εκχύλιση των φλαβονοειδών έχει σχεδόν ολοκληρωθεί μετά από 6 ώρες, καθώς από εκείνη την στιγμή και μέχρι τη λήξη της διεργασίας (t=48h) δεν παρατηρείται αισθητή μεταβολή στις τιμές TFC (Διάγραμμα 20). Ωστόσο, στο σύστημα με συγκέντρωση στερεού 50% w/v η διεργασία της εκχύλισης απαιτεί περισσότερο χρόνο για την επίτευξη της μέγιστης δυνατής απομάκρυνσης φλαβονοειδών και επιπλέον, η τελική της απόδοση είναι χαμηλότερη συγκριτικά με εκείνες των αραιότερων συστημάτων.

Στο Διάγραμμα 21 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TFC που μετρήθηκαν στα εκχυλίσματα των εξετασθέντων συστημάτων.

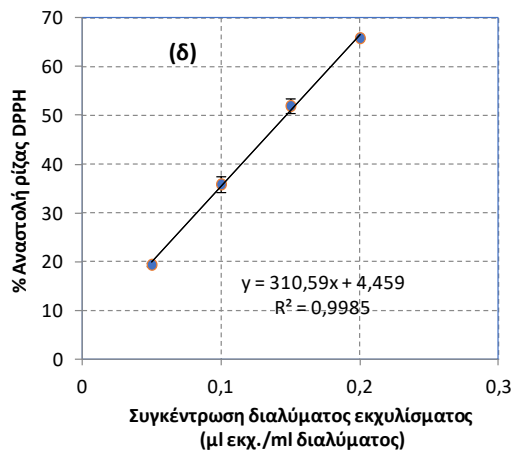
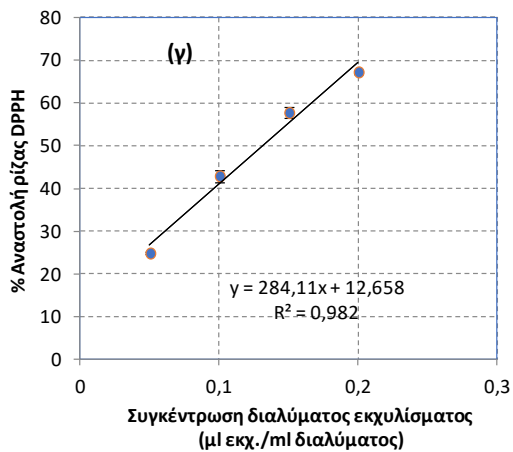
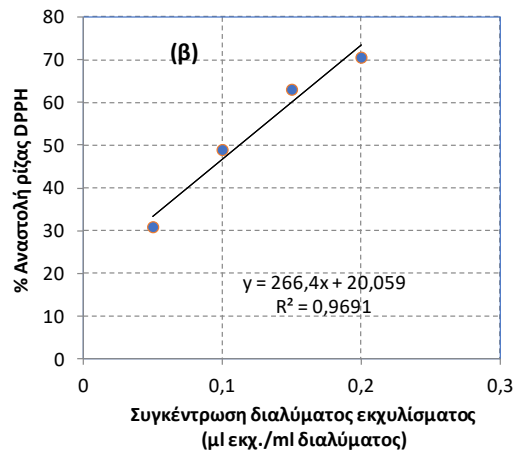
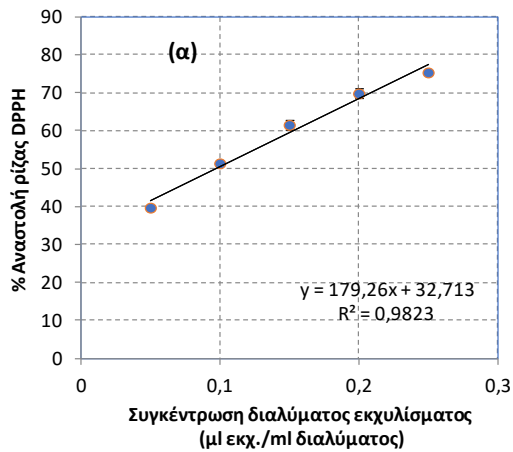


Διάγραμμα 21: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων για διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού

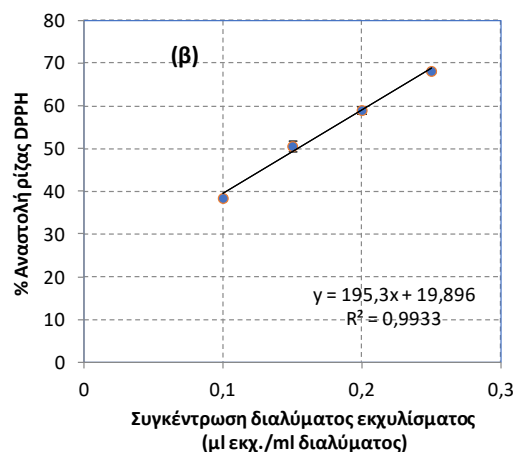
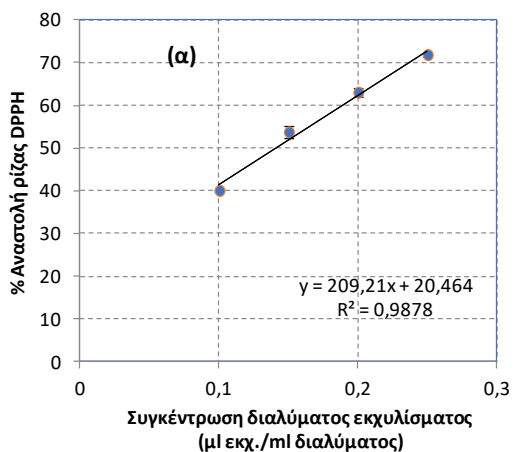
Η απόδοση σε TFC των τελικών εκχυλισμάτων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 95.4-111.4 mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού που εξετάστηκαν. Είναι σαφές ότι οι μέγιστες τιμές TFC είναι πρακτικά ίδιες στα συστήματα με συγκέντρωση στερεού 20, 25 και 33 % w/v και υψηλότερες από την αντίστοιχη τιμή για το σύστημα συγκέντρωσης στερεού 50% w/v (Διάγραμμα 21).

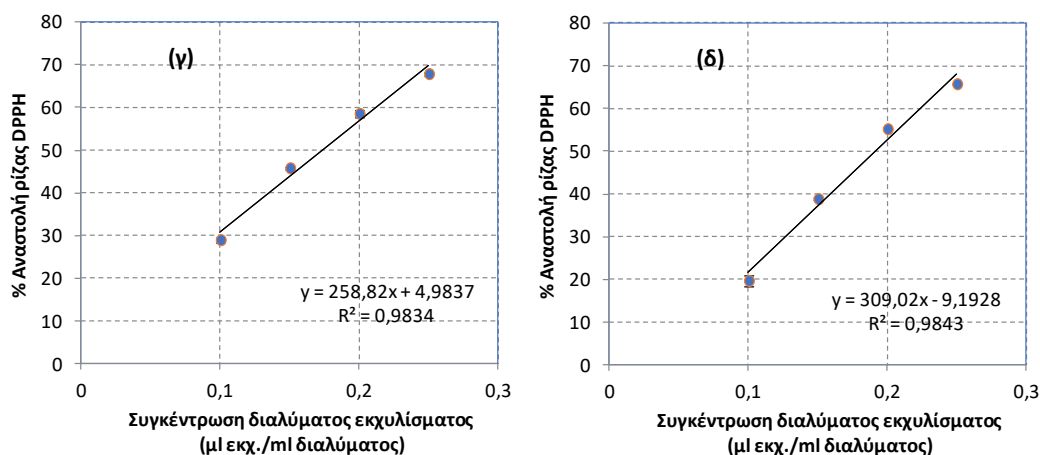
6.3.3.3 Αντιοξειδωτική Δράση

Τα εκχυλίσματα του πειράματος αναλύθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στα Διαγράμματα 22 και 23, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στο διάλυμα, για κάθε εξετασθείσα συγκέντρωση στερεού και σε χρόνους $t=6h$ και $t=48h$ από την έναρξη της εκχύλισης. Βάσει των εξισώσεων που περιγράφουν τα διαγράμματα αυτά υπολογίστηκαν οι συντελεστές IC_{50} των εκχυλισμάτων (Πίνακας 11).



Διάγραμμα 22: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) συγκέντρωση περικαρπίου 50% w/v, (β) συγκέντρωση περικαρπίου 33.3% w/v, (γ) συγκέντρωση περικαρπίου 25% w/v, (δ) συγκέντρωση περικαρπίου 20% w/v, για $t_{\text{δευγματολειτουργίας}} = 6 \text{ h}$





Διάγραμμα 23: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) συγκέντρωση περικαρπίου 50% w/v, (β) συγκέντρωση περικαρπίου 33.3% w/v, (γ) συγκέντρωση περικαρπίου 25% w/v, (δ) συγκέντρωση περικαρπίου 20% w/v, για $t_{\text{δευματοληψίας}} = 48 \text{ h}$

Πίνακας 11: Δείκτης IC_{50} για εκχυλίσματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στερεού και σε χρόνους δειγματοληψίας $t=6\text{h}$ και $t=48\text{h}$

Συγκέντρωση στερεού (%w/v)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος /mL διαλύματος)	
	t=6h	t=48h
20	0.15	0.14
25	0.13	0.12
33	0.11	0.10
50	0.10	0.09

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 11, οι διαφορές των δεικτών IC_{50} των εκχυλισμάτων επιβεβαιώνουν τη θετική επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης της πρώτης ύλης στην συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ενώσεων στο εκχύλισμα. Ωστόσο, παρατηρείται ότι σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις στερεού οι διαφοροποιήσεις ως προς τους συντελεστές αναστολής είναι μικρές, καθώς η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων όλων των εξετασθέντων συστημάτων είναι στο ίδιο επίπεδο. Συγκρίνοντας τους δείκτες IC_{50} για $t_{\text{δειγματοληψίας}}=6\text{h}$ και $t_{\text{δειγματοληψίας}}=48\text{h}$ παρατηρείται ότι σε όλα τα συστήματα οι τιμές έχουν σταθεροποιηθεί μετά το πέρας των 6 ωρών.

- Η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν τα εξετασθέντα συστήματα ως προς τους απαιτούμενους χρόνους διεργασίας αλλά και ως προς τις αποδόσεις τους σε φαινολικές ενώσεις και флаβονοειδή έγκεινται στην υψηλή επιφανειακή τάση, στο υψηλό ιξώδες και στην δυσκολία μεταφοράς μάζας που συνεπάγεται ένα πυκνό διάλυμα (Casas & Domínguez González, 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης στερεού, η

ανάδευση δυσχεραίνεται και η διάχυση του διαλύτη προς το στερεό και των εκχυλιζόμενων ουσιών προς τον κύριο όγκο του υγρού παρεμποδίζονται. Επιπλέον, σε εκχυλίσεις υψηλότερων συγκεντρώσεων στερεού, η επιφάνεια επαφής στερεού-υγρού είναι μικρότερη, καθώς το στερεό σχηματίζει μία υγρή μάζα και δεν διασπείρεται επαρκώς στον όγκο του υγρού. Στην περίπτωση λοιπόν των πιο πυκνών συστημάτων απαιτούνται είτε μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης του ενζύμου, είτε μεγαλύτερες ποσότητες ενζυμικού φορτίου, προκειμένου να υδρολυθεί το στερεό, να ρευστοποιηθεί επαρκώς το σύστημα και να μειωθεί το ιξώδες της υγρής μάζας του στερεού.

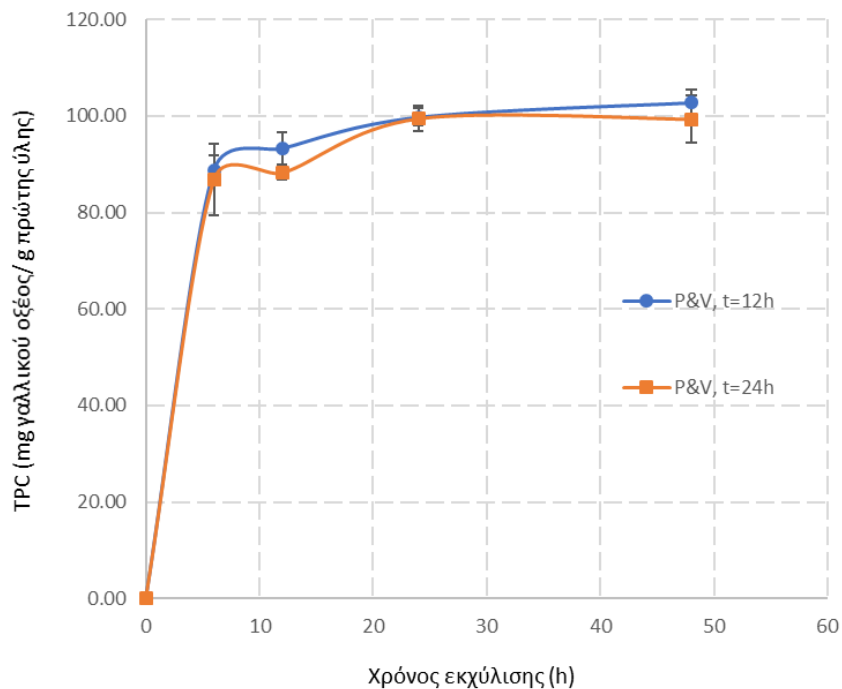
6.3.4 Μελέτη επίδρασης Συνεργιστικής Δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color

Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με στερεό κοκκομετρίας <500 μm για συγκέντρωση στερεού 25% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα με $\text{pH}=5.5$. Στα συστήματα των εκχυλίσεων προστέθηκε 1% v/v Pectinex Ultra Color (P) (24.64 U pectin lyase/g πρώτης ύλης) και 1% v/v Viscoferm (V) (0.52 FPU/g πρώτης ύλης). Το Viscoferm προστέθηκε στα δύο συστήματα εκχύλισης σε χρόνο $t=12\text{h}$ και στα άλλα δύο σε χρόνο $t=24\text{h}$. Δειγματοληψίες έγιναν σε χρόνους $t=6, 12, 24$ και 48h . Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την απόδοση TPC (Διαγράμματα 24 και 25), την απόδοση TFC (Διαγράμματα 26 και 27) και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (Διάγραμμα 28, Πίνακας 12). Σημειώνεται ότι με την κωδικοποίηση P&V, $t=12\text{h}$ γίνεται αναφορά στα εκχυλίματα, στα οποία το Viscoferm (V) προστέθηκε σε χρόνο $t=12\text{h}$, ενώ ο κωδικός P&V, $t=24\text{h}$ αναφέρεται στα εκχυλίματα, στα οποία το Viscoferm προστέθηκε σε χρόνο $t=24\text{h}$.

6.3.4.1 Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

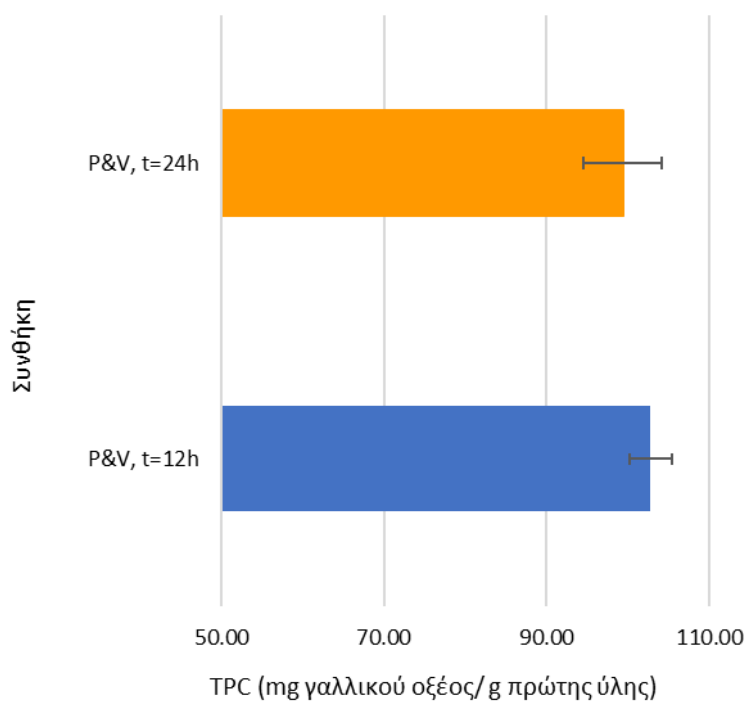
Στο Διάγραμμα 24 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης TPC των συστημάτων που εξετάστηκαν.

Από το Διάγραμμα 24, παρατηρείται ότι η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων έχει ολοκληρωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό της σε χρόνο $t=12\text{h}$, δηλαδή πριν την προσθήκη ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm. Στα συστήματα όπου το Viscoferm προστέθηκε σε χρόνο $t=12\text{h}$, παρατηρείται μία αύξηση της τάξης του 10% στις τιμές TPC μέχρι το πέρας της διεργασίας ($t=48\text{h}$). Αντιθέτως, στα συστήματα όπου το Viscoferm προστέθηκε σε χρόνο $t=24\text{h}$, η τιμή των TPC παραμένει σταθερή από την συγκεκριμένη χρονική στιγμή και μέχρι το τέλος της εκχύλισης. Αυτό υποδηλώνει ότι σε χρόνο $t=24\text{h}$ έχει πρακτικά ολοκληρωθεί η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων, για αυτό και η προσθήκη του δεύτερου ενζυμικού σκευάσματος δεν επηρεάζει την απόδοση. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η προσθήκη των ενζύμων έχει νόημα σε μικρότερους χρόνους εκχύλισης, ώστε να επιταχυνθεί η διεργασία.



Διάγραμμα 24: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των εξετασθέντων συστημάτων για συγκέντρωση στερεού 25% w/v και με ενζυμικό φορτίο 1% v/v Pectinex (P) και 1% v/v Viscoferm (V)

Στο Διάγραμμα 25 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TPC που παρουσίασαν τα εκχυλίσματα.

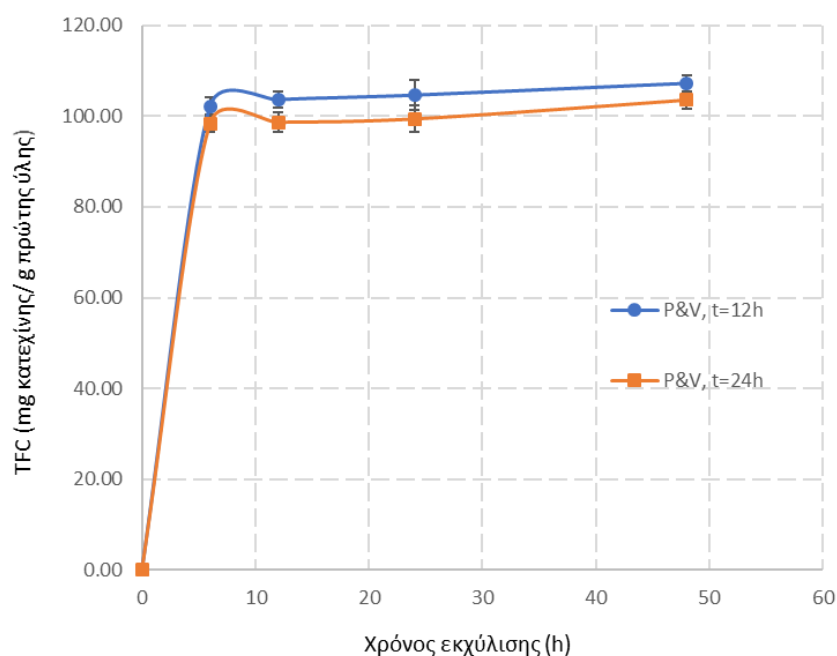


Διάγραμμα 25: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων των εξετασθέντων συστημάτων για σταθερή συγκέντρωση στερεού και ενζυμικού φορτίου

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 24 και 25, στο σύστημα όπου το Viscoferm έδρασε για περισσότερο χρόνο η απόδοση σε φαινολικές ενώσεις ήταν λίγο μεγαλύτερη, ωστόσο η διαφορά είναι μικρή. Πιο συγκεκριμένα, στο σύστημα P&V, t=12h η μέγιστη τιμή της απόδοσης TPC ήταν 102.9 mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης, ενώ στο σύστημα P&V, t=24h ήταν 99.4 mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης.

6.3.4.2 Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

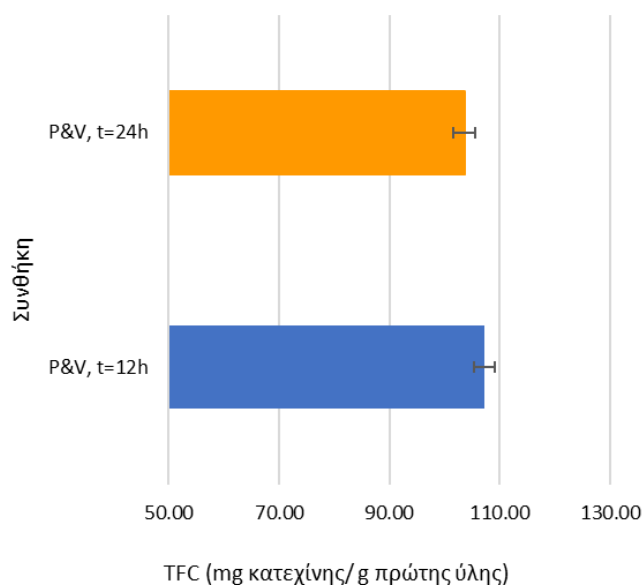
Στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης TFC των εκχυλισμάτων των συστημάτων που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 26: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα των εξετασθέντων συστημάτων για συγκέντρωση στερεού 25% w/v και με ενζυμικό φορτίο 1% v/v Pectinex (P) και 1% v/v Viscoferm (V)

Όσον αφορά στην εκχύλιση των φλαβονοειδών, η διεργασία έχει πρακτικά ολοκληρωθεί σε χρόνο t=12h. Στα συστήματα όπου το Viscoferm προστέθηκε σε χρόνο t=12h, παρατηρείται μία μικρή αύξηση των τιμών TFC, της τάξης του 3%, από την χρονική αυτή στιγμή και μέχρι το πέρας της διεργασίας (t=48h). Στην περίπτωση των συστημάτων όπου το Viscoferm προστέθηκε σε χρόνο t=24h, η τιμή TFC παραμένει σταθερή από τις 12h μέχρι και τις 24h και έπειτα παρουσιάζει μία αύξηση της τάξης του 4-5% μέχρι και την ολοκλήρωση της διεργασίας σε χρόνο t=48h.

Στο Διάγραμμα 27 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές TFC που μετρήθηκαν στα εκχυλίσματα.

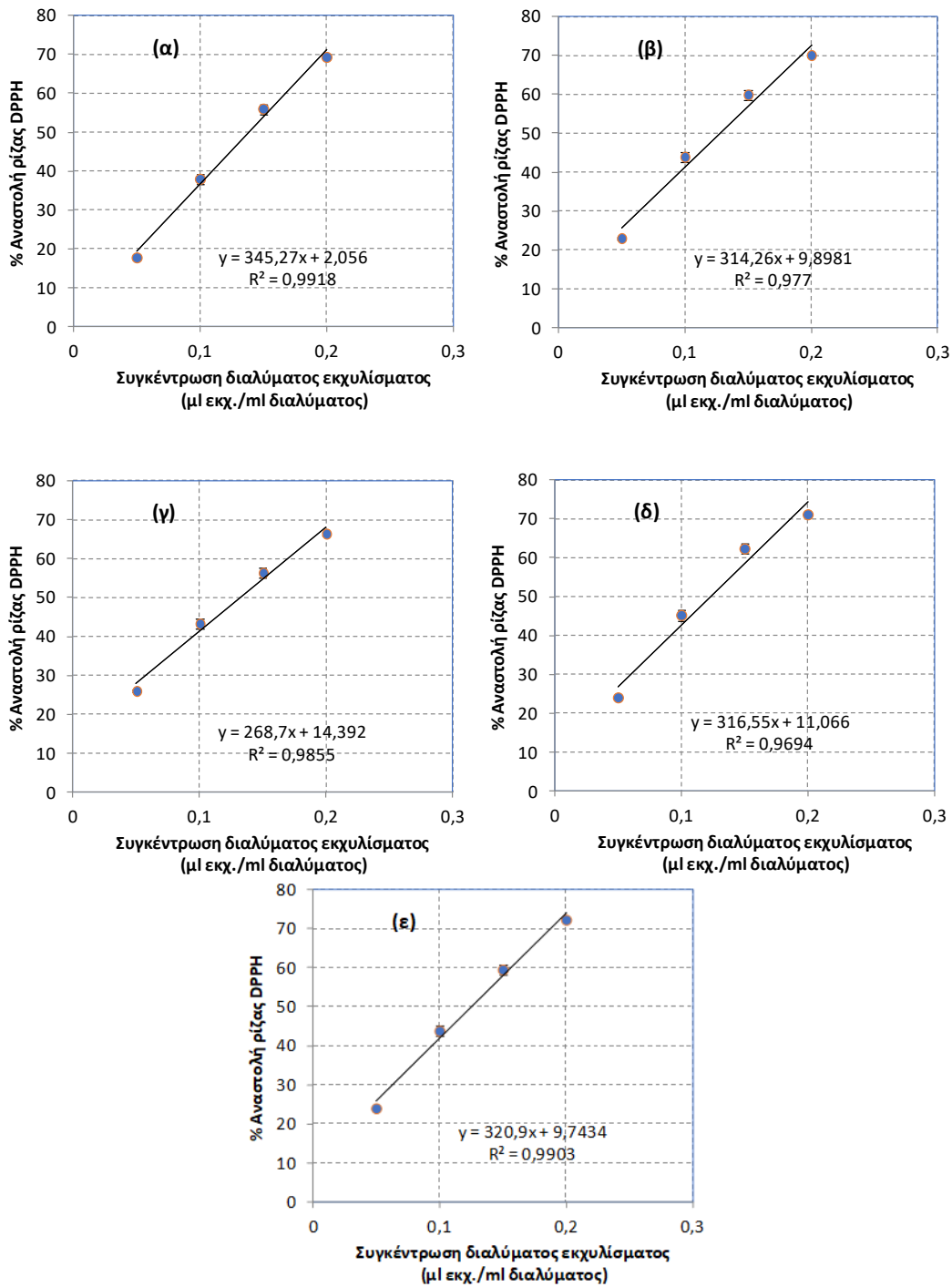


Διάγραμμα 27: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων των εξετασθέντων συστημάτων για σταθερή συγκέντρωση στερεού και ενζυμικού φορτίου

Οι τιμές απόδοσης TFC επιβεβαιώνουν ότι από το σύστημα στο οποίο το Viscoferm έδρασε για περισσότερο χρόνο απομακρύνθηκε μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών ενώσεων (Διάγραμμα 27). Πιο συγκεκριμένα, στο σύστημα P&V, t=12h η μέγιστη τιμή TFC ήταν 107.2 mg κατεχίνης /g πρώτης ύλης, ενώ στο σύστημα P&V, t=24h ήταν 103.5 mg κατεχίνης /g πρώτης ύλης.

6.3.4.3 Αντιοξειδωτική Δράση

Τα εκχυλίσματα του πειράματος μελέτης της συνεργιστικής δράσης των σκευασμάτων Pectinex Ultra Color και Viscoferm αναλύθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στο Διάγραμμα 28, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στο διάλυμα σε $t_{\text{δειγματοληψίας}}=12, 24$ και $48h$ για το σύστημα P&V, t=12h και σε $t_{\text{δειγματοληψίας}}=24$ και $48h$ για το σύστημα P&V, t=24h. Βάσει των εξισώσεων που περιγράφουν τα διαγράμματα αυτά υπολογίστηκαν οι δείκτες IC_{50} των εκχυλισμάτων (Πίνακας 12).



Διάγραμμα 28: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. (α) P&V,t=12h, $t_{\text{δευγματοληψίας}}=12\text{h}$, (β) P&V,t=12h, $t_{\text{δευγματοληψίας}}=24\text{h}$, (γ) P&V,t=24h, $t_{\text{δευγματοληψίας}}=24\text{h}$ (δ) P&V,t=12h, $t_{\text{δευγματοληψίας}}=48\text{h}$ (ε) P&V,t=24h, $t_{\text{δευγματοληψίας}}=48\text{h}$

Πίνακας 12: Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση με χρήση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex

Πειραματική συνθήκη	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)
Pectinex & Προσθήκη Viscoferm t=12 h, t _{δειγματοληψίας} =12 h	0.14
Pectinex & Προσθήκη Viscoferm t=12 h, t _{δειγματοληψίας} =24 h	0.13
Pectinex & Προσθήκη Viscoferm t=12 h, t _{δειγματοληψίας} =48 h	0.12
Pectinex & Προσθήκη Viscoferm t=24 h, t _{δειγματοληψίας} =24 h	0.13
Pectinex & Προσθήκη Viscoferm t=24 h, t _{δειγματοληψίας} =48 h	0.13

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, οι διαφορές των IC₅₀ των εκχυλισμάτων είναι πολύ μικρές. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο σύστημα P&V, t=12h παρουσιάζει μία πολύ μικρή αύξηση (μείωση του δείκτη IC₅₀) από την στιγμή που εισέρχεται σε αυτό ποσότητα του ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm (t=12h) μέχρι και το τέλος της διεργασίας (t=48h). Αντιθέτως, στο σύστημα P&V, t=24h δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή του IC₅₀ από την στιγμή προσθήκης του ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm (t=24h) και έπειτα.

- Ενώ γενικότερα η συνεργιστική δράση ενζυμικών σκευασμάτων παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα ως προς την απόδοση της εκχύλισης, στο συγκεκριμένο πείραμα η προσθήκη του ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm σε χρόνο t=12h είχε θετική συνεισφορά ως προς την απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτικές ενώσεις, ενώ η προσθήκη του σε χρόνο t=24h δεν φάνηκε να επηρεάζει το σύστημα. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι σε τόσο μεγάλους χρόνους διεργασίας έχει ήδη απομακρυνθεί το σύνολο των εκχυλιζόμενων ουσιών, επομένως η προσθήκη του 2^{ου} ενζύμου είναι ατελέσφορη και η συνεργιστική δράση των δύο ενζύμων δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

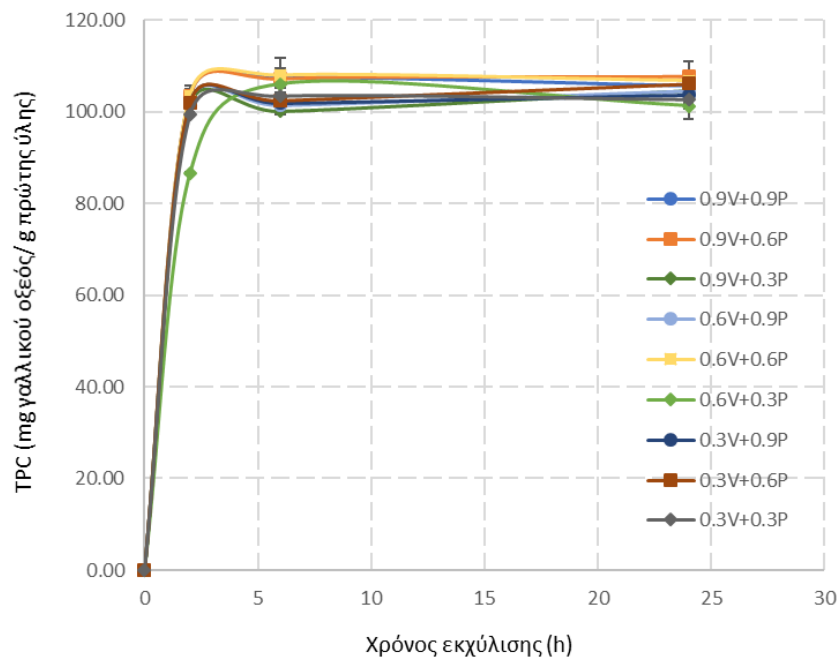
6.3.5 Μελέτη της επίδρασης του Ενζυμικού Φορτίου κατά την Συνεργιστική Δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color

Βάσει του πειραματικού σχεδιασμού Box-Wilson Central Composite Design, επιλέχθηκαν 9 διαφορετικοί συνδυασμοί ενζυμικού φορτίου (%v/v) των σκευασμάτων Viscoferm (V) και Pectinex (P) και εξετάστηκε η συνεργιστική τους δράση ως προς την απόδοση σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, αλλά και αντιοξειδωτικά μόρια. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με στερεό κοκκομετρίας

<500 μm και σε συγκέντρωση 25% w/v. Δειγματοληψίες έγιναν τις χρονικές στιγμές $t=2, 6$ και 24h. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την απόδοση TPC, την απόδοση TFC και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

6.3.5.1 Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

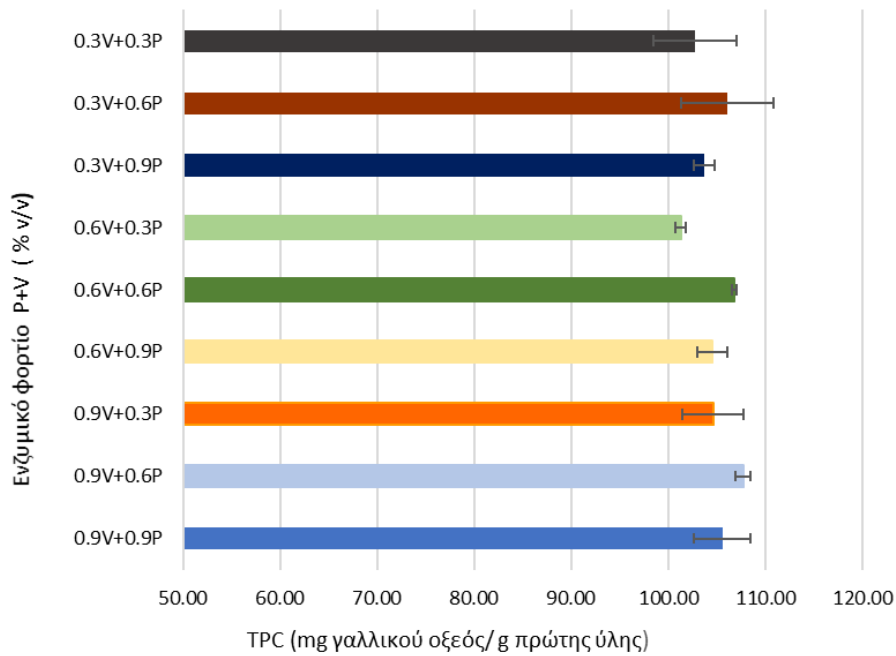
Στο Διάγραμμα 29 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης TPC των συστημάτων που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 29: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες

Σημειώνεται ότι σε όλα τα συστήματα οι τιμές απόδοσης TPC σταθεροποιούνται σε χρόνο $t=6\text{h}$. Συνεπώς ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της απομάκρυνσης των φαινολικών ενώσεων από την πρώτη ύλη ήταν οι 6 ώρες.

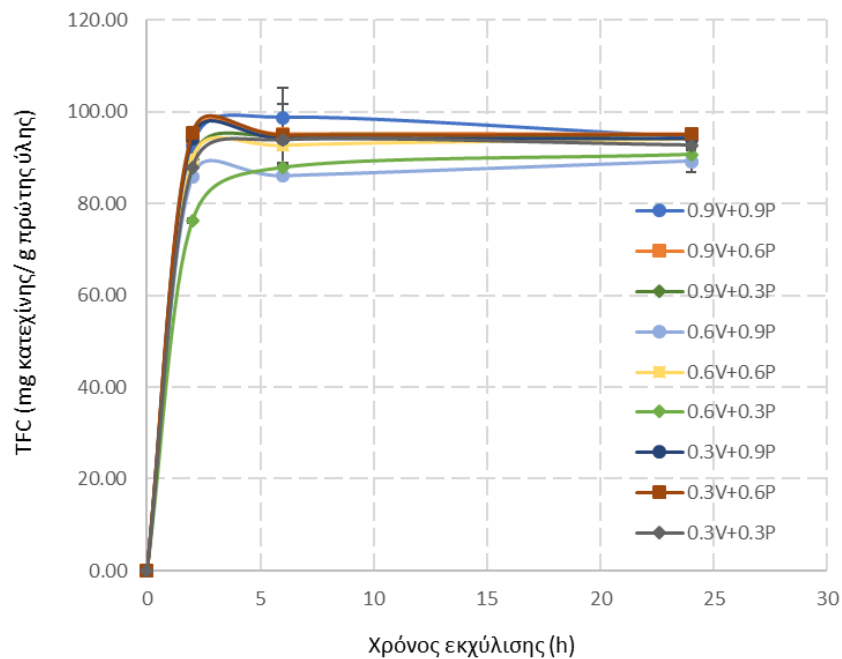
Στο Διάγραμμα 30 παρουσιάζονται οι μέγιστες αποδόσεις των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις για κάθε εξετασθείσα συνθήκη.



Διάγραμμα 30: Μέγιστες τιμές TPC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες

6.3.5.2 Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

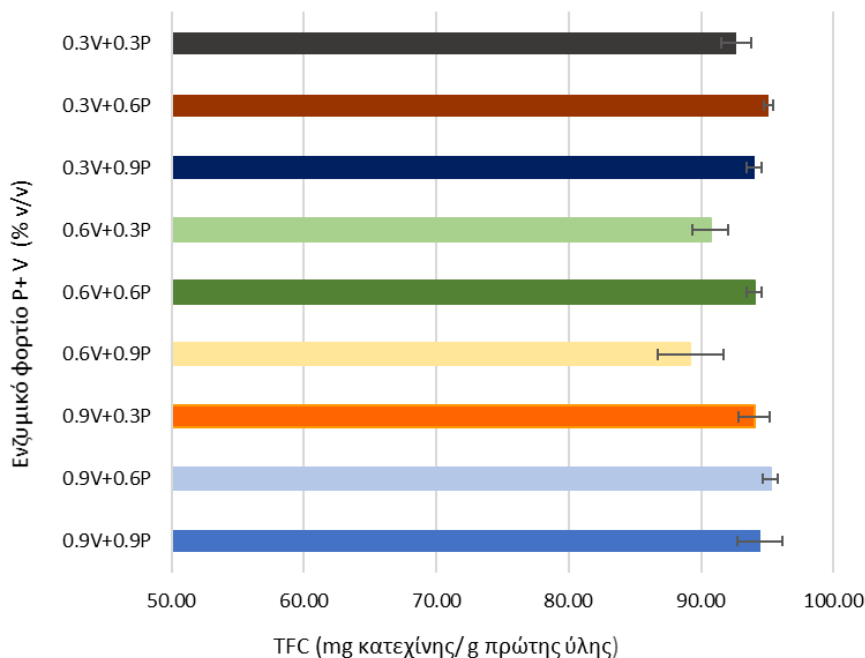
Στο Διάγραμμα 31 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της απόδοσης TFC των εκχυλισμάτων των συστημάτων που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 31: Χρονική μεταβολή του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες

Όπως φαίνεται παραπάνω (Διάγραμμα 31), οι μεταβολές των τιμών TFC μεταξύ $t=6h$ και $t=24h$ είναι σχεδόν μηδενικές. Συνεπώς ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της απομάκρυνσης των φλαβονοειδών ενώσεων από την πρώτη ύλη ήταν οι 6 ώρες.

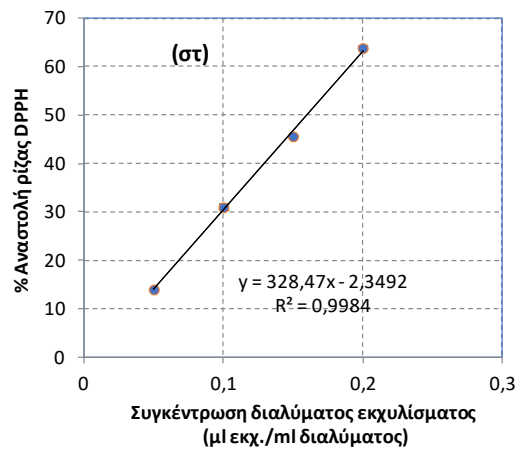
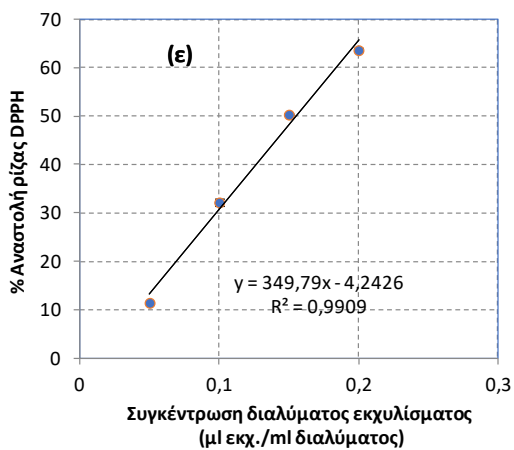
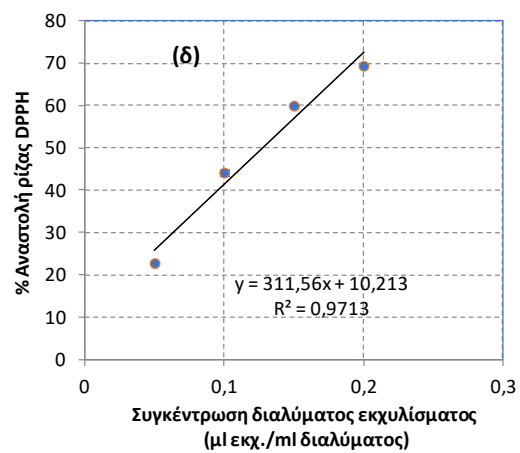
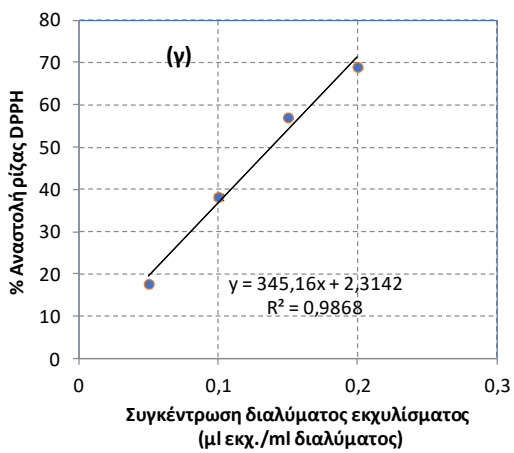
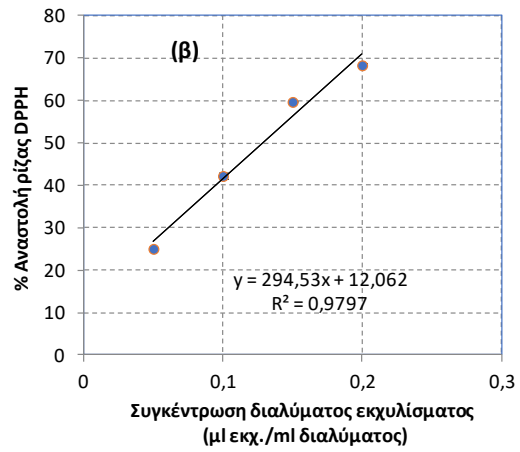
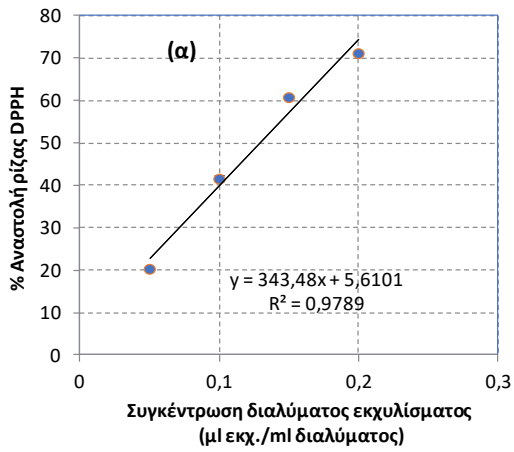
Στο Διάγραμμα 32 παρουσιάζονται οι μέγιστες αποδόσεις των συστημάτων σε φλαβονοειδή για κάθε εξετασθείσα συνθήκη.

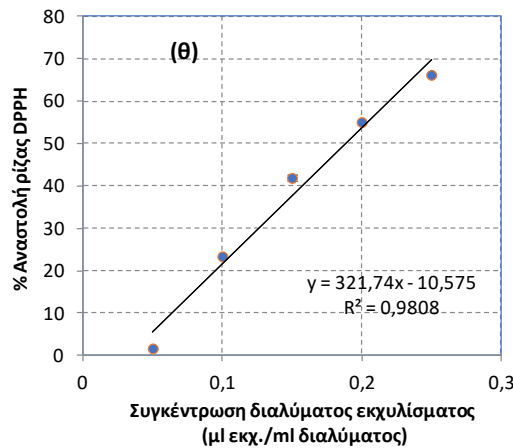
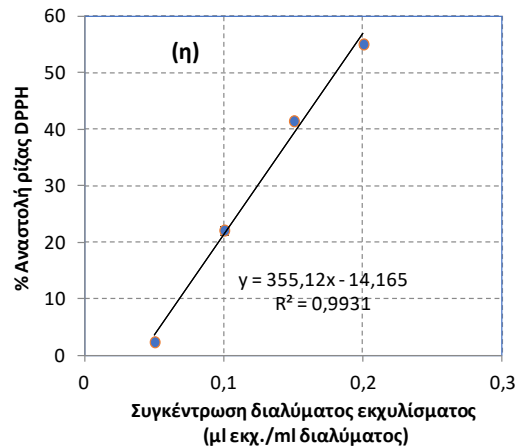
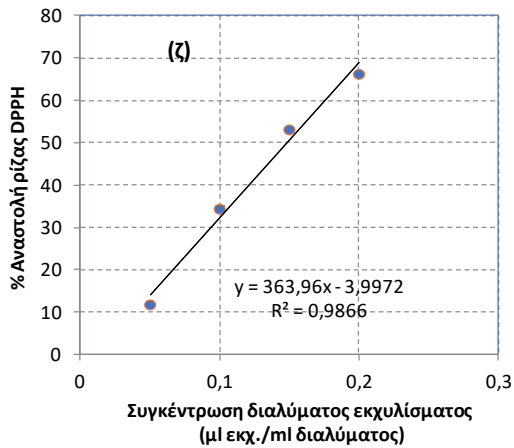


Διάγραμμα 32: Μέγιστες τιμές TFC των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες

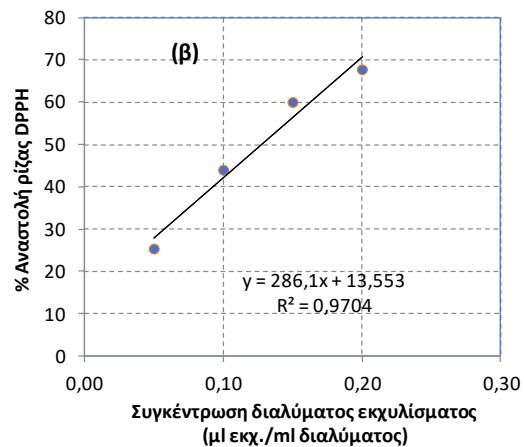
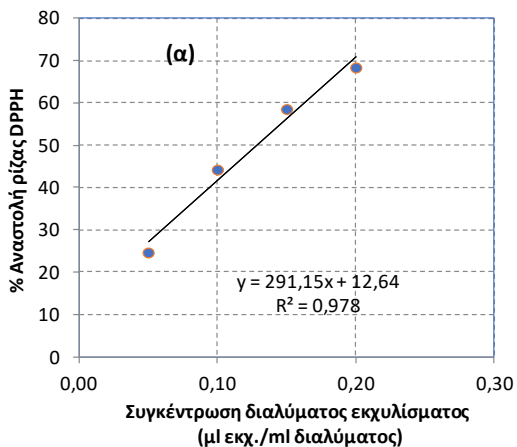
6.3.5.3 Αντιοξειδωτική Δράση

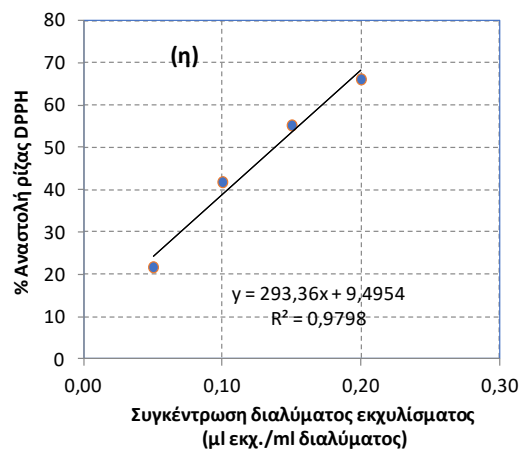
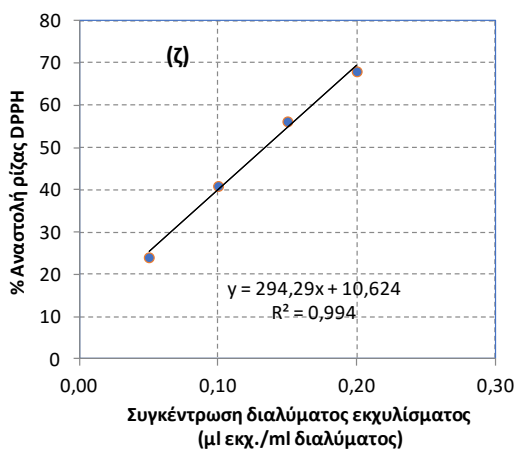
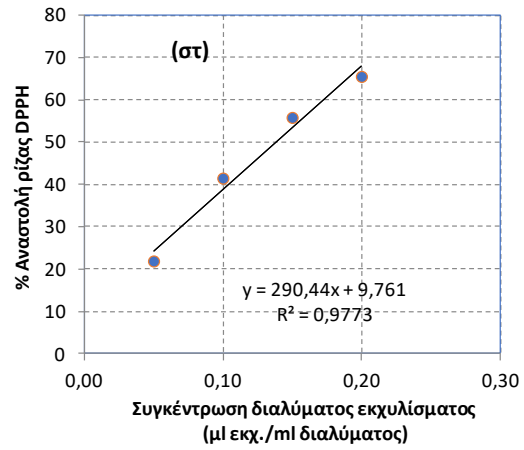
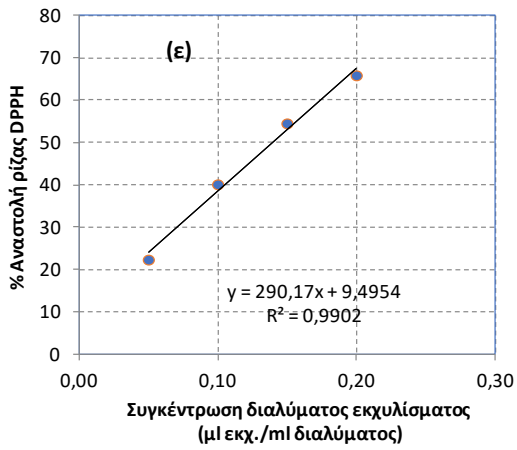
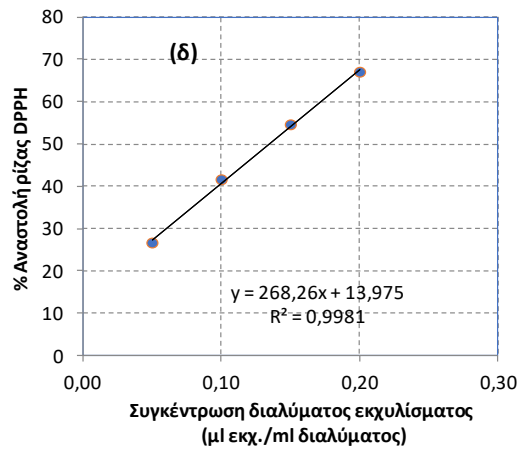
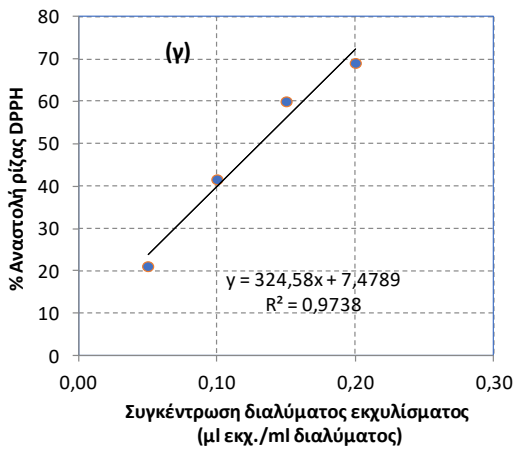
Τα εκχυλίσματα του πειράματος αναλύθηκαν και ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στα Διαγράμματα 33 και 34, παρουσιάζεται το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στο διάλυμα, για $t=2$ και $6h$, αντίστοιχα. Βάσει των εξισώσεων που περιγράφουν τα διαγράμματα αυτά υπολογίστηκαν οι δείκτες IC_{50} των εκχυλισμάτων (Πίνακας 13).

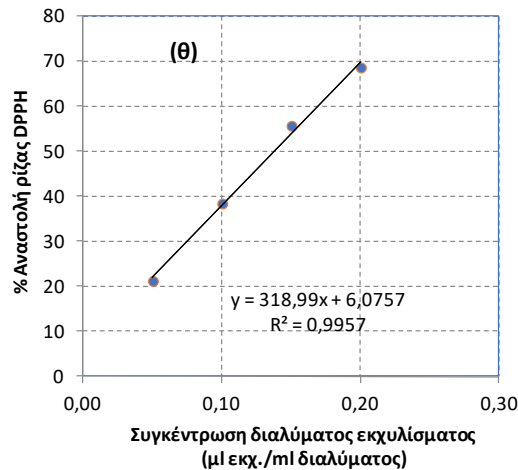




Διάγραμμα 33: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. Τα εκχυλίσματα προέκυψαν μετά από κατεργασία του περικαρπίου της *R. canina* L. με (α) 0.9% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex (β) 0.9% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (δ) 0.9% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (δ) 0.6% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (ε) 0.6% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (στ) 0.6% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (ζ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (η) 0.3% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (θ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex. $t_{\text{δευματοληψίας}}=2h$







Διάγραμμα 34: Διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για χρόνο επώασης 30 min. Τα εκχυλίσματα προέκυψαν μετά από κατεργασία του περικαρπίου της *R. canina* L. με (α) 0.9% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex (β) 0.9% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (δ) 0.9% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (δ) 0.6% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (ε) 0.6% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (στ) 0.6% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex, (ζ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.9% v/v Pectinex, (η) 0.3% v/v Viscoferm + 0.6% v/v Pectinex, (θ) 0.3% v/v Viscoferm + 0.3% v/v Pectinex. $t_{\text{δειγματοληψίας}}=6\text{h}$

Πίνακας 13: Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση της πρώτης ύλης με χρήση μίγματος των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex σε διαφορετικές αναλογίες για χρόνους δειγματοληψίας $t=2\text{h}$ και $t=6\text{h}$

X_1 (Viscoferm % v/v)	X_2 (Pectinex Ultra Color % v/v)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)	
		$t=2\text{h}$	$t=6\text{h}$
0.9	0.9	0.13	0.13
0.9	0.6	0.13	0.13
0.9	0.3	0.14	0.13
0.6	0.9	0.13	0.13
0.6	0.6	0.16	0.14
0.6	0.3	0.16	0.14
0.3	0.9	0.15	0.13
0.3	0.6	0.18	0.14
0.3	0.3	0.19	0.14

Σημειώνεται ότι οι δείκτες IC_{50} των εκχυλισμάτων που προέκυψαν μετά από 2 ώρες διεργασίας παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις ανάλογα με τα ενζυμικά φορτία που προστέθηκαν στο εκάστοτε σύστημα. Οι διαφοροποιήσεις αυτές αίρονται πρακτικά μετά από 6 ώρες εκχύλισης, υποδηλώνοντας πλήρη απομάκρυνση των αντιοξειδωτικών ενώσεων από όλα τα συστήματα ίδιας συγκέντρωσης πρώτης ύλης (25% w/v).

Με την ολοκλήρωση του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική μελέτη και εξήχθει το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την απόκριση του εκάστοτε συστήματος εκχύλισης.

Κατά την στατιστική ανάλυση μελετήθηκε η επίδραση της της συνεργιστικής δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση του περικαρπίου του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς (*Rosa canina* L.) με στόχο την μεγιστοποίηση (α) του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC), (β) του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και (γ) της αντιοξειδωτικής δράσης.

Για την εύρεση των πειραματικών συνθηκών που επιτυγχάνουν μέγιστη απόδοση χρησιμοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Wilson Central Composite Design, τριών επιπέδων, δύο ανεξάρτητων μεταβλητών (κάθε μία μεταβλητή αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ενός ενζυμικού σκευάσματος), με 9 πειραματικά σημεία.

Τα αποτελέσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της συνεργιστικής δράσης των σκευασμάτων Viscoferm (V) και Pectinex (P) είναι αυτά για $t_{\text{δειγματοληψίας}}=2\text{h}$ και παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα εξαρτημένων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού για $t_{\text{δειγματοληψίας}}=2\text{h}$

A/A	X ₁ (Viscoferm % v/v)	X ₂ (Pectinex Ultra Color % v/v)	TPC (mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης)	TFC (mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL δείγματος)
1	0.9	0.9	99.7	87.7	0.19
2	0.9	0.6	101.4	89.6	0.14
3	0.9	0.3	102.0	94.1	0.15
4	0.6	0.9	103.5	92.6	0.13
5	0.6	0.6	102.0	95.5	0.18
6	0.6	0.3	103.5	94.5	0.13
7	0.3	0.9	86.8	76.2	0.16
8	0.3	0.6	102.2	85.8	0.13
9	0.3	0.3	103.5	89.7	0.16

Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

Η προσαρμογή των μετρήσεων του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων οδήγησε στο παρακάτω δευτεροβάθμιο μοντέλο (Εξίσωση 8):

$$TFC = +89.54444 - 107.11111 \cdot \text{Viscoferm} + 90.44444 \cdot \text{Pectinex} - 9.44444 \cdot \text{Viscoferm} \cdot \text{Pectinex} + 93.70370 \cdot \text{Viscoferm}^2 - 61.85185 \cdot \text{Pectinex}^2 \quad (8)$$

Δεδομένου ότι στόχος του πειραματικού σχεδιασμού είναι η εύρεση εκείνων των συνθηκών που μεγιστοποιούν την απόδοση TFC και η ανάλυση διακύμανσης

(ANOVA) είναι ένα εργαλείο που μπορεί να δείξει ποιοι παράγοντες είναι στατιστικά σημαντικοί για την μεγιστοποίηση των παραμέτρων, εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης και παρουσιάζεται στον Πίνακα 15. Στον Πίνακα 15, παρουσιάζονται οι τιμές των F και p των συντελεστών του δευτεροβάθμιου μοντέλου (Εξ. X). Από τον Πίνακα 15 προκύπτει ότι το πλήρες μοντέλο είναι έγκυρο με βάση τις τιμές των p και F. Παρατηρείται όμως ότι οι τιμές του p ορισμένων μεταβλητών του πλήρους μοντέλου δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Κατά τη μοντελοποίηση συνηθίζεται οι όροι με τιμές p μεγαλύτερες από 0.1 να θεωρούνται στατιστικά μη σημαντικοί και να απαλείφονται από το μοντέλο (Nikaeen et al., 2020).

Από τον στατιστικό έλεγχο προέκυψε ότι οι όροι Viscoferm και Pectinex · Viscoferm δεν είναι στατιστικά σημαντικοί-σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 90%-και επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου. Ο όρος Pectinex · Viscoferm απαλείφθηκε, ωστόσο ο όρος A-Viscoferm δεν μπορεί να επαλειφθεί λόγω «ιεραρχίας του μοντέλου» (Nikaeen et al., 2020). Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι δείκτες F και p της στατιστικής ανάλυσης ANOVA για τις τιμές TFC, στο πλήρες καθώς και στο τροποποιημένο μοντέλο.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

	Πλήρες (R ² =0.9359)		Τροποποιημένο Μοντέλο (R ² =0.9258)	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Μοντέλο	8.76	0.0519	12.48	0.0157
A-Viscoferm	0.0098	<u>0.9273</u>	0.0113	0.9204
B-Pectinex	9.86	0.0516	11.36	0.0280
AB- Viscoferm*Pectinex	0.4737	<u>0.5407</u>		
A² – Viscoferm²	23.32	0.0169	26.85	0.0066
B² - Pectinex²	10.16	0.0498	11.70	0.0268

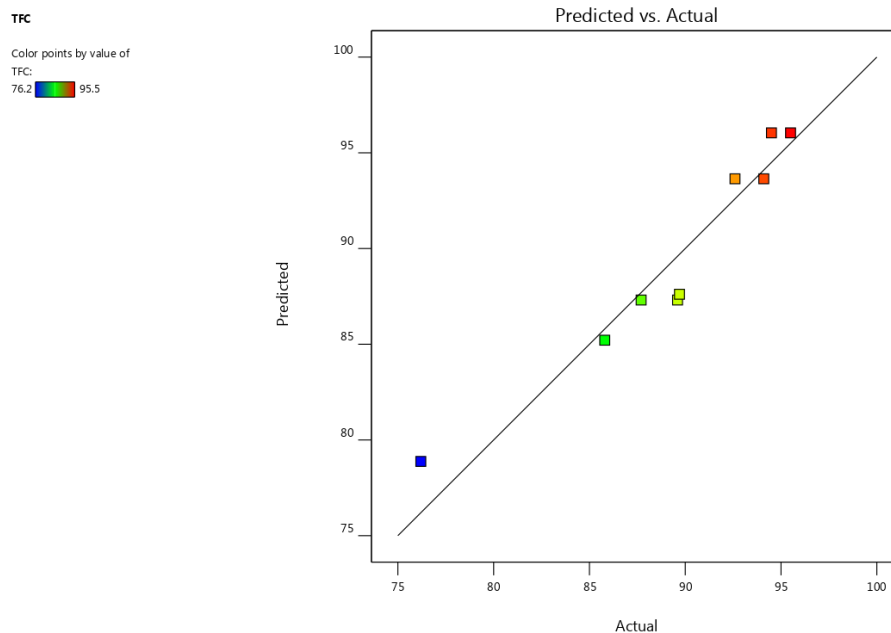
Τελικά, προκύπτει το τροποποιημένο μαθηματικό μοντέλο (Εξίσωση 9).

$$TFC = +92.94444 - 112.77778 \cdot \text{Viscoferm} + 84.77778 \cdot \text{Pectinex} + 93.70370 \cdot \text{Viscoferm}^2 - 61.85185 \cdot \text{Pectinex}^2 \quad (9)$$

Από το πλήρες μαθηματικό μοντέλο απαλείφθηκε ο όρος αλληλεπίδρασης Viscoferm*Pectinex και προέκυψε το τροποποιημένο μοντέλο. Η τιμή F του τροποποιημένου μοντέλου βελτιώθηκε από 8.76 σε 12.48 υποδηλώνοντας ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 1.57% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Η τιμή R² του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση της εξαρτημένης μεταβλητής TFC (ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών

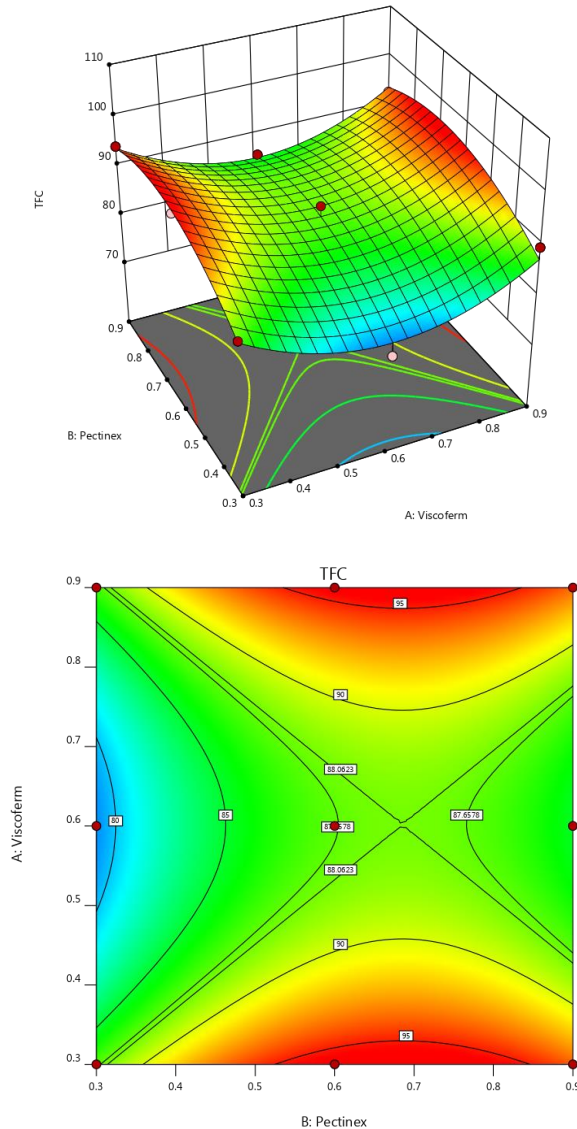
ενώσεων) είναι 0.9258, και συνεπώς συγκλίνει αρκετά στο 1. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και της μεταβλητής απόκρισης.

Στο Διάγραμμα 35 απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές τιμές που μετρήθηκαν. Όπως φαίνεται, η συσχέτιση είναι αρκετά καλή καθώς οι περισσότερες τιμές είναι κοντά στη διαγώνιο υποδεικνύοντας πως οι προβλεπόμενες τιμές προσεγγίζουν σημαντικά τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 35: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών TFC.

Παρακάτω παρατίθεται το τρισδιάστατο γράφημα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσεως των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και οι ισοϋψείς καμπύλες για την ανάλυση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (Διάγραμμα 36).



Διάγραμμα 36: (Α) Τρισδιάστατο διάγραμμα των επιφανειών απόκρισης, (Β) Ισοϋψείς καμπύλες του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, συναρτήσει των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού.

Η σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής (ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών) και των ανεξάρτητων μεταβλητών (συγκέντρωση του εκάστοτε ενζυμικού σκευάσματος) διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας τις ισοϋψείς καμπύλες (Διάγραμμα 36B). Για το εύρος των ενζυμικών συγκεντρώσεων που μελετήθηκε, εξήχθει το συμπέρασμα ότι η εφαρμογή μεσαίων έως υψηλών συγκεντρώσεων του εμπορικού σκευάσματος Pectinex Ultra Color (0.55-0.85% v/v) σε συνδυασμό με χαμηλές συγκεντρώσεις του σκευάσματος Viscoferm (0.3% v/v) επέφεραν τη μέγιστη απόδοση σε φλαβονοειδή (95 mg κατεχίνης /g πρώτης ύλης) κατά την εκχύλιση του περικαρπίου του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa canina L.*. Αντίθετα, η εφαρμογή μεσαίων έως υψηλών συγκεντρώσεων του εμπορικού σκευάσματος Viscoferm (0.35-0.85% v/v) σε συνδυασμό με πολύ μικρές συγκεντρώσεις του σκευάσματος Pectinex

Ultra Color (0.3% v/v) εμφάνισαν μικρές τιμές TFC δηλαδή (80-85 mg κατεχίνης / g πρώτης ύλης).

Αντιοξειδωτική Δράση (IC_{50})

Η συνεργιστική δράση των δύο εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων, στους συνδυασμούς που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Wilson Central Composite Design παρουσίασε θετικά αποτελέσματα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (Πίνακας 14).

Η προσαρμογή των μετρήσεων των δεικτών αντιοξειδωτικής ικανότητας IC_{50} οδήγησε στο παρακάτω γραμμικό μοντέλο (Εξίσωση 10):

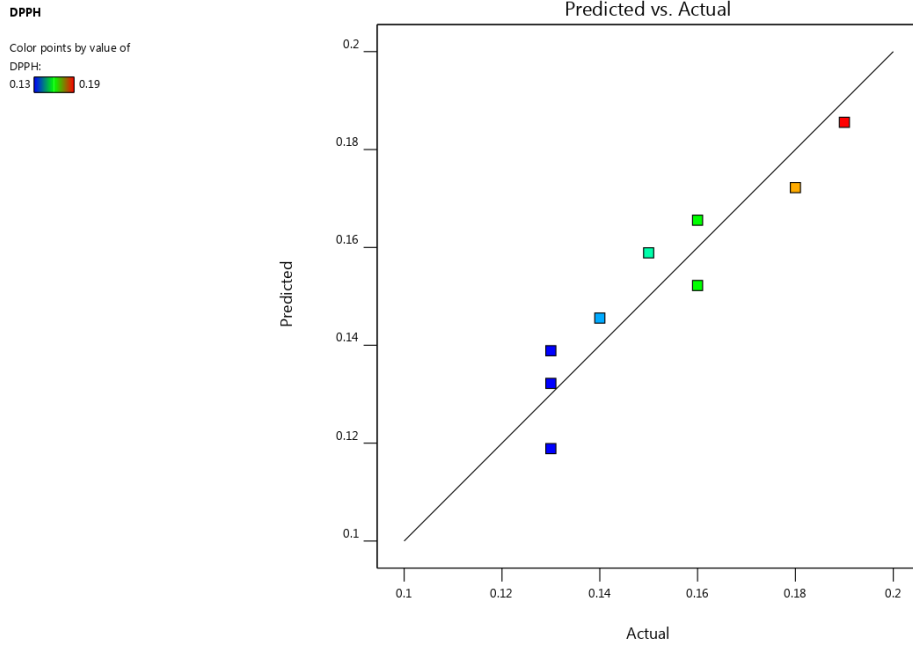
$$IC_{50} = +0.218889 - 0.066667 \cdot \text{Viscoferm} - 0.044444 \cdot \text{Pectinex} \quad (10)$$

Σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης διακύμανσης, και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές επηρεάζουν σημαντικά την απόκριση της διεργασίας σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Ισχυρότερη ωστόσο επίδραση παρουσιάζει το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm ($p < 0.01$). Η τιμή F του μοντέλου είναι 21.27 και υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον, βάσει της τιμής p υπάρχει μόλις 0.19% πιθανότητα μία τέτοια F-value να έχει προκύψει από θόρυβο (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για τους δείκτες αντιοξειδωτικής δράσης.

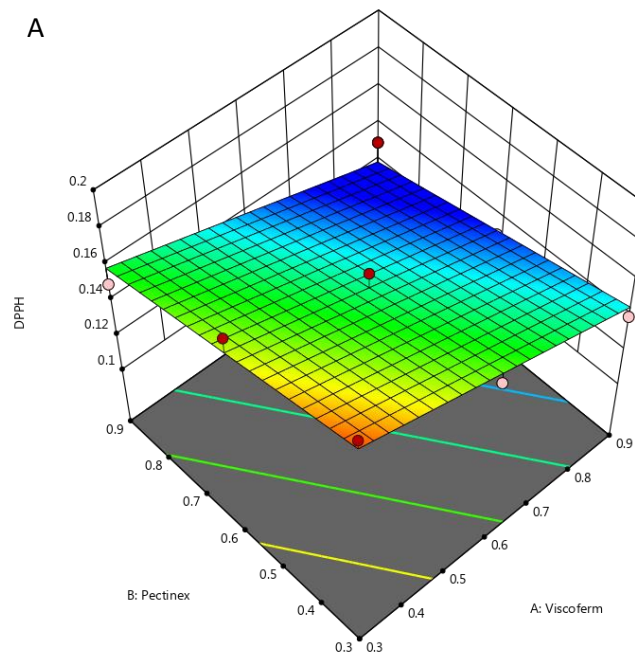
	F-value	p-value
Μοντέλο	21.27	0.0019
A-Viscoferm	29.45	0.0016
B-Pectinex	13.09	0.0111

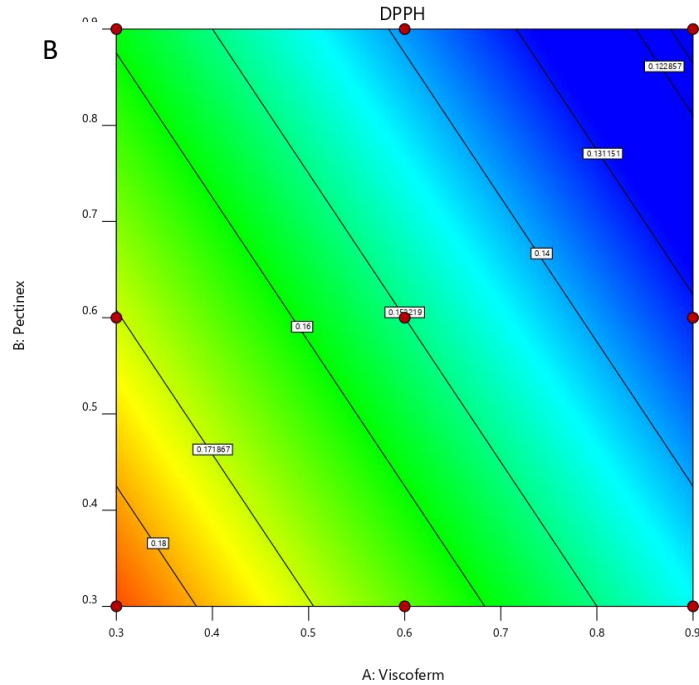
Η τιμή R^2 του μοντέλου που περιγράφει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων είναι 0.8764, ενώ η συσχέτιση των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών IC_{50} φαίνεται στο Διάγραμμα 37.



Διάγραμμα 37: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών των δεικτών αντιοξειδωτικής δράσης.

Παρακάτω παρατίθεται το τρισδιάστατο διάγραμμα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσεων δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, καθώς και οι ισοϋψείς καμπύλες για την ανάλυση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων (Διάγραμμα 38).





Διάγραμμα 38: (Α) Τρισδιάστατο διάγραμμα των επιφανειών απόκρισης, (Β) Ισοψείς καμπύλες αντιοξειδωτικής ικανότητας, συναρτήσει των ανεξάρτητων μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού

Η μελέτη της συνεργιστικής δράσης των δύο εμπορικών σκευασμάτων οδήγησε σε εκχυλίσματα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 38, ελάχιστη μεγαλύτερη επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το εμπορικό σκεύασμα Pectinex, ωστόσο και τα δύο ένζυμα συνεισφέρουν στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Οι μέγιστες εξετασθείσες συγκεντρώσεις των δύο εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων οδήγησαν και στην μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος της πρώτης ύλης, δηλαδή στην ελάχιστη τιμή του δείκτη IC_{50} .

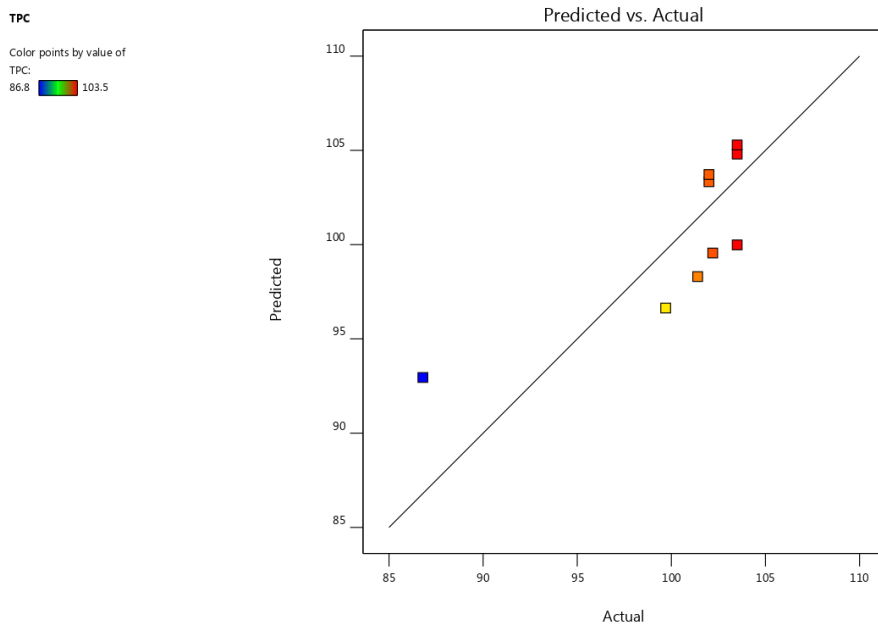
Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC), επιλέχθηκε το δευτεροβάθμιο μοντέλο. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση ANOVA έδειξε ότι κανένας όρος δεν είναι στατιστικά σημαντικός, ακόμη και μετά την απαλοιφή όρων που δεν συνεισφέρουν σημαντικά στην εκτίμηση της μετρούμενης απόκρισης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του δευτεροβάθμιου μοντέλου (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.

		Πλήρες 2 ^ο βάθμιο μοντέλο (R ² =0.9359)	
		F-value	p-value
Μοντέλο		0.9628	0.5489
A-Viscoferm		0.1287	0.7435
B-Pectinex		2.28	0.2279
AB-Viscoferm*Pectinex		0.0003	0.9863
A ² – Viscoferm ²		1.43	0.3182
B ² - Pectinex ²		0.9744	0.3964

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 17, το μοντέλο δεν μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντικό. Το Διάγραμμα 39 επαληθεύει την κακή συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 39: Συσχέτιση προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών TPC.

Βελτιστοποίηση

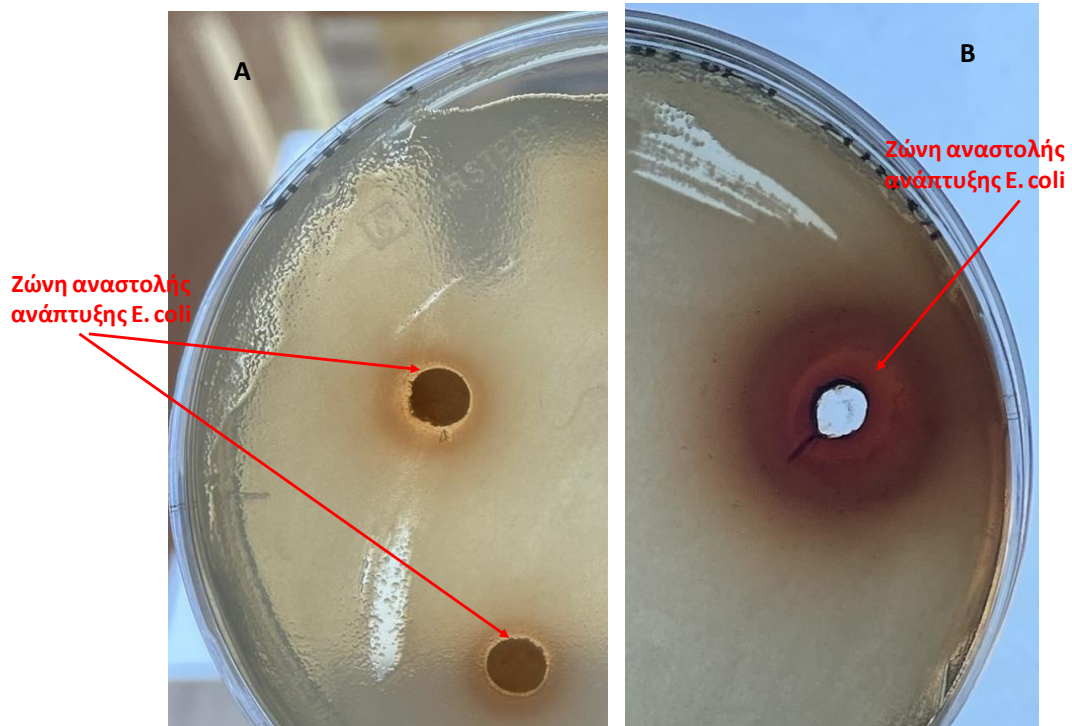
Τέλος, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών, ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών και δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η εξαρτημένη μεταβλητή ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων δεν τέθηκε ως όρος στη βελτιστοποίηση, καθώς δεν προέκυψε μαθηματικό μοντέλο που να περιγράφει την συγκεκριμένη απόκριση.

Η μεγιστοποίηση των εξαρτημένων μεταβλητών επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας τις βέλτιστες τιμές των συγκεντρώσεων των δύο εμπορικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color οι οποίες είναι 0.88% v/v και 0.71% v/v, αντίστοιχα. Με την επιλογή των προαναφερθέντων συγκεντρώσεων των ενζυμικών σκευασμάτων, επιτυγχάνεται η βέλτιστη απόκριση των συστημάτων στις επιθυμητές εκχυλιζόμενες ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, οι εξαρτημένες μεταβλητές λαμβάνουν τις ακόλουθες τιμές:

- ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών: TFC = 95.62 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης
- δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας: IC₅₀ = 0.13 μL εκχυλίσματος/mL δείγματος.

6.4 Έλεγχος αντιμικροβιακών ιδιοτήτων

Στην Εικόνα 21 παρουσιάζεται το οπτικό αποτέλεσμα που προέκυψε από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ιδιότητας του εκχυλίσματος του περικαρπίου του καρπού της άγριας τριανταφυλλιάς (*Rosa canina* L.).



Εικόνα 21.: Αντιμικροβιακή δράση εκχυλίσματος (Α) μέθοδος διάχυσης δίσκου (Β) μέθοδος διάχυσης πηγαδιού.

Ποιοτικά, η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος που προέρχεται από την συνδυασμένη δράση των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color στο φυτό *Rosa Canina L.* υποδηλώνεται από την εμφάνιση μιας ζώνης αναστολής ανάπτυξης του *E. Coli*, περιμετρικά των εμποτισμένων με το εκχύλισμα δισκίων και πηγαδιών (Εικόνα 21).

Στην περίπτωση του εμποτισμένου με το εκχύλισμα δισκίου παρατηρείται μία μικρή ζώνη αναστολής (Εικόνα 21Α). Αντίθετα, με τη μέθοδο διάχυσης πηγαδιού όπου το εκχύλισμα διαχέεται προς την βάση του τρυβλίου παρατηρείται μεγαλύτερη ζώνη αναστολής η οποία κυμαίνεται μεταξύ 12 mm και 15 mm (Εικόνα 21Β). Πληθώρα δημοσιεύσεων αναφέρονται στην αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του άνθους, του καρπού, του φλοιού αλλά και των σπόρων του φυτού *Rosa Canina L.* Για την άντληση των εκχυλισμάτων αυτών συχνά χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες όπως αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρας, χλωροφόρμιο, εξάνιο. Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί που δοκιμάζονται κατά τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων είναι οι εξής: *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* (Yilmaz & Ercisli. 2011, Naser et al., 2011, Mishra et al., 2011, Sathiya et al., 2013, Tahmasebi et al., 2020, Rovna et al, 2021).

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του άγριου τριαντάφυλλου οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Για παράδειγμα, οι Kumarasamy et al., (2003) αναφέρουν ότι η καμφερόλη εμφανίζει ισχυρή

αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Lactobacillus plantarum*, *Proteus mirabilis* και *Staphylococcus epidermidis*. Επιπλέον, οι Selahvarzian et al., (2018) έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων του καρπού αλλά και του ξηρού άνθους του άγριου τριαντάφυλλου παρουσιάζουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Escherichia coli* CCM 3988, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* *Alternaria alternate*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: Συμπεράσματα

7.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο ανάλυση της σύστασης του περικάρπιου του καρπού της *Rosa canina L.* (πρώτη ύλη), ενώ στην συνέχεια ακολούθησαν πειράματα συμβατικής εκχύλισης και ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (EYE) υπό διαφορετικές συνθήκες. Ο στόχος ήταν η μεγιστοποίηση της απόδοσης της διεργασίας, δηλαδή η μέγιστη άντληση βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό. Για τον λόγο αυτό, το εκάστοτε εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε με αναλυτικές μεθόδους ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική του δράση (IC₅₀).

Από τα πειράματα συμβατικής εκχύλισης εξήχθη το συμπέρασμα ότι, καθώς η συγκέντρωση της στερεής πρώτης ύλης στο σύστημα εκχύλισης αυξάνεται, η απόδοση (mg βιοδραστικών ενώσεων/ g πρώτης ύλης) σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτικές ενώσεις μειώνεται γραμμικά, ενώ αντίθετα οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις (mg βιοδραστικών ενώσεων/ L εκχυλίσματος) αυξάνονται γραμμικά. Οι τάσεις αυτές είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Rajha et al., 2014, Zhang et al., 2021). Η αύξηση της συγκέντρωσης των βιοδραστικών ενώσεων στα εκχυλίσματα συστημάτων αυξημένης συγκέντρωσης στερεού αιτιολογείται λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης ποσότητας των ενώσεων αυτών. Αντίστοιχα, η μείωση της απόδοσης κατά την αύξηση της στερεής πρώτης ύλης αναμένεται λόγω της αύξησης των παρεμποδίσεων των φαινομένων μεταφοράς (Casas & Domínguez González, 2017), αλλά και της μείωσης της βαθμίδας συγκέντρωσης των εκχυλιζόμενων ουσιών μεταξύ υγρού όγκου και στερεού (Goula, 2013).

Από την ανάλυση σύστασης της πρώτης ύλης σε ξηρή βάση προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

- 9.9±0.7 %^{w/w} κυτταρίνη
- 10.9±0.3 %^{w/w} ημικυτταρίνη
- 11.8±1.9%^{w/w} πηκτίνη

Επομένως, για τα πειράματα ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (EYE) επιλέχθηκαν το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm και το πηκτινολυτικό Pectinex Ultra Color, προκειμένου να διευκολύνουν την διάσπαση των κύριων συστατικών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος της πρώτης ύλης και να διευκολύνουν την απομάκρυνση των βιοδραστικών ενώσεων από αυτή.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της κοκκομετρίας της πρώτης ύλης στην απόδοση της διεργασίας συναρτήσεως του χρόνου εκχύλισης. Για την ολοκλήρωση της εκχύλισης των ζητούμενων ενώσεων απαιτήθηκαν 4 έως 6 ώρες σε κάθε περίπτωση. Από τα εξετασθέντα εύρη κοκκομετρίας: <500, 500-600 και 800-1000 μm, τις μεγαλύτερες

αποδόσεις εκχυλισθέντων βιοδραστικών ενώσεων (φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτικά) παρουσίασε το στερεό κοκκομετρίας <500 μm, για αυτό και όσα πειράματα ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν με στερεό αυτής της κοκκομετρίας. Μάλιστα οι τιμές TPC, TFC και IC₅₀ για την εκχύλιση στερεού κοκκομετρίας <500 μm ήταν 105.9 mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης, 103.9 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης και 1.19, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για κοκκομετρία στερεού 800-1000 μm ήταν 99.2 mg γαλλικού οξέος/g πρώτης ύλης, 91.1 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης και 1.33. Σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, το στερεό μικρότερης κοκκομετρίας εμφανίζει μεγαλύτερη διεπιφάνεια στερεού-υγρού και συνεπώς μειώνει τις παρεμποδίσεις των φαινομένων μεταφοράς και ευνοεί την διάχυση των συστατικών από την πρώτη ύλη προς τον υγρό όγκο (Chanioti et al., 2014). Επιπλέον, διευκολύνει την αλληλεπίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα και την διείσδυση του στο στερεό (Nadar et al., 2018). Στο πείραμα αυτό, επιβεβαιώθηκε και η καλύτερη απόδοση της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης έναντι της συμβατικής, όπως προβλέπεται και βιβλιογραφικά (Gligor et al., 2019), καθώς για EYE με ενζυμικό φορτίο 10 FPU/g πρώτης ύλης επιτεύχθηκε περίπου 35% αύξηση TPC, 73% αύξηση TFC και 34% μείωση του δείκτη IC₅₀ για εκχύλιση πρώτης ύλης κοκκομετρίας <500 μm και συγκέντρωσης 3% w/v.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της πρώτης ύλης στην απόδοση της εκχύλισης σε δύο διαφορετικά εύρη: (α) 1-7% w/v και (β) 20-50% w/v. Και στις δύο περιπτώσεις σημειώθηκε καθοδική τάση της απόδοσης σε TPC και TFC, αλλά και των τιμών του δείκτη IC₅₀, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του στερεού. Αντιθέτως, οι τιμές της συγκέντρωσης των βιοδραστικών ενώσεων στα εκχυλίσματα παρουσίασαν αυξητική τάση κατά την αύξηση της ποσότητας της πρώτης ύλης στα συστήματα εκχύλισης. Οι τάσεις της απόδοσης οφείλονται στο ότι όσο πυκνότερο είναι ένα σύστημα, τόσο αυξάνεται το ιξώδες αυτού και επομένως τόσο πιο δύσκολη καθίσταται η μεταφορά μάζας του διαλύτη και του ενζύμου από τον κύριο όγκο του υγρού προς την στερεή ύλη (Casas & Domínguez González, 2017). Επιπλέον, στα πυκνότερα συστήματα, η αρχική ταχύτητα μεταφοράς των εκχυλιζόμενων ουσιών από την στερεή στην υγρή φάση είναι υψηλότερη, επιτυγχάνοντας ταχύτερη μεταφορά μεγάλης ποσότητας ουσιών στον υγρό όγκο. Λόγω αυτού η βαθμίδα συγκέντρωσης των εκχυλιζόμενων ουσιών μεταξύ της στερεής ύλης και του υγρού διαλύτη είναι μικρότερη (Goula, 2013). Όσον αφορά στον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης, για εύρος 1-7% w/v, χρειάστηκαν και πάλι 4 έως 6 ώρες προκειμένου να απομακρυνθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα φαινολικών, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ωστόσο, στα πυκνότερα συστήματα συγκεντρώσεων 20-50% w/v ο απαιτούμενος χρόνος ενζυμικής επεξεργασίας ήταν σαφώς μεγαλύτερος λόγω αυξημένου ιξώδους, ενώ επίσης σημειώθηκαν και σημαντικές διαφοροποιήσεις της απαιτούμενης χρονικής διάρκειας μεταξύ των επιμέρους συστημάτων.

Στο πείραμα μελέτης της συνεργιστικής δράσης των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color υπό σταθερές τιμές ενζυμικής συγκέντρωσης (1% w/v από το κάθε ενζυμο), το ενζυμικό σκεύασμα Pectinex Ultra Color προστέθηκε

στην αρχή της διεργασίας ενώ το Viscoferm προστέθηκε μετά από: (α) 12 ώρες διεργασίας και (β) 24 ώρες διεργασίας. Από τους χαρακτηρισμούς των εκχυλισμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την απόδοση της διεργασίας σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτικές ενώσεις, παραμόνο μία μικρή θετική διαφορά των τιμών TPC, TFC και IC₅₀ μεταξύ των συστημάτων όπου το Viscoferm προστέθηκε στις 12 ώρες διεργασίας και εκείνων όπου προστέθηκε μετά από 24 ώρες. Πιθανότατα, η απομάκρυνση των συγκεκριμένων βιοδραστικών ενώσεων έχει ήδη ολοκληρωθεί πριν την προσθήκη του 2^{ου} ενζυμικού σκευάσματος.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν βάσει του πειραματικού σχεδιασμού Box-Wilson Central Composite Design εκχυλίσεις για 9 διαφορετικούς συνδυασμούς ενζυμικής συγκέντρωσης (%*v/v*) των σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color εντός του εύρους τιμών 0.3-0.9 % *v/v*. Όσον αφορά την απαιτούμενη χρονική διάρκεια της εκχύλισης, παρατηρήθηκε ότι μετά το πέρας 2 έως 6 ωρών οι τιμές TPC, TFC και IC₅₀ είχαν σταθεροποιηθεί. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τους χαρακτηρισμούς των εκχυλισμάτων για $t_{\text{δειγματοληψίας}}=2\text{h}$ οδήγησε στην εξαγωγή των εξής μαθηματικών μοντέλων (Εξισώσεις 8 και 9):

$$TFC = +92.94444 - 112.77778 \cdot \text{Viscoferm} + 84.77778 \cdot \text{Pectinex} + 93.70370 \cdot \text{Viscoferm}^2 - 61.85185 \cdot \text{Pectinex}^2 \quad (\text{Εξ.9})$$

$$IC_{50} = +0.218889 - 0.066667 \cdot \text{Viscoferm} - 0.044444 \cdot \text{Pectinex} \quad (\text{Εξ.10})$$

τα οποία περιγράφουν ικανοποιητικά την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και του δείκτη αντιοξειδωτικής ικανότητας IC₅₀ των εκχυλισμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης του σκευάσματος Viscoferm και της συγκέντρωσης του σκευάσματος Pectinex Ultra Color (ανεξάρτητες μεταβλητές). Η στατιστική ανάλυση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων δεν κατέληξε σε κάποιο στατιστικά σημαντικό μοντέλο. Σε τελικό στάδιο της μελέτης, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας, για την εύρεση των τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών που μεγιστοποιούν ταυτόχρονα την ποσότητα φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Οι βέλτιστες τιμές συγκέντρωσης των δύο ενζυμικών σκευασμάτων (ανεξάρτητες μεταβλητές) που υπολογίστηκαν ήταν 0.88% *v/v* Viscoferm και 0.71% *v/v* Pectinex Ultra Color.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την συνεργιστική δράση των ενζυμικών σκευασμάτων Viscoferm και Pectinex Ultra Color μέσω των μεθόδων διάχυσης δίσκου και διάχυσης πηγαδιού. Ο έλεγχος εφαρμόστηκε σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *E. Coli*, οι οποίες εμφάνισαν ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του μικροοργανισμού περιμετρικά των δισκίων και των πηγαδιών αντίστοιχα.

7.2 Προτάσεις μελλοντικής διερεύνησης & Προοπτικές

Βάσει της παραπάνω μελέτης και ανάλυσης, μπορούν να προκύψουν περαιτέρω πεδία έρευνας και προοπτικές όσον αφορά στην καλύτερη αξιοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina L.*). Πιο συγκεκριμένα θα μπορούσαν να εξετασθούν τα παρακάτω:

- Η επίδραση διαφορετικών παραμέτρων της εκχύλισης (ρυθμός ανάδευσης, χρόνος εκχύλισης, κ.α.), αλλά και η μελέτη των ήδη εξετασθέντων παραμέτρων σε διαφορετικά εύρη τιμών.
- Η δράση διαφορετικών ενζύμων στην απόδοση της εκχύλισης.
- Εκτέλεση νέου πειραματικού σχεδιασμού υπό διαφορετικό εύρος ενζυμικών φορτίων ή για μικρότερους χρόνους εκχύλισης.
- Η δοκιμή βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NADES) υπό τις εξετασθείσες πειραματικές συνθήκες, για την απομάκρυνση βιοδραστικών ενώσεων από την πρώτη ύλη.
- Ο προσδιορισμός βιταμίνης C σε αποξηραμένη αλλά και νωπή πρώτη ύλη.
- Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων.
- Έρευνα και ανάπτυξη διαφόρων φαρμακευτικών αλλά και καλλυντικών προϊόντων εμπλουτισμένων με εκχύλισμα άγριου τριαντάφυλλου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agbor, G. A., Vinson, J. A., & Donnelly, P. E. (2014). Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*, 3(8), 147-156.
- Akin, M., & Saki, N. (2019). 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. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 42(7-8), 204-216.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.
- Alirezalu, K., Pateiro, M., Yaghoubi, M., Alirezalu, A., Peighambardoust, S. H., & Lorenzo, J. M. (2020). Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and techno-functional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 292-306.
- Andoğan, B. C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). *Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Archives of pharmacal research*, 25(6), 860-864.
- Anokwuru, C. P., Anyasor, G. N., Ajibaye, O., Fakoya, O., & Okebugwu, P. (2011). Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three nigerian medicinal plants. *Nature and Science*, 9(7), 53-61.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th. Ed. AOAC Inc., USA.
- Aravantinos-Zafiris, G., Oreopoulou, V., Tzia, C., Thomopoulos, C.D. (1994). Fibre fraction from orange peel residues after pectin extraction. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 27, 468–471.
- Awuchi, C. G. (2019). The biochemistry, toxicology, and uses of the pharmacologically active phytochemicals: alkaloids, terpenes, polyphenols, and glycosides. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 2-2.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Bhave, A., Schulzova, V., Chmelarova, H., Mrnka, L., & Hajslova, J. (2017). Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 681-690.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, *81*(1), 236-242.
- Caritá, A. C., Fonseca-Santos, B., Shultz, J. D., Michniak-Kohn, B., Chorilli, M., & Leonardi, G. R. (2020). Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *24*, 102117.
- Casas, M. P., & González, H. D. (2017). Enzyme-assisted aqueous extraction processes. In *Water extraction of bioactive compounds* (pp. 333-368). Elsevier.
- Chanioti, S., Liadakis, G., & Tzia, C. (2014). Solid-liquid extraction. *Food Engineering Handbook: Food Process Engineering*, *2*, 247-280.
- Cheng, X., Bi, L., Zhao, Z., & Chen, Y. (2015, August). Advances in enzyme assisted extraction of natural products. In *3rd International conference on material, mechanical and manufacturing engineering (IC3ME 2015)* (pp. 371-375). Atlantis Press.
- Cutler, R. (2003). SECONDARY METABOLITES | Medicinal and Pharmaceutical Uses, *Encyclopedia of Rose Science*, Elsevier, 716-726.
- da Silva, R. F., Carneiro, C. N., de Sousa, C. B. D. C., Gomez, F. J., Espino, M., Boiteux, J., & Dias, F. D. S. (2022). Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: a review. *Microchemical Journal*, 107184.
- Dąbrowska, M., Maciejczyk, E., & Kalembe, D. (2019). Rose hip seed oil: Methods of extraction and chemical composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *121*(8), 1800440.
- Demir, F., & Özcan, M. (2001). Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey. *Journal of food engineering*, *47*(4), 333-336.
- Fan, C., Pacier, C., Martirosyan, D.M. (2014) Rose hip (*Rosa canina* L): A functional food perspective. *Functional Foods in Health and Disease*. *4*(11), 493-509.
- Fetni, S., Bertella, N., Ouahab, A., Zapater, J. M. M., & Fernandez, S. D. P. T. (2020). Composition and biological activity of the Algerian plant *Rosa canina* L. by HPLC-UV-MS. *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(1), 1105-1119.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, *14*(15), 4135.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., & Ferreira, I. C. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols—A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 302-315.

Goula, A. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil–Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 492-498.

Gupta, A., & Pandey, A. K. (2020). Antibacterial lead compounds and their targets for drug development. In *Phytochemicals as lead compounds for new drug discovery* (pp. 275-292). Elsevier.

Huynh, N. T., Smagghe, G., Gonzales, G. B., Van Camp, J., & Raes, K. (2014). Enzyme-assisted extraction enhancing the phenolic release from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) outer leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7468-7476.

Jha, A. K., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*.119, 579-591

Jiménez, S., Jiménez-Moreno, N., Luquin, A., Laguna, M., Rodríguez-Yoldi, M. J., & Ancín-Azpilicueta, C. (2017). Chemical composition of rosehips from different *Rosa* species: an alternative source of antioxidants for the food industry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(7), 1121-1130.

Kizil, Suleyman, Toncer, Ozlem, Sogut, Tahsin. (2018). Mineral Content and Fatty Acid Compositions of Wild and Cultivated Rose Hip (*Rosa canina* L) Fresenius Environmental Bulletin 27 (2), 744-748

Khezerlou, A., & Jafari, S. M. (2020). Nanoencapsulated bioactive components for active food packaging. In *Handbook of food nanotechnology* (pp. 493-532). Academic Press.

Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., & Ombódi, A. (2018). Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species. *Medicines*, 5(3), 84.

Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Rashid, M. A., & Sarker, S. D. (2003). Bioactive flavonoid glycosides from the seeds of *Rosa canina*. *Pharmaceutical biology*, 41(4), 237-242.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.

Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24.

Lattanzio, F., Greco, E., Carretta, D., Cervellati, R., Govoni, P., & Speroni, E. (2011). In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 880-885.

Lawther, J.M., Sun, R., Banks, W.B. (1995). Extraction, fractionation, and characterization of structural polysaccharides from wheat straw. *J. Arg. Food Chem.* 43, 667–675.

- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., & Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in plant science*, *8*, 1867.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2017). Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species. *International journal of molecular sciences*, *18*(6), 1137.
- Mishra, R. P., Arshad, M., & Sami, A. (2011). Antibacterial properties of *Rosa indica* (L.) Stem, leaves, and flowers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*, *12*(12).
- Moldovan, C., Babotă, M., Mocan, A., Menghini, L., Cesa, S., Gavan, A., ... & Barros, L. (2021). Optimization of the drying process of autumn fruits rich in antioxidants: a study focusing on rosehip (*Rosa canina* L.) and sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) and their bioactive properties. *Food & Function*, *12*(9), 3939-3953.
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, *108*, 309-330.
- Naser, M., Elham, B., Fateme, M., Zahra, B., & Soghra, Y. (2011). Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(18), 4584-4589.
- Nikaeen, G., Yousefinejad, S., Rahmdel, S., Samari, F., & Mahdavinia, S. (2020). Central composite design for optimizing the biosynthesis of silver nanoparticles using plantago major extract and investigating antibacterial, antifungal and antioxidant activity. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-16.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, *5*(35), 27986-28006.
- Nowak, R., & Gawlik-Dziki, U. (2007). Polyphenols of *Rosa* L. leaves extracts and their radical scavenging activity.
- Ognyanov, M., Denev, P., Teneva, D., Georgiev, Y., Taneva, S., Totseva, I., ... & Momchilova, S. (2022). Influence of Gamma Irradiation on Different Phytochemical Constituents of Dried Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits. *Molecules*, *27*(6), 1765.
- Ognyanov, M. H., Hodzhova, M. M., Petkova, N. T., Denev, P. N., Georgiev, Y. N., & Kratchanova, M. G. (2018). Isolation and characterization of plant cell wall material from rose hip fruits. *BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS*, 530.
- Paunović, D., Kalušević, A., Petrović, T., Urošević, T., Djinović, D., Nedović, V., & Popović-Djordjević, J. (2019). Assessment of chemical and antioxidant properties of fresh and dried rosehip (*Rosa canina* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *47*(1), 108-113.

- Pizzi, A. (2021). Tannins medical/pharmacological and related applications: A critical review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100481.
- Rajha, H. N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- Roman, I., Stănilă, A., & Stănilă, S. (2013). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-10.
- Rovná, K., Petrová, J., Terentjeva, M., Černá, J., & Kačániová, M. (2021). Antimicrobial activity of *Rosa canina* flowers against selected microorganisms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 62-64.
- Santos, D. I., Saraiva, J. M. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In *Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds* (pp. 23-54). Woodhead Publishing.
- Sathiya, S., Karthikeyan, B., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., & Iqbal, M. (2008). Antibiogram of *Catharanthus roseus* extracts. *Global J Mol Sci*, 3(1), 01-07.
- Selahvarzian, A., Alizadeh, A., Baharvand, P. A., Eldahshan, O. A., & Rasoulilian, B. (2018). Medicinal Properties of *Rosa canina* L. *Herbal Medicines Journal (Herb Med J)*, 77-84.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report NREL/TP-510- 42618.
- Tahmasebi, S., & Ahmaizadeh, Ch. (2020). Comparative Study of Antibacterial Effects of Polar, Semi-Polar, And Non-Polar Fractions of *Rosa Canina* Extract Against Some Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Microbiology*, 2020, 7 (2), 82-91.

Werlemark, G. (2003). GENETICS | Inheritance in the Dogrose, Editor(s): Andrew V. Roberts, Encyclopedia of Rose Science, Elsevier, 292-299.

Winther, K., Hansen, A. S. V., & Campbell-Tofte, J. (2016). Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, 6, 11-23.

Yilmaz, S. O., & Ercisli, S. E. Z. A. I. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of fruits of some rose species from Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(4), 6407-6411.

Zhang, M., Ma, W., Wang, C., Yang, X., Lou, Y., Xia, X., & Xu, H. (2021). Optimization of Enzyme-Assisted Extraction and Purification of Flavonoids from *Pinus koraiensis* Nut-Coated Film and Antioxidant Activity Evaluation. *Molecules*, 26(7), 1950.