



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία

Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa Canina* L.) με συνδυασμό ενζυμικής προκατεργασίας και πράσινων διαλυτών.



Νεφέλη Φατούρου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Διομή Μαμμά

ΑΘΗΝΑ 2023

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το Ακαδημαϊκό Έτος 2022-2023 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Διομής Μαμμά.

Μετά τη διεκπεραίωση της Διπλωματικής μου Εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν σε αυτό. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Καθηγήτρια Διομή Μαμμά για τη διαρκή καθοδήγησή της με το θέμα που μου ανέθεσε και τη Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για τις καθοριστικής σημασίας συμβουλές της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Στυλιανή Καλατζή και την Υποψήφια Διδάκτορα Ζαφειρία Λεμονή για τη συνεργασία, την καθοδήγηση σε κάθε στάδιο και τη συνεχή παρουσία σε ό,τι χρειαζόμουν. Τέλος, ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Άννα Καραδένδρου, καθώς και όλη την εργαστηριακή ομάδα της κυρίας Δέτση, για την παροχή υλικών και μεθόδων όποτε το χρειαζόμουν.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της ενοποίησης δύο πράσινων τεχνικών εκχύλισης, της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης σε συνδυασμό με την εκχύλιση με χρήση φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES) με στόχο (α) την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας, (β) την ενίσχυση της βιοδραστικότητας του εκχυλίσματος και (γ) στην αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης με μία φιλική προς το περιβάλλον τεχνική.

Η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες, όπως ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, αποκτά ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον λόγω των βιοδραστικών συστατικών που περιέχουν, συμπεριλαμβανομένων φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων, βιταμινών, τερπενίων και καροτενοειδών, τα οποία εμφανίζουν εκτός των άλλων αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες.

Η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση στηρίζεται στη χρήση υδρολυτικών ενζύμων και στοχεύει στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, λόγω της αποφυγής της χρήσης τοξικών οργανικών διαλυτών, των ήπιων λειτουργικών συνθηκών και των ενισχυμένων αποδόσεων χάρη στην υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων. Η εκχύλιση με Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) είναι μία πρόσφατη, καινοτόμα ανακάλυψη πολλά υποσχόμενη για αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών. Η φυσική προέλευσή τους και η προσαρμοστικότητά τους, τους καθιστά κατάλληλους για πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενζυμική σταθερότητα πέντε εμπορικών σκευασμάτων με κυτταρινολυτική (Cellic[®]CTec3 HS, Cellic[®]CTec2 HS), ημικυτταρινολυτική (Viscoferm[®]), πηκτινολυτική (Pectinex[®] Ultra Color), και πρωτεολυτική (Neutrase[®]) δράση σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 και σε Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό, σε θερμοκρασίες 40 και 50°C για 24 ώρες. Υπολογίστηκαν, οι σταθερές θερμικής απενεργοποίησης k_d (h^{-1}), οι χρόνοι ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$), οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ($E_{(a)d}$) των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων. Οι Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες που επιλέχθηκαν ήταν η Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε μοριακή αναλογία 1:2 και 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35, 50% v/v. Βρέθηκε ότι οι NaDES προστατεύουν τα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα καθότι υπολογίστηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι ημιζωής και μεγαλύτερες τιμές της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης συγκριτικά με τα σκευάσματα που επωάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα. Επίσης προέκυψε ότι τα ενζυμικά σκευάσματα απενεργοποιούνται πιο γρήγορα στους 50°C. Ο βέλτιστος διαλύτης για τη σταθερότητα των ενζυμικών σκευασμάτων εμφανίστηκε ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη H_2O σε ποσοστό 20% v/v σε θερμοκρασία εκχύλισης τους 40°C.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της χρήσης των επιλεγμένων από το πρώτο στάδιο εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων με NADES στην απόδοση της εκχύλισης του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.* με

συνδυασμό NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη H_2O σε ποσοστά 20, 35 και 50% v/v. Η θερμοκρασία εκχύλισης ρυθμίστηκε στους 40°C, το ενζυμικό φορτίο στο 1% v/v, ρυθμός ανάδευσης 1300 rpm σε thermomixer και περιεκτικότητα στερεής πρώτης ύλης στο 7.5% με κοκκομετρία <500μm. Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και την αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.

Οι καλύτερες αποδόσεις σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) επιτεύχθηκαν για NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη H_2O σε ποσοστό 20% v/v μέχρι τις 2 ώρες εκχύλισης σε θερμοκρασία 40°C για το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic®CTec3 HS.

Η εφαρμογή των NaDES Βεταΐνη Γλυκερόλη στην EYE παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι αποτελούν συστατικά των καλλυντικών κρεμών και σε δυνητική κλιμάκωση μεγέθους για βιομηχανική εφαρμογή δεν θα χρειάζεται να απομακρυνθούν, επιπλέον η EYE με NaDES είναι πιο αποδοτική στους 40°C σε 2ωρες συγκριτικά με την απλή EYE στους 50°C γεγονός που ενισχύει την απόφαση για βιομηχανική εφαρμογή καθώς το ζητούμενο στην βιομηχανία είναι η εφαρμογή διεργασιών με μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις. Τέλος η συνθήκη της EYE με NaDES που επέφερε τις καλύτερες αποδόσεις σε βιοενεργά συστατικά περιείχε το μικρότερο ποσοστό νερού ως συνδιάλυτη στον NaDES, γεγονός που αποτελεί ακόμα ένα πλεονέκτημα για βιομηχανική εφαρμογή καθώς υπάρχει απαίτηση για μικρή περιεκτικότητα σε νερό για αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών στις καλλυντικές κρέμες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελούν μία καλή βάση για την περαιτέρω διερεύνηση και τον σχεδιασμό της διεργασίας για βιομηχανική εφαρμογή.

Abstract

The aim of the present thesis is to study the integration of two green extraction techniques, enzyme-assisted extraction combined with extraction using naturally deep eutectic solvents (NaDES) in order to (a) increase the process efficiency, (b) enhance the bioactivity of the extract and (c) replace conventional extraction methods with an environmentally friendly technique.

The extraction of bioactive compounds from plant raw materials, such as the fruit of the wild rose *Rosa Canina L.*, is of increasing interest due to the bioactive constituents they contain, including phenolic and antioxidant compounds, vitamins, terpenes and carotenoids, which exhibit, among others, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, antimicrobial and cardioprotective properties.

Enzyme-assisted extraction is based on the use of hydrolytic enzymes and aims at the degradation of the plant cell wall, it has advantages over conventional extraction methods due to the avoidance of the use of toxic organic solvents, mild operating conditions and enhanced yields due to the high selectivity of the enzymes. Extraction with Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) is a recent, innovative discovery promising for the replacement of organic solvents. Their natural origin and adaptability make them suitable for many biotechnological applications.

In this thesis, the enzymatic stability of five commercial formulations with cellulolytic (Cellic[®]CTec3 HS, Cellic[®]CTec2 HS), semicellulolytic (Viscoferm[®]), pectinolytic (Pectinex[®] Ultra Color), and proteolytic (Neutrase[®]) activity in pH=7.5 buffer was studied and in Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) with different percentages of co-solvent water, at temperatures of 40 and 50 °C for 24 hours. The thermal inactivation constants k_d (h^{-1}), half-life times ($t_{1/2}$), sub-digestion times D and thermal inactivation energy ($E_{(a)d}$) of commercial enzyme formulations were calculated. The Natural Deep Eutectic Solvents selected were Betaine-Glycerol in molar ratio of 1:2 and 1:3 with co-solvent water at 20, 35, 50% v/v. NaDES were found to protect the commercial enzyme formulations by increasing the half-life and thermal deactivation energy. It was also found that the enzyme formulations are deactivated faster at 50 °C. NaDES Betaine-Glycerol 1:3 with addition of co-solvent H_2O at 20% v/v and temperature at 40°C is chosen as the optimum solvent for the stability of the enzyme formulations.

The effect of using the commercial enzyme formulations with NADES selected from the first stage on the performance of the extraction of wild rose *Rosa Canina L.* fruit pericarp by a combination of NaDES Betaine-Glycerol 1:3 with co-solvent H_2O at 20, 35 and 50% v/v was then investigated. The extraction temperature was set at 40°C, enzyme loading at 1% v/v, stirring rate 1300 rpm in a thermomixer and solids content at 7.5% with a grain size <500µm. The extracts were characterized for total phenolic compound content (TPC) by Folin-Ciocalteu method, total flavonoid compound content (TFC) by aluminum chloride colorimetric method and antioxidant activity by DPPH radical binding capacity determination method.

The best performances in total phenolic content (TPC) and flavonoid content (TFC) were obtained for NaDES Betaine-Glycerol 1:3 with co-solvent H_2O at 20% v/v up to

2 hours of extraction at 40°C and for the cellulolytic enzyme formulation Cellic®CTec3 HS.

Ευρετήριο Εικόνων

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1. Οι ανθοκυανίνες πελαργονιδίνη, κυανιδίνη και δελφινιδίνη και το χρώμα που προσδίδουν σε κάθε άνθος (Croteau et al., 2000). | 3 |
| Εικόνα 2. Χημική δομή του στεροειδούς κορτιζόνη | 5 |
| Εικόνα 3. Χημική δομή έξι καροτενοειδών που απαντώνται συχνά στις τροφές: α-καροτένιο, β-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη, λυκοπένιο και ζεαξανθίνη (Ellison, 2016). | 6 |
| Εικόνα 4. Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών ουσιών (Mehta et al., 2015). | 7 |
| Εικόνα 5. Ανθός και θάμνος του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa Canina</i> L..... | 9 |
| Εικόνα 6. Καρπός του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa Canina</i> L. στην αρχική και σε αποξηραμένη μορφή..... | 10 |
| Εικόνα 7. Γραμματόσημα ανά τα χρόνια με απεικονίσεις του άγριου τριαντάφυλλου <i>Rosa Canina</i> L. (Galore International Journal of Health Sciences and Research (www.gijhsr.com) 5 Vol.2; Issue: 4; October-December 2017). | 11 |
| Εικόνα 8. Διάταξη εκχύλισης με υπερήχους (Stéphane et al., 2021). | 18 |
| Εικόνα 9. Διάταξη εκχύλισης με μικροκύματα (Stéphane et al., 2021). | 18 |
| Εικόνα 10. Διάταξη Εκχύλισης με Υπερκρίσιμα Ρευστά (Stéphane et al., 2021). | 19 |
| Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων (Loix et al., 2017)..... | 25 |
| Εικόνα 12: Βασική αρχή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες..... | 25 |
| Εικόνα 13. Ο υπολογισμός της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών με τη μέθοδο 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)..... | 35 |
| Εικόνα 14. Υπολογισμός της ενεργότητας πρωτεασών με τη μέθοδο της υδρόλυσης της αζοκαζείνης. | 37 |
| Εικόνα 15. Οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της φαινόλης και του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (Bibi Sadeer et al., 2020)..... | 39 |
| Εικόνα 16. Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu..... | 41 |
| Εικόνα 17. Δημιουργία συμπλόκου του φλαβονοειδούς κερσετίνη με τον Al ³⁺ (Shraim et al., 2021, Ρεκαλ & Pyrzyńska, 2014). | 41 |
| Εικόνα 18. Συμπλοκοποίηση Al ³⁺ και φλαβονοειδών (στη συγκεκριμένη περίπτωση η κερσετίνη) παρουσία NaNO ₂ (Shraim et al., 2021, Ρεκαλ & Pyrzyńska, 2014). | 42 |
| Εικόνα 19. Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου..... | 44 |
| Εικόνα 20. Μηχανισμός δράσης του 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιου (DPPH) με φαινολικό ΑΟ (ArOH) (Bibi Sadeer et al., 2020). | 44 |
| Εικόνα 21. Μεθανολικό διάλυμα DPPH 2.5% w/v | 46 |
| Εικόνα 22. Μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. | 46 |

Ευρετήριο Πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1. Αντιοξειδωτικές ουσίες, τα ένζυμα με τα οποία εκχυλίζονται και οι πρώτες ύλες από τις οποίες προέρχονται (Nadar et al., 2018)..... | 26 |
| Πίνακας 2. Κατάλογος αντιδραστηρίων, τυποποιημένων χημικών παρασκευασμάτων και αντίστοιχων εταιρειών | 32 |
| Πίνακας 3. Κατάλογος οργάνων και συσκευών | 33 |
| Πίνακας 5. Τιμές pH των NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 για ποσοστά συν-διαλύτη (H ₂ O) 0, 20, 35 και 50% v/v..... | 34 |
| Πίνακας 4. Χαρακτηρισμός των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων | 47 |
| Πίνακας 6. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicTec3 HS στους 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 20% | 50 |
| Πίνακας 7. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicTec3 HS στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35% και 50% (v/v). | 52 |
| Πίνακας 8. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής (t _{1/2}), χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και σταθερές θερμικής απενεργοποίησης του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color για 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20%. | 54 |
| Πίνακας 9. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 35 και 50%. | 56 |
| Πίνακας 10. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase® στους 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20% (v/v). | 58 |
| Πίνακας 11. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του πηκτινολυτικού σκευάσματος Neutrase® στους 40°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 35% και 50% (v/v). | 59 |
| Πίνακας 12. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm στους 40°C και 50 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v). | 61 |
| Πίνακας 13. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35 και 50% (v/v). | 63 |
| Πίνακας 14. Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης R. canina L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (H ₂ O) 20% για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για t=1,2,3,4. | 71 |
| Πίνακας 15. Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης R. canina L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με 35% συν-διαλύτη H ₂ O για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για t=1,2,3,4. | 71 |
| Πίνακας 16. Δείκτης IC ₅₀ των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης R. canina L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό 50% H ₂ O για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για t=1,2,3,4. | 72 |

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1. Καμπύλη συγκέντρωσης ισοδύναμων γλυκόζης (A) και ξυλόζης (B) ως προς την απορρόφηση στα 540nm..... | 34 |
| Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (mg/L) για τον προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu..... | 40 |
| Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (mg/mL) για τον προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου. | 43 |
| Διάγραμμα 4. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicTec3 HS σε (A) Bet:Gly 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C, (B) Bet:Gly 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C, (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C..... | 48 |
| Διάγραμμα 5. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicTec3 HS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v) (●) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (●)..... | 51 |
| Διάγραμμα 6. Ενζυμική σταθερότητα του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C. | 54 |
| Διάγραμμα 7. Ενζυμική σταθερότητα του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex Ultra Color σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v) και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. | 55 |
| Διάγραμμα 8. Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase® σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) στους (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) στους (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. | 57 |
| Διάγραμμα 9. Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v), και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. | 59 |
| Διάγραμμα 10. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. | 60 |
| Διάγραμμα 11. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40°C. Σύμβολα: (●) Bet:Gly 1:3 | |

με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v), και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών °C..... 62

Διάγραμμα 12. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 20% (v/v), για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) NaDES, (●) Cellic® CTec2 HS, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Viscoferm® και (●) Neutrase®..... 65

Διάγραμμα 13. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη 35%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) NaDES, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) Cellic® CTec2 HS και (●) Viscoferm®..... 66

Διάγραμμα 14. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με συν-διαλύτη 50%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) Cellic® CTec2 HS και (●) Viscoferm®..... 67

Διάγραμμα 15. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 20%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec2 HS, (●) Cellic® CTec2 HS, (●) Pectinex®, (●)Viscoferm® και (●) Neutrase®..... 68

Διάγραμμα 16. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 35%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●)Neutrase®, (●)Viscoferm® και (●)Cellic® CTec2 HS..... 69

Διάγραμμα 17. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 50%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●)Neutrase®, (●)Viscoferm® και (●)Cellic® CTec2 HS..... 70

Διάγραμμα 18. Σύγκριση της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων της EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και της EYE με NaDES με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (Α) 20% v/v (Β) 35v/v, (Γ) 50% v/v, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα (■) EYE σε NADES με διαφορετικό ποσοστό συνδιαλύτη νερό, (■) απλή EYE 73

Διάγραμμα 19. Σύγκριση της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων της EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και της EYE με NaDES με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (Α) 20% v/v (Β) 35v/v, (Γ) 50% v/v, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για

σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα (■) EYE σε NADES με διαφορετικό ποσοστό
συνδιαλύτη νερό, (■) απλή EYE 75

Συντομογραφίες

| Συντομογραφία | Επεξήγηση |
|---------------|--|
| EYE | Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση |
| EAE | Enzyme-Assisted Extraction |
| UAE | Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction) |
| MAE | Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction) |
| SFE | Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction) |
| TFC | Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content) |
| TPC | Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content) |
| DES | Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents) |
| NaDES | Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents) |
| IL | Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids) |
| FPU | Filter Paper Unit |
| IC_{50} | (Half-maximal) Inhibitory Concentration |
| DPPH | α,α-διφαινυλ-β-πικρυλυδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) |
| Bet: Gly | Βεταΐνη: Γλυκερόλη |

Περιεχόμενα

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | Θεωρητικό Μέρος | 1 |
| 1.1. | Φυσικά προϊόντα | 1 |
| 1.1.1. | Εισαγωγή | 1 |
| 1.1.2. | Βιοδραστικά Φυσικά Προϊόντα (Bioactive Natural Products) | 1 |
| 1.1.3. | Πρωτογενής μεταβολίτες (primary metabolite) | 1 |
| 1.1.4. | Δευτερογενής μεταβολίτες (secondary metabolite)..... | 2 |
| 1.1.4.1 | Φαινολικές ενώσεις..... | 2 |
| 1.1.4.2. | Αλκαλοειδή..... | 4 |
| 1.1.4.3. | Στεροειδή..... | 5 |
| 1.2. | Αντιοξειδωτικά | 7 |
| 1.3. | <i>Rosa Canina</i> L. | 9 |
| 1.3.1. | Μορφολογία..... | 9 |
| 1.3.2. | Ιστορική αναδρομή | 10 |
| 1.3.3. | Σύσταση του περικαρπίου του <i>R. canina</i> L..... | 11 |
| 1.3.4. | Θεραπευτικές Ιδιότητες του περικαρπίου του <i>R. canina</i> L..... | 12 |
| 1.4. | Μέθοδοι εκχύλισης..... | 14 |
| 1.4.1. | Συμβατική εκχύλιση | 15 |
| 1.4.2. | Μη συμβατική εκχύλιση..... | 17 |
| 1.4.3. | Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση | 22 |
| 2. | Μέθοδοι και Υλικά | 32 |
| 2.1. | Υλικά & Όργανα..... | 32 |
| 2.2. | NaDES | 33 |
| 2.3. | Προσδιορισμός Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων | 34 |
| 2.4. | Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμων | 34 |
| 2.4.1. | Ολική Ενεργότητα Κυτταρινασών (FPU)..... | 34 |
| 2.4.2. | Ενεργότητα Ξυλανάσης | 35 |
| 2.4.3 . | Ενεργότητα Πρωτεάσης | 36 |
| 2.4.4. | Ενεργότητα Πηκτινάσης | 37 |
| 2.5. | Σταθερότητα Ενζυμικών Σκευασμάτων | 37 |
| 2.6. | Εκχυλίσεις..... | 38 |
| 2.6.1. | Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες . | 38 |
| 2.6.2. | Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων..... | 38 |
| 3. | Αποτελέσματα και Συζήτηση..... | 47 |
| 3.1. | Χαρακτηρισμός εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων..... | 47 |
| 3.2. | Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων σε Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες . | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS σε NaDES | 48 |
| 3.1.2. Ενζυμική σταθερότητα του πηκτινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color σε NaDES..... | 52 |
| <i>Ενζυμική σταθερότητα του Pectinex® Ultra Color σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20%</i> | <i>52</i> |
| <i>Ενζυμική σταθερότητα του Pectinex® Ultra Color σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35 και 50% (v/v).....</i> | <i>55</i> |
| 3.1.3. Ενζυμική σταθερότητα του Neutrase® σε NaDES | 56 |
| <i>Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Neutrase® σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20% (v/v)</i> | <i>56</i> |
| 3.1.4. Ενζυμική σταθερότητα του ημικυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm® σε NaDES | 60 |
| 3.2. Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση σε NaDES | 65 |
| 3.2.1. Ολικό Περιεχόμενο σε Φαινολικές Ενώσεις (TPC) | 65 |
| 3.2.2. Ολικό Περιεχόμενο σε Φλαβονοειδή (TFC) | 67 |
| 3.2.3. Αντιοξειδωτική δράση (δέσμευση ρίζας DPPH)..... | 70 |
| 3.2.4. Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES | 73 |
| Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς τις εκχυλιζόμενες φλαβονοειδής ενώσεις (TFC) | 73 |
| Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς τις εκχυλιζόμενες φαινολικές ενώσεις (TPC)..... | 75 |
| Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα IC ₅₀ | 76 |
| 4. Συμπεράσματα | 77 |
| 5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα | 80 |
| 6. Βιβλιογραφία..... | 83 |
| 7. Παράρτημα..... | 89 |

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Φυσικά προϊόντα

1.1.1. Εισαγωγή

Φυσικά προϊόντα ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις που συντίθενται από ζώντες οργανισμούς. Τα τελευταία χρόνια ο ορισμός έχει διευρυνθεί ώστε να περιλαμβάνει οτιδήποτε παράγεται από έμβια όντα και συνεπώς περιλαμβάνονται βιολογικά υλικά, σωματικά υγρά και εκκρίματα, ακόμη και βιοτικά υλικά (όπως το μετάξι).

Διακρίνονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Για τους τομείς της φαρμακευτικής χημείας και φαρμακογνωσίας χρησιμοποιείται συνήθως ο περιοριστικός ορισμός ότι φυσικά προϊόντα είναι τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Τα φυτά προσφέρουν μια ευρεία και ποικίλη συλλογή από αυτά και έτσι προσελκύουν αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά την ανάπτυξη φαρμάκων (Colegate et al., 2007).

1.1.2. Βιοδραστικά Φυσικά Προϊόντα (Bioactive Natural Products)

Με τον όρο Βιοδραστικά Φυσικά Προϊόντα ορίζεται η κατηγορία των φυσικών προϊόντων που ασκούν βιολογική δράση σε οργανισμούς, είτε θεραπευτική είτε τοξική. Σε κάποιες περιπτώσεις τα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τον οργανισμό για τη προστασία του μέσα στο οικοσύστημα. Η πανίδα προσφέρει μεγάλο αριθμό ενώσεων που έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες και η απειλή που υφίσταται η βιοποικιλότητα με χιλιάδες είδη να εξαφανίζονται ραγδαία, περιορίζει κατά πολύ τις προοπτικές ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Τα φυτικά θεραπευτικά σκευάσματα έχουν τις ρίζες τους στην αρχαιότητα αλλά η χρήση ολόκληρου του φυτού μπορεί να παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα όπως παρουσία ενώσεων που προκαλούν ανεπιθύμητες ιδιότητες, διακυμάνσεις στη ποσότητα βιοδραστικών ουσιών ανάλογα τη περιοχή και την εποχή καθώς και μεταβολές στη βιοδραστικότητα ανάλογα με το τρόπο συλλογής, αποθήκευσης και προετοιμασίας της πρώτης ύλης. Για αυτό προτιμάται η απομόνωση των προς αξιοποίηση ουσιών. Αυτή επιτυγχάνεται με εκχύλιση και διαχωρισμό των εκχυλισμάτων με κρυστάλλωση ή χρωματογραφία (Colegate et al., 2007).

1.1.3. Πρωτογενής μεταβολίτες (primary metabolite)

Ο πρωτογενής μεταβολίτης είναι ένα οργανικό μόριο του οποίου η ύπαρξη και λειτουργία είναι απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Σχετίζεται συνεπώς άμεσα με ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες συμμετέχοντας στην ανάπτυξη ή και αναπαραγωγή του οργανισμού όπως είναι για παράδειγμα ο κύκλος του Krebs.

Στους πρωτογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνονται τα βασικά μόρια (νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που αποτελούν τις δομικές μονάδες σχηματισμού των βιολογικών μακρομορίων (DNA, RNA, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, και λιπίδια) που είναι υπεύθυνα για την ύπαρξη και διατήρηση της ζωής (Stéphanie et al., 2021).

1.1.4. Δευτερογενής μεταβολίτες (secondary metabolite)

Ο δευτερογενής μεταβολίτης είναι προϊόν μεταβολισμού που δεν συμμετέχει άμεσα στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή του οργανισμού, η έλλειψή του δεν επιφέρει άμεσο θάνατο, αλλά έχει επιπτώσεις στην ανάπτυξη ή αναπαραγωγή, ιδιαίτερα όταν ελλείπει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχετίζονται επίσης με την αλληλεπίδραση περιβάλλοντος-οργανισμού διαθέτοντας ευρύ φάσμα δομών και λειτουργιών. Ο δευτερογενής μεταβολισμός εξελίχθηκε στη φύση πάνω από 3 δισεκατομμύρια χρόνια πριν ως απάντηση στις αλλαγές και ανάγκες του εκάστοτε περιβάλλοντος. Με τη πάροδο των χρόνων, εφόσον οι μεταβολίτες ευνοούσαν την εξελικτική διαδικασία διατηρούνταν στον οργανισμό (Strobel et al., 2005).

Υπάρχουν εκατοντάδες χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι κυριότερες κατηγορίες στις οποίες εντάσσονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι τα αλκαλοειδή, τα τερπένια-τερπενοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή και τα πολυκετίδια (Croteau et al., 2000, Χαμηλάκης, 2022).

1.1.4.1 Φαινολικές ενώσεις

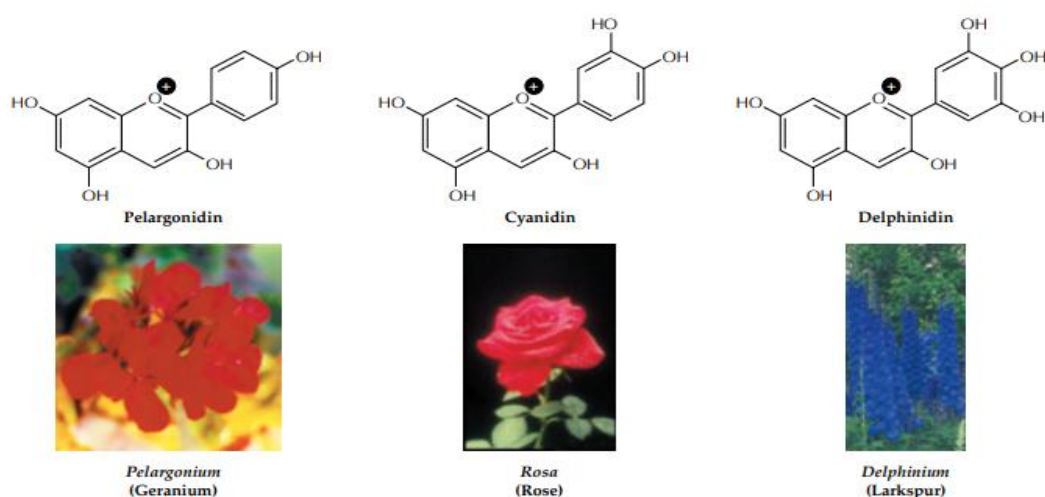
Οι φαινολικές ενώσεις είναι αρωματικές οργανικές ενώσεις με μοριακό τύπο C_6H_6O , στις οποίες μία (τουλάχιστον) υδροξυλομάδα συνδέεται άμεσα με ένα βενζολικό δακτύλιο. Ο αριθμός και η θέση των υδροξυλίων σε κάθε φαινολική μονάδα καθορίζει την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, κουμαρίνες, ταννίνες (υδρολυόμενες και μη) και λιγνίνες (Kumar et al., 2019).

Φαινολικά οξέα: Ως φαινολικά οξέα (phenolic acids) αναφέρονται οι φαινολικές ενώσεις που φέρουν τουλάχιστον μία ομάδα καρβοξυλίου. Συνήθως απαντώνται με τη μορφή αμιδίων, εστέρων ή γλυκοζιτών και σπάνια στην ελεύθερη μορφή τους. Η δομική ποικιλία τους οφείλεται στον αριθμό των υδροξυλίων και τη θέση τους ως προς το δακτύλιο. Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δύο υποομάδες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C_6-C_1) και τα παράγωγα του κινναμωνικού οξέος (C_6-C_3). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, που προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ, βρίσκονται στα τρόφιμα συχνά ως απλοί εστέρες με κινικό οξύ ή γλυκόζη. Τα τέσσερα πιο κοινά υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι το φερουλικό, το καφεϊκό, το π-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ. Όσον αφορά τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, αυτά προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ και βρίσκονται είτε σε διαλυτή μορφή (συζευγμένα με σάκχαρα ή οργανικά οξέα), είτε συνδεδεμένα με κλάσματα του κυτταρικού τοιχώματος ως λιγνίνη (Kumar et al., 2019).

Φλαβονοειδή: Η βασική δομή περιλαμβάνει δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και τουλάχιστον ένα αρωματικό υδροξύλιο. Διαφοροποιήσεις προκύπτουν συνήθως από την τοποθέτηση σε διαφορετικές θέσεις ομάδων υδροξυλίου ή μεθυλίου (Χαμηλάκης, 2022).

Τα φλαβονοειδή (flavonoids) μπορούν να διακριθούν σε διαφορετικές υποομάδες ανάλογα με τον άνθρακα του δακτυλίου C στον οποίο είναι συνδεδεμένος ο δακτύλιος B, καθώς και ανάλογα με τον βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του δακτυλίου C. Τα φλαβονοειδή στα οποία ο δακτύλιος B είναι συνδεδεμένος στη θέση 3 του δακτυλίου C ονομάζονται ισοφλαβόνες. Αυτά στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 4 ονομάζονται νεοφλαβονοειδή, ενώ εκείνα στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 2 μπορούν να υποδιακριθούν περαιτέρω σε πολλές υποομάδες με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου C. Αυτές οι υποομάδες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι χαλκόνες και οι ανθοκυανίνες. Οι τελευταίες είναι αυτές που προσδίδουν το έντονο χρώμα στα φρούτα και στα λουλούδια. Η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η μαλβιδίνη και η πελαργονιδίνη είναι οι πιο συχνά μελετημένες ανθοκυανίνες (Εικόνα 1).

Πολλά από τα φλαβονοειδή έχουν εξελιχθεί ως βιοδραστικές ενώσεις που σε συνδυασμό με νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες εμφανίζουν αντιμικροβιακές, φαρμακευτικές και εντομοκτόνες ιδιότητες, όπως και αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες που τα καθιστούν πολύτιμα για τις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών (Croteau et al., 2000, Panche et al., 2016).



Εικόνα 1. Οι ανθοκυανίνες πελαργονιδίνη, κυανιδίνη και δελφινιδίνη και το χρώμα που προσδίδουν σε κάθε άνθος (Croteau et al., 2000).

Ταννίνες: Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη 'tan' που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών. Είναι συστατικό πολλών ειδών φυτών και θεωρείται ότι τα προστατεύουν από τους μικροοργανισμούς. Αύξηση στο ρυθμό σύνθεσής τους παρατηρείται μετά από κάποιο τραυματισμό του φυτικού ιστού, όπου καταστρέφονται τα κύτταρα και η υπάρχουσα διαμερισματοποίησή τους. Λόγω αυτής της καταστροφής, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έρχονται σε επαφή με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή.

Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες. Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολυόμενες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος) (Scalbert, 1991).

Κουμαρίνες: Οι κουμαρίνες ή βενζο-α-πυρόνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις με δυο εξαμελείς δακτυλίους, ένα άτομο οξυγόνου και ένα γειτονικό σε αυτό καρβονύλιο στην κύρια αλυσίδα. Κουμαρινικά παράγωγα απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, τόσο σε ελεύθερη κατάσταση όσο και ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες: απλές κουμαρίνες, φουροκουμαρίνες, πυρανοκουμαρίνες, κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο. Η βιολογική σημασία των κουμαρινών είναι πολύ μεγάλη, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην παρασκευή φαρμάκων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Έχει αποδειχθεί πως πολλές κουμαρίνες παρουσιάζουν ισχυρή αντικαρκινική δράση και δράση κατά του HIV. Σημαντική είναι επίσης η αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική συμπεριφορά τους, αλλά και η αντιθρομβωτική και καρδιοτονωτική τους δράση (Λαφαζάνη, 2008).

1.1.4.2. Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή (alkaloids) είναι κυκλικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν άζωτο με αρνητικό αριθμό οξείδωσης και ευρίσκονται σε περιορισμένη έκταση εντός έμβιων όντων (Pelletier, 1983). Το άζωτο στα αλκαλοειδή μπορεί να ανήκει ή όχι στον δακτύλιο.

Τα αλκαλοειδή χρησιμοποιούνται από τις απαρχές του ανθρώπινου πολιτισμού ως δηλητήρια και φάρμακα. Το 19ο αιώνα άρχισαν να απομονώνονται αυτά που έχουν θεραπευτικές ιδιότητες από φυσικά φάρμακα (crude drugs). Το 1805 ο Sertürner απομόνωσε το αλκαλοειδές μορφίνη από το φυσικό φάρμακο όπιο το οποίο έχει αναλγητικές ιδιότητες. Τα επόμενα χρόνια, 1817-1820, στο εργαστήριο των Pelletier και Caventou στο Παρίσι ανακαλύφθηκε ένας αξιοσημείωτο αριθμός αλκαλοειδών υψίστης φαρμακευτικής αξίας. Ανάμεσα σε αυτά ήταν και η στρυχίνη, η εμετίνη, η βρυκίνη, η πιπεριδίνη, η καφεΐνη, η κινίνη και η κολχικίνη τα οποία αποτέλεσαν τους ακρογωνιαίους λίθους για τη χημεία των αλκαλοειδών μέχρι και τώρα. Σήμερα, πάνω από 12.000 αλκαλοειδή έχουν ταυτοποιηθεί (Roberts et al., 2013).

Βιογενής κατηγοριοποίηση αλκαλοειδών:

- Αλκαλοειδή που προέρχονται από αμινοξέα πχ ορνιθίνη, αργινίνη, λυσίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, νικοτινικό οξύ
- Πουρινικά αλκαλοειδή πχ καφεΐνη
- Αμινούχα τερπένια πχ το τριτερπένιο σολανίνη
- Πολυκετιδικά αλκαλοειδή όπου το άζωτο εισάγεται σε μια πολυκετιδική μονάδα πχ κονίνη

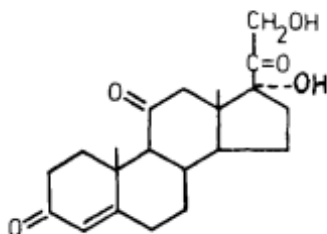
Στα αλκαλοειδή συγκαταλέγονται επίσης η σεροτονίνη που είναι νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου ή αλλιώς ορμόνη της καλής διάθεσης, η κωνεΐνη η δραστική ουσία του κώνειου, η νικοτίνη η οποία είναι τοξική ουσία που προκαλεί εθισμό, η κοκαΐνη

η οποία δρα ως τονωτικό του ΚΝΣ με εθιστική δράση και η ντοπαμίνη η οποία είναι νευροδιαβιβαστής και η έλλειψή της έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως η Νόσος του Πάρκινσον (Χαμηλάκης, 2022, Roberts et al., 2013).

1.1.4.3. Στεροειδή

Τα στεροειδή (steroids) αποτελούν μια οικογένεια οργανικών μορίων που απαντώνται στη φύση και παρουσιάζουν μεγάλο βιοχημικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Ο στεροειδής ανθρακικός σκελετός αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους που έχουν συνενωθεί, με κάθε δακτύλιο να έχει δύο κοινά άτομα με έναν άλλο. Οι τρεις δακτύλιοι αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα και ο τέταρτος από πέντε. Αποτελούν δομικές μονάδες των κυτταρικών μεμβρανών, απαραίτητα για τη σταθερότητα τους αλλά και για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Sedlaczek et al., 1988).

Παραδείγματα στεροειδών αποτελούν η χοληστερίνη και πολλές ορμόνες όπως τα οιστρογόνα, η τεστοστερόνη, η αλδοστερόνη, η προγεστερόνη και η κορτιζόνη της οποίας οι αντιφλεγμονώδεις της ιδιότητες και η δράση της ενάντια στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ανακαλύφθηκαν από τον Hench το 1948 δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω έρευνες στο τομέα των στεροειδών. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη πολλών ακόμα θεραπευτικών δράσεων τους όπως ηρεμιστική, αναβολική, αντικαρκινική και αντιισταμινική δράση (Sedlaczek et al., 1988).



Εικόνα 2. Χημική δομή του στεροειδούς κορτιζόνη

1.1.4.4. Τερπένια

Τερπένια (Terpens) χαρακτηρίζονται οι υδρογονάνθρακες κυρίως φυτικής αλλά και ζωικής προέλευσης που μπορούν να προκύψουν όταν ως δομική μονάδα χρησιμοποιηθεί το ισοπρένιο, για αυτό και ονομάζονται ισοπρενοειδή (isoprenoids). Η δομή τους βασίζεται σε επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου (C₅H₈).

Στα φυτά τα τερπένια συμβάλλουν στο χρώμα και στο άρωμά τους και έχουν συνδεθεί με ορισμένες ευεργετικές ιδιότητες όπως αντιμικροβιακές, αντιμυκητικές, αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις. Αποτελούν κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων και για αυτό έχουν αποδοθεί σε αυτά οι παραπάνω ιδιότητες.

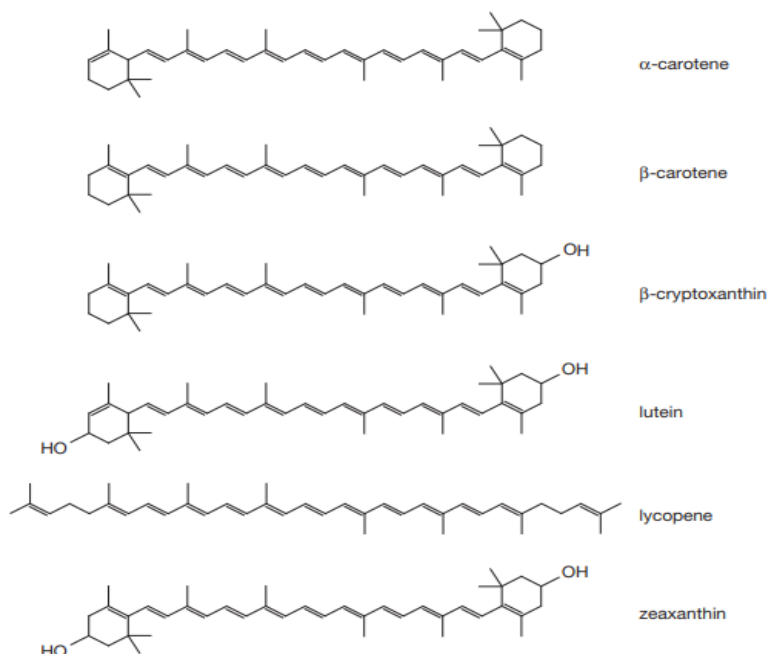
Τελευταία προσελκύουν ενδιαφέρον από εταιρείες καλλυντικών και φαρμάκων λόγω των ενδείξεων ότι αυξάνοντας τη διαπερατότητα της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας καθιστώντας τη διαδερμική οδό αποτελεσματική εναλλακτική για αντικαρκινικές και όχι μόνο θεραπείες (Paduch et al., 2007).

1.1.4.5. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπενοειδή τα οποία απορροφούν σε μήκη κύματος 400-500 nm και συνεπακόλουθα προσδίδουν κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες αποχρώσεις στα φυτά, στα φρούτα και στα λαχανικά που τα περιέχουν. Δεν συντίθενται από τα ζώα επομένως λαμβάνονται από αυτά μέσω της τροφής.

Διακρίνονται σε 2 υποκατηγορίες: 1) ξανθοφύλλες, μόρια που περιέχουν οξυγόνο και έχουν κίτρινο χρώμα, όπως η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και η κρυπτοξανθίνη και 2) καροτένια, μη υδροξυλιωμένοι υδρογονάνθρακες που έχουν πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα όπως το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και το λυκοπένιο.

Τα καροτενοειδή έχουν σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση καθώς μεταφέρουν ενέργεια από το φως στα ενεργά κέντρα, αποτρέπουν την απόπτωση των κυττάρων και καταστέλλουν επιβλαβείς φωτοχημικές αντιδράσεις όπως οξειδώσεις. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται κυρίως στη δομή τους, εφόσον αποτελούνται από ένα σύστημα με πολλούς διπλούς δεσμούς, επιτρέποντας στα ηλεκτρόνια του συστήματος να διαμορφώνουν σταθερές ρίζες.



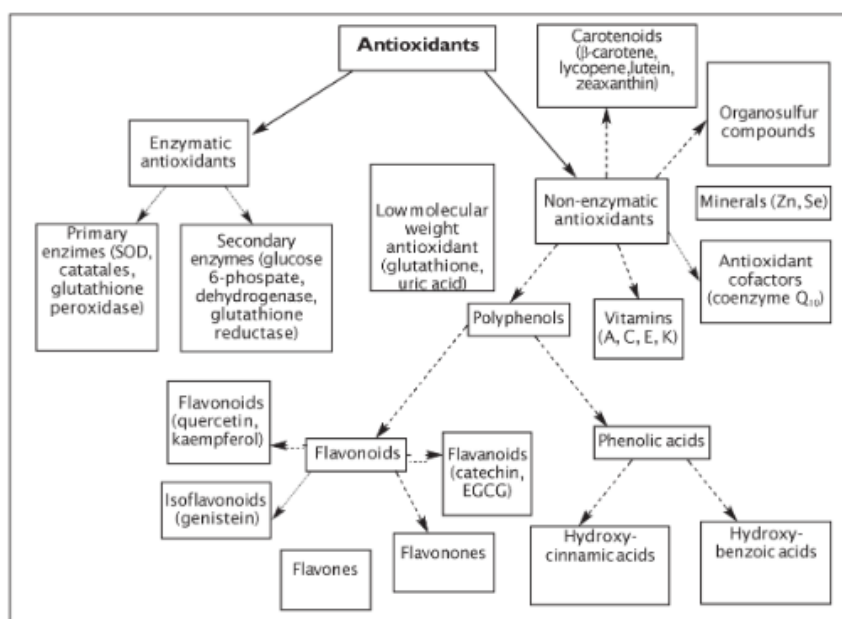
Εικόνα 3. Χημική δομή έξι καροτενοειδών που απαντώνται συχνά στις τροφές: α-καροτένιο, β-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη, λυκοπένιο και ζεαξανθίνη (Ellison, 2016).

Μία ενδιαφέρουσα βιοδραστική ιδιότητα τους, ιδιαίτερα της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης, είναι η προστασία που παρέχουν στη κηλίδα του οφθαλμού και στον αμφιβληστροειδή από το οξειδωτικό στρες. Οι δύο αυτές ενώσεις είναι συστατικά του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου και εθελοντές με προβλήματα στην όραση που έλαβαν προϊόντα από το συγκεκριμένο φυτό ανέφεραν βελτίωση στην όραση τους.

Παρά τη βιοδραστικότητά των καροτενοειδών, έχει δειχθεί ότι η υψηλή πρόσληψη ενός μόνο καροτενοειδούς, για παράδειγμα β-καροτένιο, μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για τον οργανισμό (Winther et al., 2016).

1.2. Αντιοξειδωτικά

Η οξείδωση είναι η χημική αντίδραση που περιλαμβάνει την απώλεια ηλεκτρονίων και την αύξηση του αριθμού οξείδωσης. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών, οι οποίες είναι ασταθείς ομάδες ατόμων με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, εξαιρετικά αντιδραστικές και ικανές να ξεκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις, που αποσταθεροποιούν άλλα μόρια και δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες αναφέρονται επίσης ως δραστικά είδη οξυγόνου ή ROS (Reactive Oxygen Species) και δημιουργούν μια ομοιοστατική ανισορροπία και καταστρέφουν υδρογονάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια πρωτεΐνες ή μεταβάλλουν τις λειτουργίες τους, προκαλώντας έτσι οξειδωτικό στρες, κυτταρικό θάνατο και τον τραυματισμό ιστών.



Εικόνα 4. Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών ουσιών (Mehta et al., 2015).

Τα ROS περιλαμβάνουν τη ρίζα υπεροξειδίου ($O_2 \cdot$), ρίζα υδροξυλίου ($OH \cdot$), ρίζα υπεροξειδίου ($RO_2 \cdot$), ρίζα υδροϋπεροξειδίου ($HO_2 \cdot$), ρίζα αλκοξειδίου ($RO \cdot$), ρίζα οξειδίου του αζώτου ($NO \cdot$), ρίζα διοξειδίου του αζώτου ($NO_2 \cdot$), ρίζα υπεροξειδίου

λιπιδίου ($LOO \cdot$) αλλά και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το όζον (O_3) και το υπεροξειδίο λιπιδίων ($LOOH$).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστό ότι σχηματίζονται ως απόρροια της περιβαλλοντικής ρύπανσης, του στρες, του καπνού του τσιγάρου, της υπεριώδους και ιονίζουσας ακτινοβολίας και των ξενοβιοτικών οργανισμών. Η τοξική δράση των ελεύθερων ριζών έγκειται στο ότι προκαλούν οξειδωτικό στρες που οδηγεί στη παθογένεση ασθενειών. Η συμμετοχή των ROS εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές και άλλες διαταραχές όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας, το σύνδρομο Down, αλλά και ασθένειες όπως η δυσλειτουργία του εγκεφάλου, ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις (Mehta et al., 2015, Mármol et al., 2017).

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η σχετική περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) συγκριτικά με τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στο κυτταρικό περιβάλλον. Η ρύθμιση της οξειδωτικής κατάστασης είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Όταν συμβαίνει οξειδωτικό στρες τα κύτταρα αντιδρούν και προσπαθούν να επαναφέρουν την ισορροπία με την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα, δομικά ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής.

Τα ROS προκαλούν μεταβολές στο DNA με πολλούς τρόπους: σπάσιμο των νουκλεϊκών αλυσίδων, μεταλλάξεις, χρωμοσωμική μετατόπιση, cross-linking με πρωτεΐνες. Οι μεταβολές αυτές έχουν έντονη συσχέτιση με καρκινογενέσεις, γήρανση, καρδιαγγειακές, νευροεκφυλιστικές και αυτοάνοσες ασθένειες.

Τα ROS παράγονται από το μοριακό οξυγόνο ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: ελεύθερες ρίζες και μη ελεύθερες ρίζες. Ελεύθερες ρίζες είναι τα μόρια που έχουν ένα ή δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και όταν δύο ελεύθερες ρίζες μοιράζονται τα αδέσμευτα ηλεκτρόνια τους σχηματίζονται μη ελεύθερες ρίζες. (Mehta et al., 2015, Poljsak et al., 2013).

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να ονομαστεί κάθε μόριο που αναστέλλει την οξείδωση ενός άλλου μορίου. Τα αντιοξειδωτικά συνήθως τερματίζουν πολλές αντιδράσεις, δίνοντας ηλεκτρόνια στις ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας άλλες αντιδράσεις οξείδωσης. Ανάλογα με την ισορροπία μεταξύ των ROS και της διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν ή να καθυστερήσουν την έναρξη ή τη διάδοση της οξειδωτικής αλυσιδωτής αντίδρασης και έτσι να αποτρέψουν ή να επιδιορθώσουν την κυτταρική βλάβη.

Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικά συστήματα, ενζυμικά και μη.

- Τα ενζυμικά συστήματα αντιμετωπίζουν τα ROS άμεσα ή έμμεσα και μερικά από αυτά είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης. Η καταλυτική δράση τους ενισχύεται με τη παρουσία ιχνοστοιχείων

- Τα μη ενζυμικά συστήματα περιλαμβάνουν βιταμίνες (A,E,K,C), μέταλλα (πχ Zn, Se), αζωτούχες ενώσεις (πχ ουρικό οξύ), πεπτίδια (πχ γλουταθειόνη), καροτενοειδή και πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και φαινολικό οξύ).

Πολλά αντιοξειδωτικά είναι ενδογενή και άλλα είναι εξωγενή και λαμβάνονται μέσω τροφών πλούσια σε ουσίες όπως μέταλλα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και πολυφαινόλες. Εκτός από τη τροφή μπορούν να ληφθούν και από συμπληρώματα διατροφής των οποίων όμως η αλόγιστη ή λανθασμένη χρήση πιθανώς να οδηγήσει σε «αντιοξειδωτικό στρες» και να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Mehta et al., 2015, Poljsak et al., 2013).

1.3. *Rosa Canina* L.

1.3.1. Μορφολογία

Το είδος *Rosa canina* L. ή αλλιώς αγριοτριανταφυλλιά ή κυνόροδο (dog rose), είναι ένας φυλλοβόλος αναρριχώμενος θάμνος με ύψος έως και 4 μέτρα, κυρτά αγκάθια στο βλαστό και πέντε ή επτά οδοντωτά φύλλα ανά μίσχο. Η ανθοφορία του φυτού διαρκεί από τον Μάιο έως τον Ιούνιο και τα άνθη του είναι λευκά ή ανοιχτό ροζ με πέντε πέταλα. Οι καρποί του (rose-hips) είναι πορτοκαλοκόκκινοι με οβάλ ή ελλειψοειδές σχήμα και ωριμάζουν από Σεπτέμβρη μέχρι Οκτώβρη (Tabaszewska & Najgebauer-Lejko, 2020).

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 373 είδη του γένους *Rosa* L. της οικογένειας των *Rosaceae*, με το τμήμα *Caninae* είναι από τα μεγαλύτερα του γένους *Rosa*.

Στην Ελλάδα το άγριο τριαντάφυλλο ευδοκίμει σε διάφορους τύπους βιοτόπων και σε ένα εύρος υψομέτρου από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τα 1700 μέτρα (Maloupa et al., 2021).



Εικόνα 5. Ανθός και θάμνος του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina* L.

Το κέλυφος του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *R. Canina* L., δηλαδή το κόκκινο σαρκώδες περικάρπιο, ονομάζεται υπάνθιο (hypanthium) και στην πραγματικότητα δεν αποτελεί μέρος του βοτανικού καρπού. Οι βοτανικοί καρποί του *R. Canina* L.

είναι τα αχαίνια, δηλαδή οι λεπτές μεμβράνες που περιβάλλουν τους εσώκλειστους σπόρους στον καρπό. Ο συνολικός καρπός του ρόδου ονομάζεται «ψευδοφρούτο» (pseudo-fruit) (Tabaszewska & Najgebauer-Lejko, 2020, Winther et al., 2016).

Ο καρπός του κυνόροδου χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για τη παρασκευή αφέψημάτων, σουπών και μαρμελάδων σε πολλές περιοχές, όπως και αυτή της Μεσογείου, καθώς είναι πλούσιος σε πολυφαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων και φλαβονοειδών: ανθοκυανίνες, προκυανιδίνες, κατεχίνη, ταννίνες, φαινολικά οξέα. Αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμίνης C λόγω των καρτενοειδών που περιέχει και τέλος, έχουν ικανοποιητικό ποσοστό τοκοφερολών και μετάλλων όπως ασβέστιο, φώσφορο και κάλιο. Εξαιτίας της σύστασης του παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές και προβιοτικές ιδιότητες και ρυθμίζουν τα επίπεδα λιπιδίων και γλυκόζης στο αίμα (Tabaszewska & Najgebauer-Lejko, 2020, Maloupa et al., 2021, Fascella et al., 2019).



Εικόνα 6. Καρπός του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina* L. στην αρχική και σε αποξηραμένη μορφή.

1.3.2. Ιστορική αναδρομή

Το άγριο τριαντάφυλλο (*R. canina* L.) εκτιμάται ότι εξελίχθηκε κατά τη διάρκεια της τελευταίας ευρωπαϊκής μεταπαγετώδους περιόδου από ένα διαφορετικό γένος άγρια αναπτυσσόμενου *Rosa* spp. και ένα εξαφανισμένο προγονικό, το «Protocaninae». Το φυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά ως φαρμακευτικό φυτό από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23–79 π.Χ.), ο οποίος παρατήρησε τη χρήση του μεταξύ των γαλλικών φυλών για τη θεραπεία των δαγκωμάτων των σκύλων. Μάλιστα, από αυτή την παρατήρηση προέκυψε εν συνεχεία το όνομα του είδους (*R. Canina* από τη λατινική ονομασία του σκύλου, *canis*). Στο Μεσαίωνα το συγκεκριμένο φυτό αποτελούσε σύμβολο καλοτυχίας και δύναμης. Επιπλέον, στην Ευρώπη του δωδέκατου αιώνα, γίνεται αναφορά από τη γνωστή Γερμανίδα μοναχή Hildegard of Bingen, η οποία το χρησιμοποιούσε ως ενδυναμωτικό αφέψημα στις θεραπείες της. Το φυτό έγινε ιδιαίτερα δημοφιλές στους ναυτικούς ως μέσο προστασίας από το σκορβούτο, λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης σε βιταμίνη C, και έτσι εξαπλώθηκε σε πολλές ηπείρους. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, οι καρποί του ρόδου έγιναν η βασική πηγή βιταμίνης C στη Βρετανία εξαιτίας

διαφόρων περιορισμών στις εμπορικές συναλλαγές εσπεριδοειδών, επίσης για την αντιμετώπιση του σκορβούτου (Winther et al., 2016, Ercisli, 2007, Erkin, 2017).

Στο διάστημα 1945-2005 η αγριοτριανταφυλλιά τυπώθηκε σε γραμματόσημα σε όλο το κόσμο επικυρώνοντας την αξία της ως φαρμακευτικό και αρωματικό φυτό (Εικόνα 7).



Figure13. Norway (1980) Steinnype Rosa Canina, Plants Series



Figure16. Sweden (1983) Nypon ros Rosa Canina, Fruits Series



Figure19. Romania (1993) Rosa Canina L., Plants Series



Figure14. Poland (1981), Roza Dzika Rosa Canina L., Medicinal Plants Series



Figure17. Poland (1989) Dzika Roza, Medicinal Plants Series



Figure20. Turkey (2001) Kuşburnu Rosa canina, Medicinal Plants Series



Figure15. Bulgaria (1981) Rosa Canina, Medicinal Plants Series



Figure18. Greece (1989) Rosa Canina, Flowers Series

Εικόνα 7. Γραμματόσημα ανά τα χρόνια με απεικονίσεις του άγριου τριαντάφυλλου Rosa Canina L. (Galore International Journal of Health Sciences and Research (www.gijhsr.com) 5 Vol.2; Issue: 4; October-December 2017).

1.3.3. Σύσταση του περικαρπίου του R. canina L.

Το ψευδοφρούτο περιλαμβάνει περίσσεια ωφέλιμων ουσιών: πολυφαινολικών ενώσεων, βιταμίνης C (καροτενοειδών) και μετάλλων. Πιο αναλυτικά στο άγριο τριαντάφυλλο περιέχονται (Angelon et al., 2014, Winther et al., 2016, Roman et al., 2013, Avati et al., 2018, Johnson et al., 2022) :

- Φλαβονοειδή όπως κατεχίνη, καμφερόλη, παράγωγα της κουερσετίνης ή βαλανοκετόνης
- Ταννίνες
- Ανθοκυανίνες
- Καροτενοειδή (κυρίως β-καροτένιο και λυκοπένιο)
- Φαινολικά οξέα όπως γαλλικό, φερουλικό, ελλαγικό, βανιλικό, κουμαρικό οξύ
- Τοκοφερόλες

- Τερπενοειδή
- Ασκορβικό Οξύ
- Λιπαρά Οξέα όπως λινολεϊκό, ελαϊκό, παλμιτικό, στεαρικό και αραχιδονικό
- Πηκτίνες
- Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία όπως N, P, K, Ca, Mg και Zn
- Βιταμίνες (C, K, E, B, A)

1.3.4. Θεραπευτικές Ιδιότητες του περικαρπίου του *R. canina* L.

Από τις απαρχές του ανθρώπινου πολιτισμού ο καρπός του *Rosa Canina* L. αξιοποιείται ως φαρμακευτικό σκεύασμα για πολλές διαφορετικές ασθένειες λόγω των υψηλών ποσοστών βιοδραστικών ενώσεων που περιέχει.

Πέρα από φάρμακο για το κοινό κρυολόγημα και άλλες λοιμώξεις, έχει χρησιμοποιηθεί ως διουρητικός παράγοντας. Έχει επιπρόσθετα αποδειχθεί η δράση του κατά της αρθρίτιδας και του διαβήτη ενώ γνωστό είναι ότι προστατεύει το ήπαρ, τα νεφρά, το στομάχι και τη καρδιά. Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες, κάποια από τα βιοδραστικά συστατικά του κυνόροδου, θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά και έχουν θετική επίδραση σε εκφυλιστικές ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, η νόσος του Alzheimer και καρδιαγγειακές παθήσεις (Winther et al., 2016, Roman et al., 2013, Avati et al., 2018, Mármol et al., 2017).

In vivo προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η από του στόματος χορήγηση του καρπού *R. canina* ή των εκχυλισμάτων του εμφανίζει σημαντική ανασταλτική επίδραση στην αύξηση του σωματικού βάρους.

Ακολουθώς παρατίθενται πιο αναλυτικά κάποιες από τις δράσεις του (Winther et al., 2016, Roman et al., 2013, Avati et al., 2018, Mármol et al., 2017).

Αντικαρκινική δράση

Τα δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) προκαλούν μεταβολές στις νουκλεϊκές αλυσίδες οι οποίες είναι η αρχή για μεταλλάξεις και την εμφάνιση όγκου. Το ελλαγικό οξύ έχει δείξει δράση κατά των μεταλλάξεων και της εμφάνισης όγκου τόσο σε *in vivo* όσο και *in vitro* έρευνες. Εκτός από αντιοξειδωτικό το ελλαγικό οξύ επιταχύνει τη κυτταρική απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Παρόμοια δράση έχει και η βιταμίνη C και οι φαινολικές ενώσεις (Mármol et al., 2017).

Αντιοξειδωτική δράση

Στους ζωντανούς οργανισμούς τα ROS παράγονται ενδογενώς μέσα από φυσιολογικές λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός και οι φλεγμονές. Τα ROS σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητα για την εκτέλεση βασικών βιολογικών λειτουργιών σαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Η υπέρβαση αυτών των συγκεντρώσεων όμως οδηγεί σε οξειδωτικό στρες το οποίο συνδέεται με την ανάπτυξη ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η αρθρίτιδα, αφού τα ROS

αλληλοεπιδρούν με τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και τα υγιή κύτταρα χάνουν τη λειτουργικότητά τους.

Πέρα από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικά μπορούν να ληφθούν και από φυτικές τροφές και συγκεκριμένα από αυτές που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγκέντρωση σε βιταμίνες A, B, C, E και από καροτενοειδή αλλά και από φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν τα ελεύθερα ηλεκτρόνια των ελεύθερων ριζών. Στο άγριο τριαντάφυλλο η ικανότητα δέσμευσης των υπεροξειδικών ριζών φτάνει το 87% (Mármol et al., 2017, Kerasioti et al., 2019).

Αντιβακτηριακή δράση

Η σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση του *Rosa Canina* L. προέρχεται από τις φαινολικές και ορισμένες άλλες ενώσεις τους, ενώ σημαντικό κρίνεται το ελλαγικό οξύ. Οι αντιβακτηριδιακές ενώσεις μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης, τη στέρηση θρεπτικών ουσιών και την αναστολή των εξωκυτταρικών ενζύμων (Mármol et al., 2017).

Ρευματοειδής και οστική αρθρίτιδα

Από το 2004 εξετάζεται το άγριο τριαντάφυλλο ως πιθανή θεραπεία για την αρθρίτιδα. Έρευνες έχουν δείξει ότι η σκόνη του λουλουδιού μπορούν να ανακουφίσουν το πόνο που προκαλείται από την πάθηση, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών (Gruenwald et al., 2019).

Οστεοπόρωση

Υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγονται ROS από τους οστεοκλάστες (τα κύτταρα που διασπούν το παλιό και φθαρμένο οστό για να αναπλασθεί εκ νέου) για να τους βοηθήσουν στη διαδικασία. Επίσης παράγονται από την αλληλεπίδραση κολλαγόνου και μετάλλων που ενισχύουν την ανάπτυξη των οστών. Εάν όμως οι οστεοκλάστες παράξουν υπερβολικά υπεροξειδικά ανιόντα προκαλώντας οξειδωτικό στρες ενεργοποιούνται διαφορετικά πρωτεολυτικά ένζυμα, για παράδειγμα νευροφιλικές ελαστάσες και μεταλλικές πρωτεϊνάσες, προωθώντας οξείδωση της εξωτερικής οστικής μήτρας (bone extracellular matrix). Επομένως η συμπλήρωση αντιοξειδωτικών αποκαθιστά την οστική πυκνότητα (BMD) (Mármol et al., 2017).

Διαβήτης

Τα ROS συσχετίζονται επίσης με την εμφάνιση διαβήτη. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του *R. Canina* L. μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και επιδρούν θετικά στη πάθηση. Επιπλέον, μία άλλη θεραπευτική αντιμετώπιση του Διαβήτη Τύπου 2 εστιάζει στην αναστολή ενζύμων που υδρολύουν υδατάνθρακες όπως η α-αμυλάση και η α-γλυκοζιδάση, ώστε τα σάκχαρα να διασπαστούν σε μικρότερους

υδατάνθρακες που περνούν στο γαστρεντερικό σύστημα. Το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου μπορεί να απενεργοποιήσει τέτοια ένζυμα (Mármol et al., 2017).

Νεφρικές Διαταραχές

Το οξειδωτικό στρες και οι φλεγμονές είναι οι κύριες αιτίες της Οξείας Νεφρικής Βλάβης (Acute Kidney Injury, AKI), επομένως οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του προς μελέτη ρόδου έχουν παρατηρηθεί ότι μειώνουν τις επιπτώσεις της ασθένειας (Mármol et al., 2017).

Ηπατοτοξικότητα

Πολλές ηπατικές παθήσεις οφείλονται σε υπεροξείδωση λιπιδίων, παραγωγή ελεύθερων ριζών και της μείωσης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα αντιοξειδωτικά και φαινολικά συστατικά του *Rosa Canina* L. συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των παραπάνω (Mármol et al., 2017).

Δέρμα και Γήρανση

Μία από τις πιο κοινές δερματικές παθήσεις είναι η Ατοπική Δερματίτιδα που είναι χρόνια και οφείλεται σε φλεγμονές. Οι θεραπείες που έχουν προταθεί έχουν ως στόχο τη καταστολή των φλεγμονών αλλά είναι προσωρινές γιατί εμφανίζουν παρενέργειες σε βάθος χρόνου. Οι ταννίνες του φυτού μπορούν να δράσουν κατασταλτικά προσφέροντας μια αισιόδοξη επιλογή για μελέτες. Επιπρόσθετα, σε μελέτες σε πειραματόζωα (ποντίκια) βρέθηκε ότι η κουερσετίνη απενεργοποιεί το ένζυμο τυροσινάση που προκαλεί μελανώματα στο δέρμα ως αποτέλεσμα φωτογήρανσης. Σε μελέτες σε υγείες εθελοντές, άντρες και γυναίκες, με αντικείμενο τις ρυτίδες και τη μακροβιότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, φάνηκε ότι μειώθηκε το βάθος των ρυτίδων, αυξήθηκε η υγρασία και βελτιώθηκε η ελαστικότητα του δέρματος αλλά και ότι αυξήθηκε η διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι αντιγηραντικές αυτές επιδράσεις οφείλονται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κυνόροδου όπως βιταμίνη C και ακόρεστα λιπαρά οξέα (Mármol et al., 2017).

1.4. Μέθοδοι εκχύλισης

Η πιο δημοφιλής διεργασία για την παραλαβή βιοδραστικών ουσιών είναι η εκχύλιση (extraction), η οποία συγκαταλέγεται στις φυσικές μεθόδους διαχωρισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των διαλυτών βιοδραστικών συστατικών από τη φυτική πρώτη ύλη μέσω της αλληλεπίδρασής της με κάποιον κατάλληλο ρευστό διαλύτη. Συχνά οι τεχνικές εκχύλισης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: η πρώτη ονομάζεται έκπλυση ή εκχύλιση στερεών και χρησιμοποιείται για τη διάλυση διαλυτής ύλης από ένα μίγμα της με αδιάλυτο στερεό, ενώ η δεύτερη κατηγορία ονομάζεται εκχύλιση υγρών και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ενός πολύτιμου προϊόντος από ένα διάλυμα πολλών συστατικών μέσω επαφής με ένα μη αναμίξιμο διαλύτη που έχει συγγένεια

με το προϊόν. Η εκχύλιση υγρών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό υγρών με παραπλήσια σημεία ζέσεως, τα οποία είναι δύσκολο να διαχωριστούν με απόσταξη (McCabe et al., 1993).

Γενικά, υπάρχουν τρεις συνήθεις τύποι εκχυλίσεων: υγρού/στερεού (Solid-Liquid Extraction - SLE), υγρού/υγρού (Liquid-Liquid Extraction - LLE) και οξέος/βάσης (Acid-Base Extraction). Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε συμβατικές και μη συμβατικές. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης απαιτούν συνήθως τη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών, μεγάλο χρόνο ανάδευσης και υψηλή θερμοκρασία (π.χ. απόσταξη). Αντίθετα, οι σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης είναι διαδικασίες που μειώνουν τη χρήση τοξικού οργανικού διαλύτη και τον χρόνο εκχύλισης (Stéphane et al., 2021, Da Silva et al., 2022).

1.4.1. Συμβατική εκχύλιση

Διαβροχή

Η διαβροχή (maceration) είναι μια μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού, όπου η βιοδραστική ένωση (διαλυμένη ουσία) του φυτικού υλικού εκχυλίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με εμβάπτιση του φυτικού υλικού στο διαλύτη για μια χρονική περίοδο. Περιλαμβάνει 3 βασικά βήματα: η φυτική ύλη κονιοποιείται μέσω άλεσης ώστε να γίνεται καλή επαφή μεταξύ διαλύτη και υλικού, στη συνέχεια ο επιλεγμένος διαλύτης προστίθεται σε ένα κλειστό δοχείο και τέλος, το υγρό στραγγίζεται και το στερεό υπόλειμμα πιέζεται για να ανακτηθεί όποια ποσότητα εκχυλίσματος έχει συγκρατηθεί. Κατά τη διαδικασία της διαβροχής, η περιστασιακή ανακίνηση διευκολύνει την εκχύλιση, αυξάνοντας τη διάχυση, και αφαιρεί το συμπυκνωμένο διάλυμα από την επιφάνεια του δείγματος, για να φέρει νέο διαλύτη σε αυτό, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης. Είναι πολύ απλή διαδικασία με προσιτό εξοπλισμό αλλά η διάρκεια της είναι μεγάλη και μπορεί να διαρκέσει μέχρι και βδομάδες (Stéphane et al., 2021, Ngaha Njila et al., 2017).

Χώνευση

Η Χώνευση (Digestion) είναι μία μορφή Διαβροχής κατά την οποία εφαρμόζεται ήπια θέρμανση, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 35 και 40°C με ανώτατο όριο τους 50°C. Το προς εκχύλιση μέρος του φυτού τοποθετείται σε δοχείο με τον προθερμασμένο διαλύτη στις ενδεικνυόμενες θερμοκρασίες και διατηρείται για διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από μισή ώρα έως 24 ώρες, ανακινώντας το δοχείο τακτικά. Η Χώνευση συνίσταται για δυσδιάλυτες ουσίες και φαινολικές ενώσεις (Stéphane et al., 2021).

Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet συνίσταται για εκχύλιση λιπιδίων αλλά και βιοδραστικών ενώσεων. Είναι μια απλή μέθοδος για συνεχείς επαναλαμβανόμενους κύκλους εκχύλισης με φρέσκο διαλύτη, μέχρι την πλήρη εξάντληση των διαλυμένων ουσιών-

στόχων στην πρώτη ύλη. Στην εκχύλιση Soxhlet εμπλέκεται η διαδικασία της απόσταξης. Γίνεται θέρμανση ενός διαλύματος μέχρι βρασμού και στη συνέχεια συμπύκνωση και αποστολή του διαλύτη πίσω στην αρχική φιάλη, όντας καθαρός. Δε χρειάζεται διήθηση μετά την εκχύλιση που είναι χρονοβόρα διαδικασία άρα επιφέρει οικονομική επιβάρυνση και περιβαλλοντικά προβλήματα. Λόγω της έκθεσης των δειγμάτων σε υψηλή θερμοκρασία για μεγάλη χρονική διάρκεια, δεν είναι κατάλληλη μέθοδος για θερμοευαίσθητες ουσίες (Stéphane et al., 2021, Ngaha Njila et al., 2017).

Υδροαπόσταξη

Η υδροαπόσταξη (Hydrodistillation) είναι μια παραδοσιακή μέθοδος εκχύλισης φυτικών μεταβολιτών όπου δε γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών. Βρίσκει εφαρμογή σε πτητικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των αιθέριων ελαίων. Η πρώτη ύλη τοποθετείται σε ένα δοχείο και προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού και το σύστημα θερμαίνεται μέχρι βρασμό. Εναλλακτικά, μπορεί να εισαχθεί και απευθείας ο ατμός στο δείγμα. Η θερμότητα οδηγεί σε σχάση των πόρων και η ουσία-στόχος απελευθερώνεται. Με την ψύξη των ατμών νερού, το μίγμα ατμών συμπυκνώνεται. Το συμπυκνωμένο μείγμα μεταφέρεται από τον συμπυκνωτή σε έναν διαχωριστή, ο οποίος διαχωρίζει αυτόματα το έλαιο και τις βιοδραστικές χημικές ουσίες από το νερό (Stéphane et al., 2021, Ngaha Njila et al., 2017).

Αφέψημα

Στη μέθοδο του αφεψήματος (decoction) απεσταγμένο νερό προστίθεται στην αποξηραμένη πρώτη ύλη και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C για συγκεκριμένη ώρα. Στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διηθείται. Το διήθημα συμπυκνώνεται και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για υδατοδιαλυτές και μη θερμοευαίσθητες ενώσεις (Ngaha Njila et al., 2017).

Εκχύλιση με διαλύτες

Η εκχύλιση με διαλύτες (solvent extraction) είναι η παλαιότερη μέθοδος κατά την οποία η μεταφορά μάζας και χημική διαλυτότητα εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη, την εισερχόμενη ενέργεια και την ανάδευση. Η επιλογή του διαλύτη καθορίζεται από τη πρώτη ύλη και τις ενδιαφερόμενες ουσίες. Οι λιπόφιλες ενώσεις (πχ τερπενοειδή και λιπαρά οξέα) εκχυλίζονται καλύτερα με μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο και διχλωρομεθάνιο, ενώ υδρόφιλες ενώσεις (πχ Αλκαλοειδή, Σάκχαρα, Αμινοξέα, Ταννίνες, Φαινολικές ενώσεις, Φλαβονοειδή) με πολικούς όπως νερό, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη (Marathe et al., 2017).

Οι οργανικοί διαλύτες κατηγοριοποιούνται ως εξής: υδρογονάνθρακες (εξάνιο, οκτάνιο, βενζόλιο, τολουόλιο, ακετόνη), αλκοόλες (αιθανόλη, μεθανόλη), αιθέρες (διαιθυλεθέρας, δισοπροπυλοαιθέρας) και χλωριωμένους διαλύτες (χλωροφόρμιο, τετραχλωράνθρακας) (Marathe et al., 2017).

Η παραδοσιακή αυτή μέθοδος όμως παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Απαιτείται μεγάλη ποσότητα οργανικού διαλύτη ή νερού καθώς και μεγάλη κατανάλωση ενέργειας κατά το στάδιο του διαχωρισμού διαλύτη και εκχυλίσματος. Επιπρόσθετα, πέρα από τις ενώσεις-στόχους μπορεί να εκχυλιστούν και ακαθαρσίες υποβιβάζοντας την αξία του εκχυλίσματος. Τέλος, ανεπιθύμητη όταν συμβαίνει είναι η υποβάθμιση θερμοευαίσθητων ενώσεων όπως τα καροτενοειδή (Marathe et al., 2017).

Οι οργανικοί διαλύτες εμφανίζουν ένα άλλο χαρακτηριστικό που καθιστά επιτακτική την αντικατάστασή τους με νέα υλικά ή μεθόδους: τη τοξικότητά τους. Λόγω της υψηλής πτητικότητας, δηλαδή της υψηλής τάσης ατμών σε θερμοκρασία δωματίου, μπορούν εύκολα να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα μέσω της αναπνοής, ενώ συχνά εμφανίζουν διαβρωτικότητα και ευφλεκτότητα. Η τοξικότητα των οργανικών διαλυτών επηρεάζει και το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), λόγω της ταχείας ικανότητας εισόδου τους στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Joshi & Adhikari, 2019).

Από αυτούς προτιμώνται η ακετόνη, η βουτανόλη, η αιθανόλη, η μεθανόλη ενώ στα ανεπιθύμητα κατατάσσονται το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο, η πυριδίνη κ.α. Για παράδειγμα το χλωροφόρμιο είναι τοξικό γιατί δεσμεύεται σε μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το κύριο όργανο που επηρεάζεται είναι το ήπαρ και εν συνεχεία τα νεφρά, ενώ έχει συνδεθεί με καρκινογένεσεις, όπως άλλωστε και το βενζόλιο. Ακόμα και στη περίπτωση της ακετόνης που χρησιμοποιείται μέχρι και για οικιακή χρήση, πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση στους ατμούς της γιατί μπορεί να προκαλέσει ερεθισμούς στα μάτια και στο δέρμα (Joshi & Adhikari, 2019).

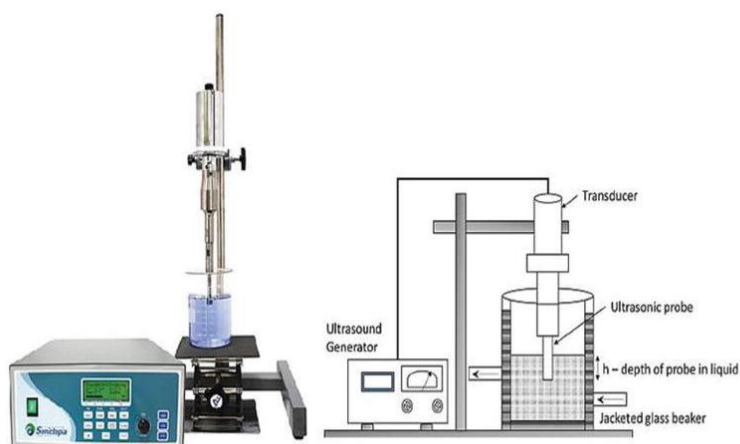
1.4.2. Μη συμβατική εκχύλιση

Οι νέες τεχνικές εκχύλισης ή αλλιώς «Πράσινη Εκχύλιση» εστιάζουν στη μείωση της καταναλισκόμενης ενέργειας, στη χρήση εναλλακτικών διαλυτών και στην αξιοποίηση ανανεώσιμων φυσικών προϊόντων. Ακολουθώντας αναφέρονται οι πιο σημαντικές από αυτές (Ngaha Njila et al., 2017)

Εκχύλιση με υπερήχους

Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) είναι μία μη κοστοβόρα, γρήγορη, απλή, αποδοτική και ενεργειακά οικονομική τεχνική. Η δράση της UAE οφείλεται κυρίως στην ακουστική σπηλαίωση, η οποία δημιουργεί κρουστικά κύματα και άλλες ισχυρές δυνάμεις τάνυσης που καταστρέφουν τα τοιχώματα των φυτών, αυξάνουν την επιφάνεια επαφής μήτρας-διαλύτη, ενισχύουν τη διεισδυτικότητα του διαλύτη και στη συνέχεια διευκολύνουν τη μεταφορά μάζας και την απελευθέρωση των μορίων-στόχων στο διαλύτη. Η συγκεκριμένη εκχύλιση εξαρτάται από το διαλύτη, το ποσοστό υγρασίας και το μέγεθος των σωματιδίων των φυτικών εκχυλισμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποδοτική, η εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα περιορίζεται από το

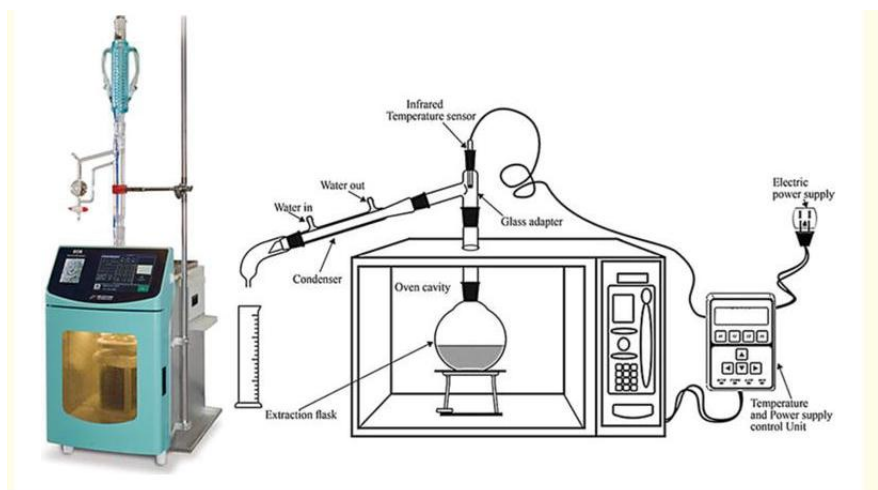
υψηλό της κόστος. Η διάταξη μιας εκχύλισης με υπερήχους παρουσιάζεται στην Εικόνα 8 (Ngaha Njila et al., 2017).



Εικόνα 8. Διάταξη εκχύλισης με υπερήχους (Stéphane et al., 2021).

Εκχύλιση με μικροκύματα

Η Εκχύλιση με Μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE) χρησιμοποιείται για εκχυλίσεις διαλυτών προϊόντων με ενέργεια μικροκυμάτων που μετατρέπεται σε θερμότητα μέσα από μηχανισμούς ιοντικής αγωγιμότητας και περιστροφής διπόλων, τόσο στο διαλύτη όσο και στο δείγμα.



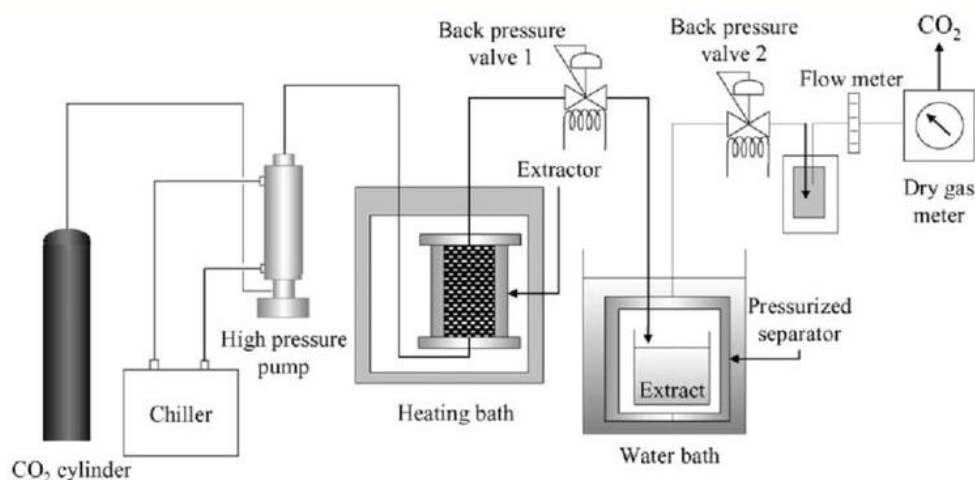
Εικόνα 9. Διάταξη εκχύλισης με μικροκύματα (Stéphane et al., 2021).

Η θέρμανση από μικροκύματα έχει άμεση επίδραση σε πολικά υλικά. Τα μικροκύματα διεισδύουν στα βιοϋλικά και παράγουν θερμότητα αλληλεπιδρώντας με πολικά μόρια, όπως το νερό, μέσα στα υλικά. Το νερό που περιέχεται στη φυτική ύλη υπερθερμαίνεται και προκαλείται καταστροφή των κυττάρων. Καθώς η διηλεκτρική σταθερά παίζει ρόλο στη θέρμανση από μικροκύματα ο διαλύτης της

εκχύλισης μπορεί να παραμείνει κρύος αν έχει χαμηλή διηλεκτρική σταθερά και έτσι η μέθοδος είναι κατάλληλη για θερμοευαίσθητες ουσίες. Θεωρείται γρήγορη, αποδοτική και απαιτεί μικρή ποσότητα διαλύτη. Η διάταξη μιας εκχύλισης με μικροκύματα παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 (Nghaha Njila et al., 2017).

Εκχύλιση με Υπερκρίσιμα Ρευστά

Η Εκχύλιση με Υπερκρίσιμα Ρευστά (Supercritical fluid Extraction, SFE) και ιδιαίτερα το υπερκρίσιμο CO_2 , αλλά και το εξάνιο, το πεντάνιο, το βουτάνιο και οι φθοράνθρακες, προτάθηκε ως εναλλακτική για τις μεθόδους με χρήση διαλυτών. Η μέθοδος πλεονεκτεί γιατί ένα υπερκρίσιμο ρευστό έχει μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης και χαμηλότερο ιξώδες και επιφανειακή τάση από έναν ρευστό διαλύτη και έτσι επιτυγχάνεται καλύτερη διείσδυση στο δείγμα και μεταφορά μάζας. Ο διαχωρισμός του διαλύτη επιτυγχάνεται με αποσυμπίεση του υπερκρίσιμου υγρού. Είναι γρήγορη, κατάλληλη για θερμοευαίσθητες ουσίες. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, η απαιτούμενη ποσότητα είναι μικρή και για αυτό συγκαταλέγεται στις πράσινες μεθόδους εκχύλισης, ενώ το υπερκρίσιμο ρευστό μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η διάταξη μιας SFE παρουσιάζεται στην Εικόνα 10 (Nghaha Njila et al., 2017).



Εικόνα 10. Διάταξη Εκχύλισης με Υπερκρίσιμα Ρευστά (Stéphane et al., 2021).

Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

Η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE) ή Enzyme-assisted extraction (EAE) είναι στην ουσία μια προκατεργασία που επιτυγχάνεται με τη προσθήκη υδρολυτικών ενζύμων, όπως κυτταρινάσες, πηκτινάσες, α-αμυλάσες. Τα ένζυμα υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών πρώτων υλών και απελευθερώνουν τις βιοδραστικές ουσίες-στόχους που περιέχονται στο εσωτερικό αυτού (Stéphane et al., 2021). Η EYE αναλύεται εκτενέστερα στη παράγραφο 1.4.3.

Εκχύλιση με NaDES

Τη τελευταία εικοσαετία τα ιοντικά ρευστά (ionic liquids, IL) προσέλκυσαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα. Ως ιοντικά ρευστά ορίζονται ως άλατα που συντίθενται από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν που εμφανίζουν σημείο ζέσεως χαμηλότερο από αυτό του κάθε συστατικού ξεχωριστά και έτσι είναι σε υγρή μορφή. Ενώ πλεονεκτούν ως προς τις ιδιότητές τους γιατί εμφανίζουν θερμική σταθερότητα, διαλυτότητα, προσαρμοζόμενο ιξώδες και ικανότητα να εκχυλίζουν πληθώρα οργανικών και ανόργανων ενώσεων, δεν έχουν εγκριθεί για χρήση σε φάρμακα και τρόφιμα. Σταδιακά η φιλική προς το περιβάλλον πλευρά τους άρχισε να αμφισβητείται εξαιτίας της χαμηλής τους βιοαποικοδόμησης, βιοσυμβατότητας και βιωσιμότητας. Εναλλακτική σε αυτά αποτέλεσαν οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES) και εν συνεχεία οι Φυσικοί DES (NaDES) που είναι πλήρως συμβατοί με τις αρχές της πράσινης χημείας καθώς δεν εμφανίζουν τοξικότητα και είναι ιδιαίτερα βιοαποικοδομήσιμοι. Ένα ακόμα πλεονέκτημά τους ως προς τα ιοντικά ρευστά είναι το χαμηλότερο κόστος τους (Benvenuto et al., 2019, Paiva et al., 2014).

Οι DES είναι διαλύτες που εμφανίζονται όταν ένα μείγμα δύο ή τριών συστατικών σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, έχει σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό των επιμέρους συστατικών (ευτηκτική αναλογία). Για το σχηματισμό ενός συστήματος DES, χρειάζεται ένας δότης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor - HBD) και ένας δέκτης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor - HBA), οι οποίοι όταν αναμειγνύονται σε κατάλληλες αναλογίες δημιουργούν ένα νέο «πλέγμα» μορίων, διασυνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας ευτηκτικό μείγμα. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD μαζί με άλλες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι van der Waals και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις, προκαλούν μετατόπιση φορτίου, η οποία παρεμβαίνει στην ικανότητα των επιμέρους συστατικών να κρυσταλλώνονται και, κατά συνέπεια, το σημείο τήξης του DES μειώνεται σημαντικά σε σύγκριση με αυτό κάθε αρχικής ένωσης (Smith et al., 2014). Η συγκεκριμένη ευτηκτική συμπεριφορά παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 2003 από την ομάδα του Abbott όταν ο συνδυασμός σκόνης χλωριούχου χολίνης ($T_m = 302\text{ }^\circ\text{C}$) και κρυσταλλικής ουρίας ($T_m = 133\text{ }^\circ\text{C}$) σε μοριακή αναλογία 1:2 απέδωσε ένα υγρό σε θερμοκρασία δωματίου ($T_{eutectic} = 12\text{ }^\circ\text{C}$) (Yang, 2019, Hansen et al., 2020).

Οι DES είναι πολλά υποσχόμενοι για πολλούς τομείς όπως Μεταλλουργία και Ηλεκτροαπόθεση, Ανάκτηση αερίων, Τεχνολογία μπαταριών και Συστήματα ισχύος, Βιοκατάλυση και Οργανική Χημεία, Παραγωγή Βιομάζας, Εκχύλιση, Φαρμακευτικές εφαρμογές, Νανοϋλικά και Μοριακή Δομή και Σταθερότητα (Smith et al., 2014).

Όταν τα συστατικά που συνιστούν τους Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες είναι φυσικά, για παράδειγμα πρωτογενείς μεταβολίτες (αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα) τότε ονομάζονται Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) και έχουν χαμηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και τοξικότητα. Κάποιοι από τους δέκτες δεσμών H (HBA) είναι μη τοξικά τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα ή αμινοξέα (πχ αλανίνη, προλίνη, γλυκίνη, βεταΐνη) και κάποιοι από τους δέκτες

δεσμών Η (HBD) είναι οργανικά οξέα (πχ οξαλικό, λακτικό, μηλικό οξύ) ή υδρογονάνθρακες (πχ γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη). Αλκοόλες, κετόνες, αμίνες, αλδεΐδες και καρβοξυλικές ομάδες έχουν διπλό ρόλο. Ο συνολικός αριθμός των ενώσεων που θα μπορούσαν να συνθέσουν NaDES προσεγγίζει το ένα εκατομμύριο και σε αυτή τη πληθώρα οφείλεται η προσαρμοστικότητά τους (Mišan et al., 2019). Καθώς τα συστατικά των NaDES προέρχονται από τη φύση, και σε ένα μεγάλο ποσοστό από τα φυτά, μιμούνται το φυσικό τρόπο των φυτών να προστατεύουν τους πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι αδιάλυτοι στο νερό. Επομένως, τα NaDES λειτουργούν ως εναλλακτική υγρή φάση στη φύση και σε αυτή τη συμπεριφορά οφείλεται η υψηλή βιοαποικοδομησιμότητά τους και η χαμηλή τοξικότητά τους, καθιστώντας τους κατάλληλους διαλύτες για καλλυντικές και φαρμακευτικές εφαρμογές (Paiva et al., 2014).

Στη πρωτοπόρα δημοσίευση τους ο Choi και οι συνεργάτες του (2011) υπέθεσαν ότι NaDESs μπορεί να αποτελούν ένα τρίτο τύπο υγρού στα κύτταρα εκτός από το νερό και τα λιπίδια. Αυτό θα έδινε εξήγηση σε κάποια βιολογικά φαινόμενα, όπως η σύνθεση, μεταφορά και αποθήκευση δυσδιάλυτων μεταβολιτών και μακρομορίων και η ικανότητα των φυτών να επιβιώνουν σε συνθήκες ξηρασίας και παγετού εφόσον οι μεμβράνες, τα ένζυμα και οι μεταβολίτες προστατεύονται σε ένα σύστημα πλούσιο σε NaDES όπου η ψύξη αποφεύγεται χάρη στο χαμηλό σημείο ζέσεως του διαλύματος, δρουν δηλαδή ως κρυσταλλοπροστατευτικά. Αυτή ακριβώς η βιολογική αξία των NaDES είναι η ειδοποιός διαφορά τους από DES και IL (Yang, 2019, Vanda et al., 2018, Durand et al., 2016). Η τοξικότητα των NaDES δεν έχει μελετηθεί πλήρως και έτσι δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία. Η ομάδα του Hayyan απέδειξε ότι οι DES έδειξαν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από τους NaDES. Αυτή μπορεί να σχετίζεται με το pH, το ιξώδες, τις κυτταρικές μεταβολικές οδούς και την αλληλεπίδραση του διαλύτη με τις κυτταρικές μεμβράνες (Yang, 2019).

Οι NaDES, παρ' όλο που έχουν παρεμφερείς φυσικοχημικές ιδιότητες με τους IL και DES, υπερτερούν έναντι τους ως πιο «πράσινη» εναλλακτική των συμβατικών διαλυτών, γιατί τα συστατικά τους υπάρχουν σε αφθονία στην αγορά, δεν είναι πτητικοί, επομένως μπορούν να συλλεχθούν και να ανακυκλωθούν, η σύνθεσή τους δεν απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας, δεν εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα, αποδομούνται εύκολα σε μη τοξικά για το περιβάλλον παράγωγα, είναι σταθεροί σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν είναι εύφλεκτοι. Ένα ακόμα προτέρημα αυτών των διαλυτών έγκειται στην ευκολία παρασκευής τους. Οι πιο γνωστές μέθοδοι παρασκευής των Βαθώς Ευτηκτικών Διαλυτών είναι: Θέρμανση και Ανάδευση, Λυοφιλίωση, Εξάτμιση υπό κενό, Λείανση, Θέρμανση με υπερήχους και Μικροκύματα (Hansen et al., 2020, El Achkar et al., 2021, Mišan et al., 2019).

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες οι DES παρουσιάζουν μεγάλο εύρος τιμών ιξώδους, για παράδειγμα οι διαλύτες που έχουν ως βάση σάκχαρα έχουν υψηλότερο ιξώδες από αυτούς με χλωριούχο χολίνη και ακόμα μεγαλύτερο έχουν αυτοί με μεταλλικά άλατα, ενώ οι υδρόφοβοι DES έχουν γενικά χαμηλό ιξώδες (Hansen et al., 2020). Επίσης, οι υδρόφοβοι DES έχουν πυκνότητες κοντά ή

μικρότερες από την πυκνότητα του νερού, ενώ οι υδρόφιλοι DES παρουσιάζουν υψηλότερες πυκνότητες (El Achkar et al., 2021, Yang, 2019, Hansen et al., 2020). Το pH των DES εξαρτάται από τη σχετική οξύτητα των ανιονικών και κατιονικών ειδών που αναμειγνύονται (Hansen et al., 2020). Οι περισσότεροι βαθώς ευτηκτικοί διαλύτες έχουν χαμηλή αγωγιμότητα ($\kappa < 2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ σε θερμοκρασία δωματίου) που αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας (El Achkar et al., 2021, Yang, 2019, Hansen et al., 2020). Στους DES η επιφανειακή τάση εξαρτάται από την αναλογία αλάτων και το τύπο κατιόντων και τέλος, μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας (El Achkar et al., 2021, Yang, 2019, Hansen et al., 2020). Τέλος, οι δεσμοί υδρογόνου θεωρούνται η βασική αιτία για τη μείωση του σημείου ζέσεως κατά το σχηματισμό των DES σε συνεργασία με τις αλληλεπιδράσεις του ζεύγους ιόν-κατιόν. Η αύξηση των δεσμών H συνοδεύεται από αύξηση της πυκνότητας καθώς μειώνεται ο μοριακός ελεύθερος όγκος του συστήματος (Hansen et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια γίνονται εκτενείς έρευνες για την αξιοποίηση των NaDES στην εκχύλιση φαινολικών ενώσεων, αλκαλοειδών, σαπωνινών, αιθέριων ελαίων πρωτεϊνών, τερπενοειδών, ακόρεστων λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Μάλιστα αυτές οι μέθοδοι έδειξαν πιο περιβαλλοντικά φιλικά, γρήγορα και αποδοτικά αποτελέσματα από τις συμβατικές. Οι Bajkacz και Adamek (2018) εκπόνησαν μελέτες σε 17 τύπους NaDES σε διαφορετικές αναλογίες και συνδυασμούς των συστατικών χλωριούχου χολίνης, χλωριούχου ακετυλοχολίνης, τρυγικής χολίνης, βεταΐνης και καρνιτίνης με σκοπό την εύρεση του διαλύτη με τη μέγιστη απόδοση για τα επιθυμητά φλαβονοειδή. Ο ιδανικός ήταν χλωριούχος ακετυλοχολίνη:γαλακτικό οξύ 2:1 με 30% νερό και χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για εκχύλιση φλαβονοειδών από φρούτα, λαχανικά και μπαχαρικά και η αποτελεσματικότητα των εκχυλίσεων ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη με νερό και μεθανόλη (Mišan et al., 2019).

Μετά από μελέτες με συνδυασμούς και άλλων δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου, επιβεβαιώθηκε η εκχυλιστική ικανότητα των NaDES ιδιαίτερα για φαινολικές ενώσεις, η οποία οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και των διαλυτών. Επίσης, οι NaDES πλεονεκτούν στο γεγονός ότι πολλές ουσίες δυσδιάλυτες στο νερό εμφανίζουν ικανοποιητική διαλυτότητα σε αυτούς.

Επιπλέον το «πράσινο» προφίλ των NaDES και η χαμηλή τοξικότητά τους, σε συνδυασμό με τα παραπάνω τους καθιστά κατάλληλη εφαρμογή για φαρμακευτικές εφαρμογές (Paiva et al., 2014).

1.4.3. Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

Αρχή της μεθόδου

Τα βιοδραστικά 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 διήθηση
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.

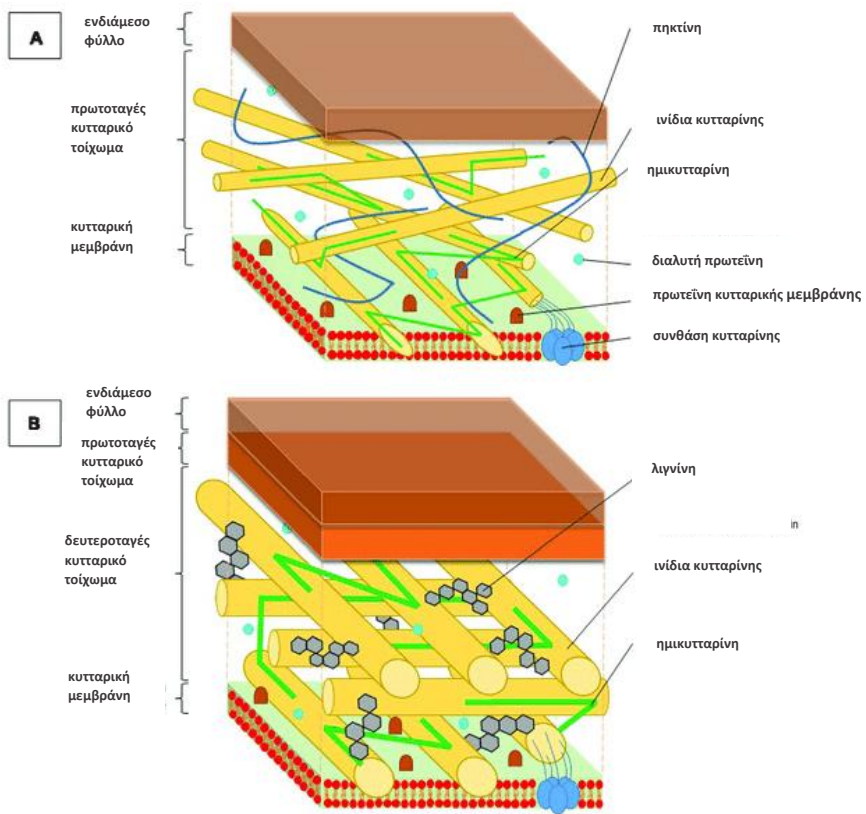
Ένζυμα και Κυτταρικό Τοίχωμα

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 11), το οποίο δομείται από τα παρακάτω συστατικά (Cheng et al., 2015, Gligor et al., 2019) :

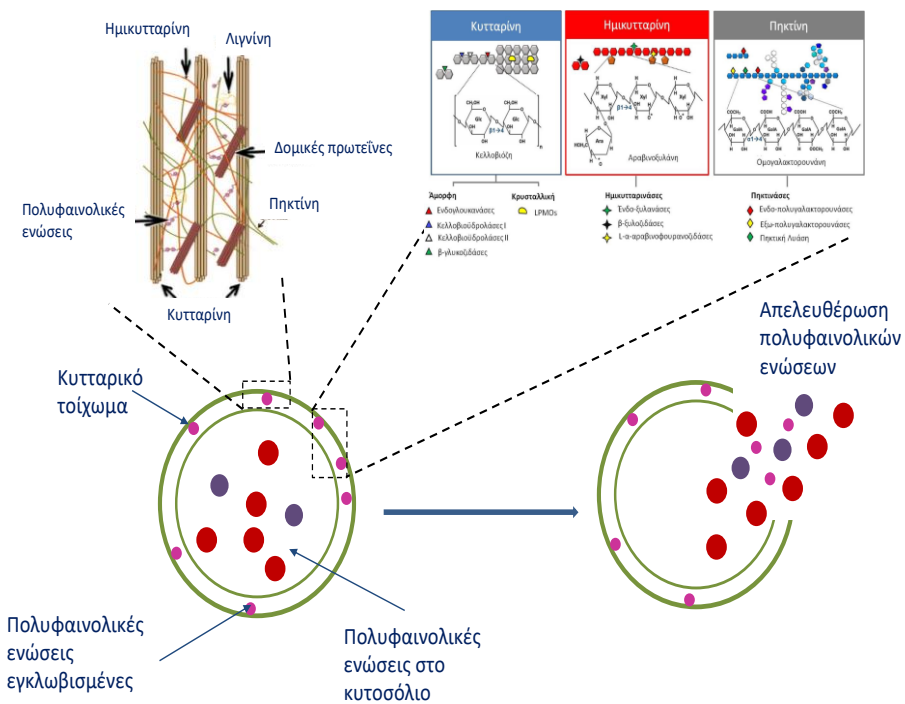
- Κυτταρίνη: πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, του οποίου τα μονομερή συνδέονται με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς
- Ημικυτταρίνη: διακλαδωμένο πολυμερές πεντοζών, δομείται από διαφορετικά ετερογενή πολυμερή υδρογονοαναθράκων, ομόλογα της κυτταρίνης
- Πηκτίνη: πολυσακχαρίτης του α-D-γαλακτουρονικού οξέος και 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 συναπιλική 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 11).

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 12.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων (Loix et al., 2017)



Εικόνα 12: 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 εκχύλισης 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.

Λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του κυτταρικού τοιχώματος και της ισχυρής πρόσδεσης των βιοδραστικών ουσιών στο εσωτερικό του, συχνά είναι χρήσιμος ο συνδυασμός περισσότερων ομάδων ενζύμων, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πηκτινάσες, ξυλανάσες. Η συνεργιστική δράση των ενζύμων αποδομεί πλήρως το κυτταρικό τοίχωμα και συντελεί σε υψηλότερες αποδόσεις (Nadar et al., 2018).

Στο Πίνακα 1 αναφέρονται κάποιες από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που εκχυλίζονται ενζυμικά.

Πίνακας 1. Αντιοξειδωτικές ουσίες, τα ένζυμα με τα οποία εκχυλίζονται και οι πρώτες ύλες από τις οποίες προέρχονται (Nadar et al., 2018).

| Πρώτη ύλη | Αντιοξειδωτική ουσία | Ένζυμο |
|------------------------------|--------------------------|---|
| Σπόροι σταφυλιού, μήλο | Προανθοκυανιδίνες | Πηκτινάση, κυτταρινάση, ταννάση |
| Μήλο, κρεμμύδι | Πολυφαινόλες | Πηκτινάση, βήτα-γλυκανάση, ημικυτταρινάση, ξυλανάση |
| Μήλο, σταφύλι | Αντιοξειδωτικές φαινόλες | Πηκτινάση (pectinex) |
| Σπόροι σταφυλιού, κουνουπίδι | Φαινολικές ενώσεις | Πηκτινάση, βήτα-γλυκανάση, ημικυτταρινάση, ξυλανάση |

Παράμετροι που επηρεάζουν την Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

Η θερμοκρασία της αντίδρασης, ο χρόνος της εκχύλισης, το pH του συστήματος, η συγκέντρωση του ενζύμου και το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος είναι οι βασικοί καθοριστικοί παράγοντες για μια EYE (Cheng et al., 2015, Nadar et al., 2018).

Η κοκκομετρία του δείγματος είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης. Μικρότερο μέγεθος σωματιδίων συνεπάγεται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής υλικού και ενζύμου, επομένως καλύτερη μεταφορά μάζας των βιοδραστικών ουσιών στον όγκο του διαλύτη. Αυτός είναι και ο λόγος που στις περισσότερες περιπτώσεις προηγείται άλεση πριν την εκχύλιση (Chanioti et al., 2014).

Η υγρασία, επίσης, θα πρέπει να είναι σε καθορισμένα επίπεδα γιατί η ενεργότητα του νερού πιθανώς να οδηγήσει σε διόγκωση των ινών κυτταρίνης αυξάνοντας την επιφάνεια που μπορεί να δράσει το ένζυμο (Marathe et al., 2017).

Το βέλτιστο pH για ενζυμική υδρόλυση είναι διαφορετικό για κάθε ένζυμο. Για πολλά είναι στο εύρος του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών, άρα εκεί επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση εκχύλισης. Στο σημείο αυτό οι πρωτεΐνες, δηλαδή τα ένζυμα, είναι ελάχιστα διαλυτές και συνεπώς μειώνει την αποδέσμευση των βιοδραστικών προϊόντων. Άρα πρέπει να επιλεγεί το κατάλληλο pH ώστε να μην είναι διαλυτά τα ένζυμα αλλά και να έχουν ικανοποιητικές αποδόσεις. Επίσης η τιμή του pH μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την προς εκχύλιση ουσία, αυξάνει δηλαδή την εκλεκτικότητα της διεργασίας. Το pH δηλαδή δύναται να μεταβάλλει την ενζυμική πρωτεϊνική δομή και επομένως την ικανότητα δέσμευσης με το υπόστρωμα, άρα και την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Τέλος, ακραίες τιμές pH μπορεί να οδηγήσουν σε μετουσίωση του ενζύμου, πιθανώς μη αναστρέψιμη (Nadar et al., 2018, Casas & González, 2017).

Η θερμοκρασία θα πρέπει επίσης να ελέγχεται καθώς αν η διεργασία πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες το ένζυμο χάνει σταδιακά την ενεργότητά του και απενεργοποιούνται πρωτεΐνες και άλλα βιοδραστικά. Αντίστοιχα, αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες δεν είναι επαρκείς για να επιταχύνουν τη δράση των ενζύμων καταλήγοντας έτσι σε χαμηλές αποδόσεις. Όπως και στη περίπτωση του pH, αύξηση της θερμοκρασίας αρκετά πάνω από το βέλτιστο του ενζύμου, μπορεί να καταλήξει σε μετουσίωση του. Τέλος, η θερμοκρασία θα πρέπει να ρυθμιστεί και ανάλογα την ανεκτικότητα των προς εκχύλιση ενώσεων, το θερμοκρασιακό εύρος που θα επιλεγεί θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε αυτές να είναι σταθερές (Nadar et al., 2018).

Ο λόγος υγρό/στερεό θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε το συνολικό μείγμα να μην είναι πολύ ιξώδες, καθώς έτσι θα δυσχεραίνεται η επαφή του ενζύμου με το υπόστρωμα. Αντίστοιχα, η περίσσεια υγρού θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη στη περίπτωση προϊόντων με μεγάλη διαλυτότητα γιατί αλλιώς θα απαιτηθεί στάδιο διαχωρισμού, αυξάνοντας το συνολικό κόστος αλλά και τα υγρά απόβλητα (Casas & González, 2017).

Η συγκέντρωση του ενζύμου παίζει καθοριστικό ρόλο στο κόστος της εκχύλισης. Συνήθεις τιμές είναι 0,2-3% με την απόδοση να αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού, όπως άλλωστε και το κόστος. Υψηλότερα ποσοστά συνίστανται όταν το υπόστρωμα περιλαμβάνει αναστολείς. Βέβαια, η αύξηση ποσότητας ενζύμου έχει νόημα όταν υπάρχει επαρκές υπόστρωμα για να δημιουργηθούν περισσότεροι δεσμοί, εάν η ποσότητα υποστρώματος είναι περιορισμένη, η προσθήκη ενζύμου δε θα επιφέρει υψηλότερες αποδόσεις (Casas & González, 2017).

Η χρονική διάρκεια επώασης διαφέρει ανάλογα το ένζυμο. Συνήθως, η επέκταση του χρόνου αυτού συμβάλλει στην αποδόμηση των συστατικών της πρώτης ύλης. Μεταβάλλοντας τους προαναφερθέντες παράγοντες ο χρόνος επώασης αυξάνεται ή μειώνεται. Γενικά, η υδρόλυση δε θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα παρατεταμένη επειδή ενεργότητα των ενζύμων ελαττώνεται με το πέρασ του χρόνου (Casas & González, 2017).

Πλεονεκτήματα Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης

Η συγκεκριμένη τεχνική έχει υψηλές αποδόσεις, μικρό χρόνο εκχύλισης και μικρότερο όγκο απαιτούμενου διαλύτη. Επίσης λόγω της εκλεκτικότητας των ενζύμων δεν εκχυλίζονται ανεπιθύμητα συστατικά αποδίδοντας καλύτερης ποιότητας εκχυλίσματα.

Αποτελεί καλή εναλλακτική για την εκχύλιση φυτικών ελαίων η οποία αλλιώς επιτυγχάνεται μέσω συμβατικής εκχύλισης με διαλύτες, όπου πιο κοινός διαλύτης σε αυτή τη περίπτωση είναι το εξάνιο το οποίο έχει απασχολήσει με περιβαλλοντικές συνέπειες.

Μπορεί επίσης να αντικαταστήσει συμβατική εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη. Έτσι αποφεύγεται η δυσκολία να θεσπιστεί ένα οικουμενικό πρωτόκολλο για εκχύλιση φαινολικών, η οποία προκύπτει από τη τάση τους να προσκολλώνται σε άλλα φυτικά μέρη όπως υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες και απαιτούν τη προσθήκη ενός σταδίου καθαρισμού μετά την εκχύλιση με διαλύτες για αν ολοκληρωθεί (Marathe et al., 2017, Nadar et al., 2018).

Εφαρμογές Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης

Η EYE είναι κατάλληλη τεχνική για εκχύλιση όχι μόνο ελαίων και πρωτεϊνών, αλλά και φαινολικών ενώσεων τα οποία έχουν αξία για το τομέα των φαρμάκων και των καλλυντικών.

Η EYE βρίσκει εφαρμογή στην πλήρη απομόνωση των φυτικών χρωστικών και αρωμάτων, όπως η βανιλίνη, αντικαθιστώντας τα συνθετικά που έχουν συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία. Όμοια, οι ανθοκυανίνες εκτός από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες μπορούν να λειτουργήσουν ως φυτικές χρωστικές σε φαρμακευτικά προϊόντα.

Παράλληλα, η EYE είναι πολύ χρήσιμη για εκχύλιση υδρογονοαναθράκων οι οποίοι έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση και στη μοριακή αναγνώριση στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ η βιολογική τους δράση επικεντρώνεται στην επούλωση πληγών, στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και στην αντιμετώπιση όγκων (Marathe et al., 2017).

Μία ακόμα εφαρμογή της ενζυμικής εκχύλισης που εξέτασαν οι Nadar et al. (2018) είναι η αξιοποίηση των υπολειμμάτων που προκύπτουν από τη βιομηχανία των κίτρων (φλούδες και κουκούτσια) τα οποία αποτελούν εξαιρετική πηγή φαινολικών ενώσεων.

Σύμφωνα με τους Casas & González (2017), πιο συνηθισμένη εκχύλιση πολυσακχαριτών είναι συνήθως αυτή της διαβροχής που απαιτεί όμως υψηλές θερμοκρασίες και εκτενή διάρκεια ενώ δεν αποδίδει ικανοποιητικές αποδόσεις και εκχυλίσματα υψηλής καθαρότητας. Τα παραπάνω διορθώνονται με εφαρμογή ενζυμικής υδρόλυσης και μάλιστα με πρώτη ύλη υπολείμματα τροφών και φυτών.

Η ανάπτυξη ενζυμικών καταλυτικών συστημάτων σε μεγάλη κλίμακα μελετάται ενδελεχώς, υπάρχουν όμως κάποιες προκλήσεις στην υλοποίηση κυρίως εξαιτίας του υψηλού κόστους των ενζύμων. Συνεπώς, για να γίνουν ανταγωνιστικά τα εμπορικά ένζυμα θα πρέπει να γίνουν κάποια από τα παρακάτω: ελάττωση του κόστους παραγωγής των ενζύμων, βελτίωσή τους και επαναχρησιμοποίησή τους, μέσω της ακινητοποίησής τους κατά τη διεργασία (Marathe et al., 2017).

Η ακινητοποίηση αυτή των ενζύμων γίνεται είτε σε φορείς όπως οι ζεόλιθοι, το αλουμίνιο και το πυρίτιο είτε σε μαγνητικά νανοσωματίδια (magnetic nanoparticles, MNPs). Τα MNPs συγκεντρώνουν πολλά θεμιτά χαρακτηριστικά. Έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια, εύκολη πρόσβαση στο υπόστρωμα και υποστηρίζουν ικανοποιητική ποσότητα φορτίου. Παράλληλα απομακρύνονται με ευκολία από το διάλυμα με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Εκτός αυτών, η βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητά τους, η χαμηλή τοξικότητα και το κόστος τα καθιστούν ιδανική επιλογή για ακινητοποίηση των ενζύμων (Nadar et al., 2018).

Συνδυασμός Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης με άλλες πράσινες τεχνικές

Πρόσφατα η EYE συνδυάστηκε με υπερήχους, μικροκύματα και υπερκρίσιμα ρευστά για βελτιστοποίηση της διαδικασίας.

Για παράδειγμα ο συνδυασμός με υπερήχους (Ultrasonic-Assisted Enzymatic Extraction, UAE) έχει μελετηθεί στην απομόνωση προϊόντων από πολλά φυτά καθώς οι υπέρηχοι ενισχύουν τις δυνατότητες του ενζύμου και διαχέεται ομοιόμορφα σε όλο το υπόστρωμα. Έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών: χρωστικές, πολυσακχαρίτες, φαινολικές ενώσεις και έλαια (Cheng et al., 2015, Marathe et al., 2017, Nadar et al., 2018).

Ο συνδυασμός μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Enzymatic Extraction, MAEE) και ενζύμων παρουσιάζει αυξημένη απόδοση συγκριτικά με τις μεμονωμένες τεχνικές (εκχύλιση φαινολικών από τους Yang et al. το 2010 και τους Zhang et al. το 2013).

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης σε συνδυασμό με υπερκρίσιμα ρευστά. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός διεργασιών παρουσιάζει αυξημένες αποδόσεις όσον αφορά τις εκχυλιζόμενες βιοδραστικές ενώσεις. (Mushtaq et al., 2015, Marathe et al., 2017, Nadar et al., 2018)

Ο συνδυασμός της ενζυμικής εκχύλισης με Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) είναι μια καινούρια ιδέα που έχει αρχίσει να προσελκύει ενδιαφέρον. Κατά την ενζυμική υδρόλυση τα ένζυμα υδρολύουν τους δεσμούς μεταξύ των μορίων που απαρτίζουν το κυτταρικό τοίχωμα υπό ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, και μετέπειτα μπορούν να δράσουν οι NaDES ως διαλύτης για τις ουσίες που εσωκλείονται στο κυτταρικό τοίχωμα.

Έχουν γίνει έρευνες για να διερευνηθεί ο ρόλος των NaDES ως διαλύτες εκχύλισης με χρήση ενζύμων όπως η πρωτεάση, η λακκάση και η κυτταρινάση (Vanda et al., 2018, Fierascu et al., 2020).

Ο Kumar και οι συνεργάτες του (2016), μελέτησαν τη προκατεργασία βιομάζας από στελέχη ρυζιού (rice stew biomass) με NaDES με στόχο την απομάκρυνση της λιγνίνης από τη κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη ώστε να διευκολυνθεί το έργο της κυτταρινάσης (Cellic CTec2). Ο NaDES που μελετήθηκε, γαλακτικό οξύ: χλωριούχος χολίνη 5:1, απομάκρυνε λιγνίνη υψηλής καθαρότητας (> 90%) σε ένα στάδιο. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 24 και 48 ώρες. Ο διαλύτης ανακτήθηκε με περιστροφικό εξατμιστήρα και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στον επόμενο κύκλο επεξεργασίας της βιομάζας χωρίς περαιτέρω επεξεργασία (Vanda et al., 2018, Kumar et al., 2016, Mehariya et al., 2021).

Οι NaDES εφαρμόζονται στην λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα οι καθώς μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς με τη λιγνίνη, ισχυρότερους από αυτούς που σχηματίζει με τα υπόλοιπα στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας στην απομάκρυνσή της από αυτό. Κατά αυτό το τρόπο η δράση των κυτταρινάσων και των ημικυτταρινάσων διευκολύνεται και αυξάνεται η απόδοση της διεργασίας με ταυτόχρονη μείωση του χρόνου εκχύλισης (Song et al., 2020).

Μία εφαρμογή του συνδυασμού αυτού που έχει μελετηθεί είναι η απομόνωση της φυτοχημικής πολυφαινόλης υδροξυτυροσόλη, από τα φύλλα της ελιάς. Έχει πολύ έντονη αντιοξειδωτική δράση και πολλές θεραπευτικές ιδιότητες αλλά η εκχύλιση της με τις μέχρι τώρα μεθόδους παρουσιάζει χαμηλές αποδόσεις. Η εκχύλιση Soxhlet ήταν η πιο συμφέρουσα αλλά συνοδεύεται από αύξηση της θερμοκρασίας που επηρεάζει αρνητικά την ένωση. Μία από τις εναλλακτικές που μελετήθηκαν ήταν η προκατεργασία των δειγμάτων με κυτταρινάση και κατόπιν η προσθήκη NaDES, με απόδοση 1.8 φορές μεγαλύτερη από τα δείγματα απουσία ενζύμου (Mehariya et al., 2021).

Ο συνδυασμός NaDES με ενζυμική εκχύλιση μπορεί να ενισχυθεί επίσης και με κάποια από τις άλλες πράσινες μεθόδους εκχύλισης, με υπερήχους ή μικροκύματα.

Πρόσφατα διεξήχθη μια μελέτη για τη περιβαλλοντικά φιλική και αποδοτική εκχύλιση πολυσακχαριτών από το φυτό *Radix Bupleuri* με ένα συνδυασμό NaDES

και ενζυμικής εκχύλισης με υπερήχους. Ο NaDES που επιλέχθηκε, ουρία: χλωριούχος χολίνη 1:3 με συνδιαλύτη νερό σε ποσοστό 20%, επαναχρησιμοποιήθηκε και όχι μόνο δεν έδειξε εξασθενημένη εκχυλιστική δράση αλλά ακόμα υψηλότερη στον τρίτο κύκλο επαναχρησιμοποίησης συγκριτικά με τον πρώτο. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ανακυκλωσιμότητα των NaDES (Wang & Li, 2022).

2. Μέθοδοι και Υλικά

2.1. Υλικά & Όργανα

Τα αντιδραστήρια και τα τυποποιημένα χημικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και οι αντίστοιχες εταιρείες από τις οποίες προμηθεύτηκαν, αναγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Κατάλογος αντιδραστηρίων, τυποποιημένων χημικών παρασκευασμάτων και αντίστοιχων εταιρειών

| A/A | Ονομασία Αντιδραστηρίου | Εταιρεία |
|-----|--|--------------------------------------|
| 1 | Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu | CARLO ERBA Reagents GmbH |
| 2 | Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3) | Acros Organics (Thermo Scientific) |
| 3 | Νιτρώδες Νάτριο ($NaNO_2$) | Merck KGaA |
| 4 | Χλωριούχο Αργίλιο ($AlCl_3$) | Acros Organics (Thermo Scientific) |
| 5 | Υδροξείδιο του Νατρίου ($NaOH$) | Sigma-Aldrich |
| 6 | DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλιο) | Sigma-Aldrich |
| 7 | Μεθανόλη, HPLC grade ($MeOH$) | Fisher Chemical (Fischer Scientific) |
| 8 | Κιτρικό οξύ, άνυδρο ($C_6H_8O_7$) | PENTA chemicals |
| 9 | Ανθρακικό Ασβέστιο ($CaCO_3$) | Sigma-Aldrich |
| 10 | 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) | Sigma-Aldrich |
| 11 | Πυκνό Υδροχλωρικό οξύ (HCl) | Fisher Chemical (Fischer Scientific) |
| 12 | Βεταΐνη | ΣΕΛΚΟ ΧΗΜΙΚΑ Α.Ε. |
| 13 | Γλυκερόλη άνυδρη ($C_3H_8O_3$) | Lach-ner |
| 14 | Ξυλάνη (xylan from oat spelts, $(C_5H_8O_4)_n$) | Carl Roth |
| 15 | Αζο-καζεΐνη (Azo-casein protease substrate) | Sigma-Aldrich |
| 16 | Filter paper Whatman No.1 | Sigma-Aldrich |
| 17 | Όξινο Φωσφορικό Νάτριο (Na_2HPO_4) | Sigma-Aldrich |
| 18 | Διόξινο Φωσφορικό Νάτριο (NaH_2PO_4) | Sigma-Aldrich |
| 19 | Τριχλωροξικό οξύ (TCA) | Sigma-Aldrich |
| 20 | τρισαμινομεθάνιο ή τρομεθαμίνη (Tris) | Sigma-Aldrich |
| 21 | Πηκτίνη | - |

Τα όργανα και οι συσκευές του εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων και των μετρήσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Κατάλογος οργάνων και συσκευών

| A/A | Είδος οργάνου/ συσκευής | Μοντέλο/ Εταιρεία |
|-----|--|--|
| 1 | Θερμοστατούμενος ηλεκτρικός Αναδευτήρας | Thermomixer comfort with 2ml Block, Eppendorf® |
| 2 | Φωτόμετρο UV-Vis | S-22 UV-Vis Spectrophotometer, BOECO |
| 3 | Φωτόμετρο UV-Vis | UV-1280, Shimadzu |
| 4 | Μικροφυγόκεντρος πάγκου | 3200 Microcentrifuge, Eppendorf® |
| 5 | Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας | ABS 80-4N, KERN & SOHN GmbH |
| 6 | Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας | M6202, Bel Engineering® |
| 7 | Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο | (-) |
| 8 | Συσκευή μέτρησης pH | pH 537, WTW |
| 9 | Μαγνητικός αναδευτήρας – Θερμαντική πλάκα (1600 rpm, 180 °C) | Nahita-Blue 692, Auxilab S.L. |
| 10 | Vortex σωληναρίων ρυθμιζόμενο | RSLAB-6PRO, RS Lab |

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

2.2. NaDES

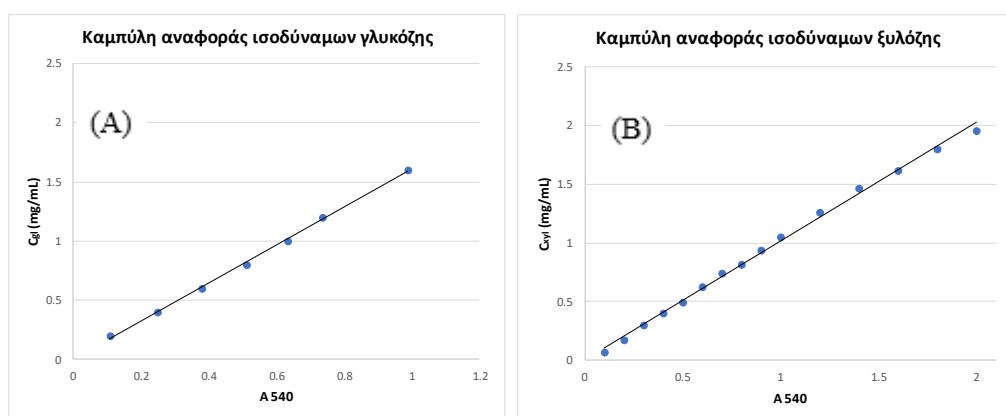
Οι NaDES που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Ε.Μ.Π. και ήταν: Βεταΐνη-Γλυκερόλη (Bet:Gly) 1:2 και Βεταΐνη-Γλυκερόλη (Bet:Gly) 1:3. Χρησιμοποιήθηκε ως συν-διαλύτης το νερό σε ποσοστά 20, 35 και 50% v/v. Η μεταβολή του pH με την προσθήκη του συν-διαλύτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 4. Τιμές pH των NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 για ποσοστά συν-διαλύτη (H₂O) 0, 20, 35 και 50% v/v.

| Ποσοστό H ₂ O | pH Bet:Gly 1:3 | pH Bet:Gly 1:2 |
|--------------------------|----------------|----------------|
| 0% | 8,0 | 9,5 |
| 20% | 7,5 | 8,1 |
| 35% | 7,7 | 7,8 |
| 50% | 7,2 | 7,5 |

2.3. Προσδιορισμός Ολικών Αναγωγικών Σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (ή 2-υδρόξυ-3,5-δινιτροβενζοϊκό οξύ) (Miller, 1959). Στα Διαγράμματα 1A και 1B παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς των αναγωγικών σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης. και ξυλόζης αντίστοιχα Η εξίσωση της καμπύλης της γλυκόζης είναι ίση με $y = 1,6097x$ με $R^2 = 0,9921$ και της ξυλόζης είναι ίση με $y = 1,2103x$ με $R^2 = 0,9915$.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη συγκέντρωσης ισοδύναμων γλυκόζης (A) και ξυλόζης (B) ως προς την απορρόφηση στα 540nm

2.4. Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμων

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ή υδρόλυση 1 μmol προϊόντος ή υποστρώματος αντίστοιχα στην μονάδα του χρόνου σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

2.4.1. Ολική Ενεργότητα Κυτταρινασών (FPU)

Ο υπολογισμός της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών ή αλλιώς Filter Paper Units (FPU) στηρίζεται στον υπολογισμό του συνόλου των κυτταρινολυτικών ενζύμων (ένδο-, έξω γλουκανάσες, β-γλυκοζιδάση) που περιέχονται στο ενζυμικό εμπορικό σκεύασμα.. Σε 50 mg Filter Paper Whatman No1 προστίθεται 1 mL ρυθμιστικού

διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών 50 mM, pH=5.5 και 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά στους 50°C, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου. Στο υπερκείμενο υγρό μετρώνται τα απελευθερωθέντα σάκχαρα με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Τα units/ ml υπολογίζονται από την εξίσωση 1:

$$\frac{Units_{cellulase}}{ml_{σκευάσματος}} = Abs \cdot Calibration Curve_{glucose} \cdot \frac{V_{total}}{V_{enzyme}} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1000}{Mr_{glucose}} \cdot Dilution \quad (1)$$

Όπου:

Abs: η απορρόφηση στα 540 nm,

$Calibration Curve_{glucose}$: 1,6097 με $R^2 = 0,9921$ (Από το Διάγραμμα 1A)

V_{total} =ο συνολικός όγκος του δείγματος (1.5 mL)

V_{enzyme} =ο όγκος του αραιωμένου ενζύμου στο δείγμα (0.5 mL)

t=ο χρόνος που διαρκεί η αντίδραση (60 λεπτά)

$Mr_{glucose}$ =180.16 g/mol

Dilution: η αραίωση του ενζύμου



Εικόνα 13. Ο υπολογισμός της ολικής ενεργότητας κυτταρινασών με τη μέθοδο 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).

2.4.2. Ενεργότητα Ξυλανάσης

Η ενεργότητα της ξυλανάσης προσδιορίζεται με επώαση του ενζύμου σε διάλυμα 1% ξυλάνης από βρώμη (για την παρασκευή του υποστρώματος η ξυλάνη διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα για 10 λεπτά στους 80°C, ακολούθησε βρασμός για 2 λεπτά και ολονύκτια ανάδευση χωρίς θέρμανση) (Puls & Putanen, 1989). Σε 450μL υποστρώματος προστίθεται 50 μL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου και επωάζεται για 10 λεπτά στους 50°C. Τα απελευθερωθέντα σάκχαρα μετρήθηκαν με τη μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller, 1959).

Τα units/ ml υπολογίζονται από την εξίσωση 2:

$$\frac{Units_{xylo\text{anase}}}{ml_{\text{σκευάσματος}}} = Abs \cdot Calibration Curve_{xylose} \cdot \frac{V_{total}}{V_{enzyme}} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1000}{Mr_{xylose}} \cdot Dilution \quad (2)$$

Όπου:

Abs: η μέση απορρόφηση στα 540 nm

$Calibration Curve_{xylose}$: 1.2103 με $R^2 = 0,9915$ (Από το Διάγραμμα 1B)

V_{total} =ο συνολικός όγκος του δείγματος (1.5 mL)

V_{enzyme} =ο όγκος του αραιωμένου ενζύμου στο δείγμα (0.5 mL)

t=ο χρόνος που διαρκεί η αντίδραση (15 λεπτά)

Mr_{xylose} =150.13 g/mol

Dilution: η αραιώση του ενζύμου

2.4.3 . Ενεργότητα Πρωτεάσης

Η ενεργότητα της πρωτεάσης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της υδρόλυσης της αζοκαζεΐνης. Παρασκευάζεται διάλυμα 0,2% w/w αζοκαζεΐνης χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα τρισαμινομεθάνιου-υδροχλωρικού οξέος Tris-HCl με pH=8.0. Σε 2 mL διαλύματος αζοκαζεΐνης προστίθενται 50 μL κατάλληλα αραιωμένου ενζύμου και τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 40°C σε υδατόλουτρο. Ακολουθεί προσθήκη 2mL τριχλωροξικού οξέος (TCA) συγκέντρωσης 0.1 M και τα δείγματα φυγοκεντρούνται. Συλλέγονται 2mL από το υπερκείμενο και ακολουθεί προσθήκη 2mL NaOH συγκέντρωσης 0.5 M. Τα δείγματα αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρούνται στα 440 nm (Kocabişik & Erden, 2002).

Τα units/ ml υπολογίζονται από την εξίσωση 3 :

$$\frac{Units_{protease}}{ml_{\text{σκευάσματος}}} = Abs \cdot 0,1 \cdot Dilution \quad (3)$$

Όπου:

Abs: η μέση απορρόφηση στα 235 nm

Dilution: η αραιώση του ενζύμου



Εικόνα 14. Υπολογισμός της ενεργότητας πρωτεασών με τη μέθοδο της υδρόλυσης της αζοκαζείνης.

2.4.4. Ενεργότητα Πηκτινάσης

Η ενεργότητα της λυάσης προσδιορίστηκε με μέτρηση της αύξησης της οπτικής πυκνότητας στο υπεριώδες ($\lambda=235 \text{ nm}$).

Σε 950 μL διαλύματος πηκτίνης 4 (g/L) σε $\text{pH}=6.0$ σε τοποθετούνται 50 μL αραιωμένου ενζύμου, τα δείγματα επωάζονται στους 45°C σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών προστίθενται 3 mL HCl 0.5 M για να σταματήσει η ενζυμική δράση. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 235 nm.

Τα units/ml υπολογίζονται από την εξίσωση 4:

$$\frac{\text{Units}_{\text{pectinase}}}{\text{ml}_{\text{σκευάσματος}}} = 1 \text{ cm} \cdot \frac{\text{Abs}}{5500} \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{\text{Dilution}} \quad (4)$$

Όπου:

Abs: η μέση απορρόφηση στα 235 nm

Dilution: η αραιώση του ενζύμου

2.5. Σταθερότητα Ενζυμικών Σκευασμάτων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της σταθερότητας των πέντε εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων (Cellic® CTec3 HS, Cellic® CTec2 HS, Pectinex® Ultra Color, Neutrase® και Viscoferm®) σε φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES), σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM $\text{pH}=7.5$ και σε δύο θερμοκρασίες 40 και 50°C . Πιο συγκεκριμένα, κάθε ενζυμικό σκεύασμα τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε φυσικά βαθέως ευτηκτικό διαλύτη ο οποίος περιείχε ως συν-διαλύτη νερό μέχρι ποσοστού 50% (v/v). Ακολουθεί επώαση στις δύο θερμοκρασίες. Δείγματα ελήφθησαν στις 0,2,4,6, και 24 ώρες. Μετρήθηκε η εναπομένουσα ενεργότητα σύμφωνα με τις μεθόδους προσδιορισμού ενεργότητας του κάθε ενζυμικού σκευάσματος όπως

περιγράφεται στις παραγράφους 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4. Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.

2.6. Εκχυλίσαις

2.6.1. Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες
Εξετάζεται η επίδραση του ποσοστού συν-διαλύτη στο σύστημα (στη συγκεκριμένη περίπτωση νερό), για σταθερή αναλογία στερεού υγρού 7.5% (w/v), σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% (v/v) και σταθερή κοκκομετρία (<500 μm). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η προσθήκη 20%, 35% και 50% νερού στον βαθέως ευτηκτικό διαλύτη που επιλέχθηκε μετά την μελέτη σταθερότητας των ενζύμων, σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, μεταφέρονται σε προζυγισμένα Eppendorf των 2 mL **75 mg** κονιοποιημένο περικάρπιο του καρπού του *Rosa Canina* L. Προστίθεται **1 mL** NaDES και το ενζυμικό φορτίο ρυθμίζεται σταθερά στο 1% v/v του συνολικού όγκου, δηλαδή **10 μL**, εφόσον ο τελικός όγκος είναι 1 mL. Το τυφλό δείγμα παρασκευάζεται κατά τον ίδιο τρόπο αλλά το ένζυμο αντικαθίσταται με ρυθμιστικό διάλυμα ($HNa_2PO_4-H_2NaPO_4$) 0.5 mM με pH=7.5.

Ακολουθεί ανάδευση σε vortex έως ότου το στερεό αναμειχθεί πλήρως με το διαλύτη και τα δείγματα μεταφέρονται σε thermomixer σε θερμοκρασία εκχύλισης 40°C και 1300 rpm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Δείγματα ελήφθησαν στις 0,2,4,6, και 24 ώρες, και προσορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδής ενώσεις καθώς και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, με τις μεθόδους που περιγράφονται στην παράγραφο 2.6.2.

2.6.2. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

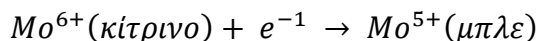
Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται ως προς τρεις παραμέτρους: το Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων ή Total Phenolic Content (TPC), το Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών ή Total Flavonoid Content (TFC) και την Αντιοξειδωτική δράση μέσω προσδιορισμού της ικανότητας δέσμησης της ρίζας DPPH.

Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων (TPC)

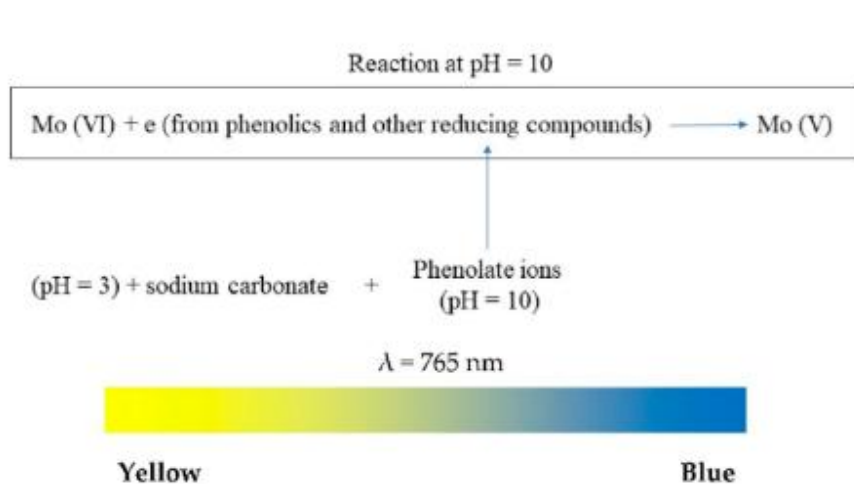
Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα *Rosa canina* L., πραγματοποιείται με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε αλκαλικό περιβάλλον.

Η ανάλυση F-C είναι κατά βάση μια οξειδοαναγωγική μέθοδος, αφού βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις φαινολικές ενώσεις στα σύμπλοκα φωσφομολυβδαινικού/φωσφοβολφραμικού οξέος σε αλκαλικές συνθήκες. Ειδικότερα, το φαινολικό ιόν ανάγει το Mo^{6+} σε Mo^{5+} και αντίστοιχα το μολυβδαίνιο οξειδώνει την υδροξυ-ομάδα στις ενώσεις των φαινολικών ιόντων. Η μεταφορά αυτών των ηλεκτρονίων προκαλεί αλλαγή χρώματος, η οποία στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευθεί στα 760 nm. Το μπλε χρώμα που εμφανίζεται κατά

την αναγωγή του αντιδραστηρίου F-C πιστεύεται ότι οφείλεται σε ένα συντονισμένο είδος μολυβδαινίου (V), αν και ο πλήρης χαρακτηρισμός της δομής είναι ακόμα άγνωστος (Εικόνα 18).



Χρησιμοποιώντας τον νόμο Lambert-Beer, η απορρόφηση στα 760 nm μπορεί στη συνέχεια να βαθμονομηθεί χρησιμοποιώντας μια πρότυπη ένωση, συνήθως το γαλλικό οξύ αλλά και το φερουλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, η κατεχόλη και η κατεχίνη (Bastola et al., 2017, Platzer et al., 2021).

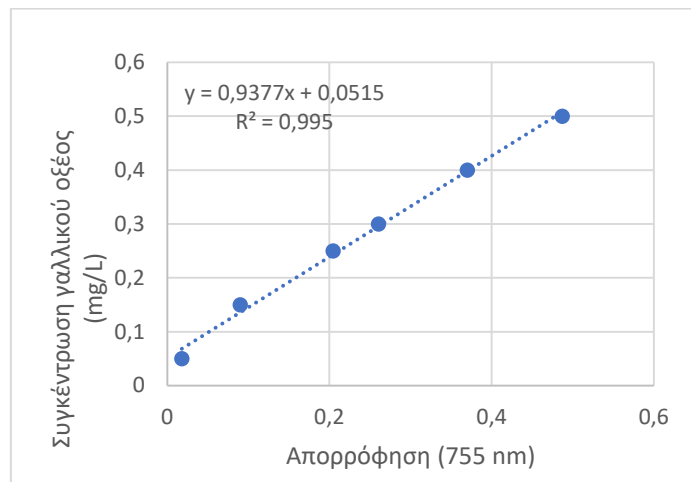


Εικόνα 15. Οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της φαινόλης και του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Bibi Sadeer et al., 2020).

Η μέθοδος F-C είναι εύκολη και με επαναληψιμότητα αλλά εμφανίζει μια αδυναμία όσον αφορά την ακρίβεια καθώς δεν είναι απόλυτα εκλεκτική σε φαινόλες αλλά το αντιδραστήριο μετράει οποιαδήποτε ουσία στη φυτική μήτρα οξειδώνεται, όπως σάκχαρα και ασκορβικό οξύ. Επομένως πιθανώς να προκύψουν ψευδώς υψηλότερες τιμές (Bibi Sadeer et al., 2020).

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

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



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

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι: $y = 937,68 \cdot x + 51.518$ με $R^2 = 0,995$, όπου y η συγκέντρωση γαλλικού οξέος σε mg/L και x οι τιμές απορρόφησης στα 755 nm.

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 5.

$$TPC \left(\frac{\text{mg γαλλικού οξέος}}{L} \right) = \frac{C_{gal} \cdot V_{εκχ} \cdot Dilution}{m_{rosa}} \quad (5)$$

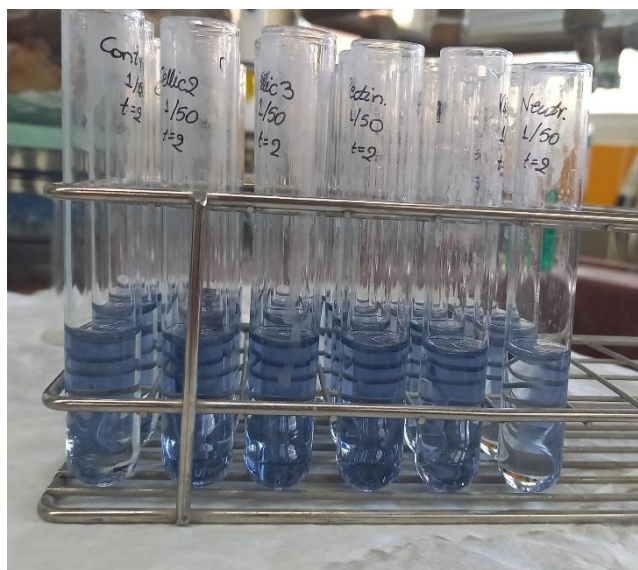
Όπου:

C_{gal} : η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε $\frac{\text{mg γαλλικού οξέος}}{L}$

$V_{εκχ}$: ο όγκος εκχυλίσματος σε L

m_{rosa} : η μάζα του κονιοποιημένου περικαρπίου R. canina L.) σε g

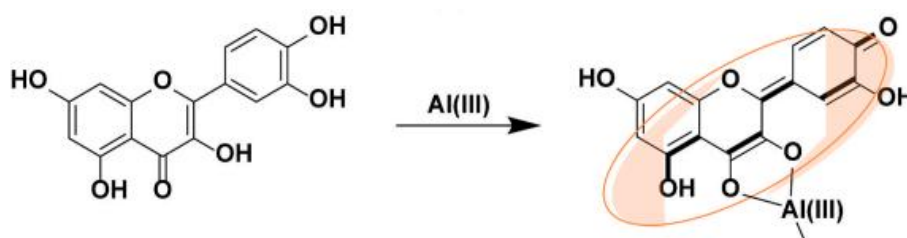
Dilution: η αραίωση του εκχυλίσματος



Εικόνα 16. Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών (TFC)

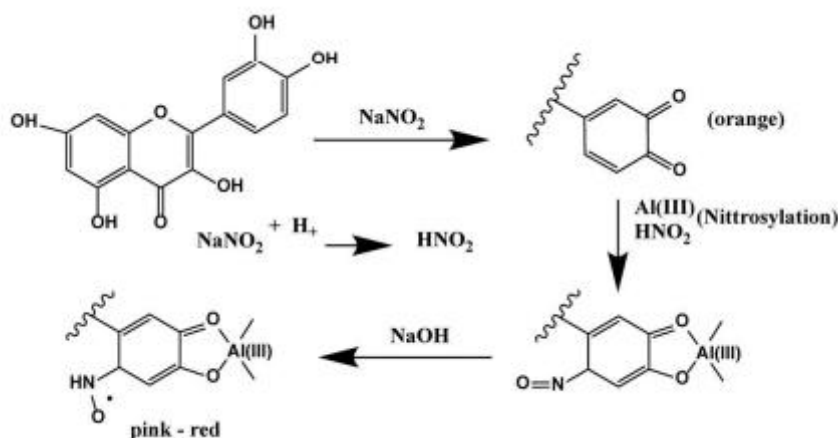
Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή στα εκχυλίσματα *Rosa canina* L., πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο $AlCl_3$ και στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου των φλαβονοειδών με το Al^{3+} (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Δημιουργία συμπλόκου του φλαβονοειδούς κερσετίνη με τον Al^{3+} (Shraim et al., 2021, Ρεκαλ & Pырzynska, 2014).

Η μεθοδολογία προτάθηκε πρώτη φορά από τους Christ και Muller το 1960 για το προσδιορισμό των φλαβονολικών παραγώγων στα φάρμακα. Λόγω των πολλών καρβονυλίων και υδροξυλίων τους, τα φλαβονοειδή έχουν μεγάλη συγγένεια να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα όπως το τρισθενές Al^{3+} , κυρίως σε αναλογία 1:1, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες συμπεριλαμβανομένης της τιμής του pH και του χρόνου της αντίδρασης. Μία από τις τροποποιήσεις που έλαβε η μέθοδος ήταν η εισαγωγή $NaNO_2$ πριν τη προσθήκη νιτρώδους νατρίου ($AlCl_3$). Το νιτρώδες νάτριο χρησιμεύει ως παράγοντας νιτροποίησης, ο οποίος είναι εκλεκτικός για τους αρωματικούς δακτυλίους που διαθέτουν κατεχολική δομή με τρεις ή τέσσερις θέσεις αδέσμευτες ή μη στερεοχημικά παρεμποδισμένες, για την παραγωγή ενός παραγώγου φλαβονοειδούς-νιτροξυλίου που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση

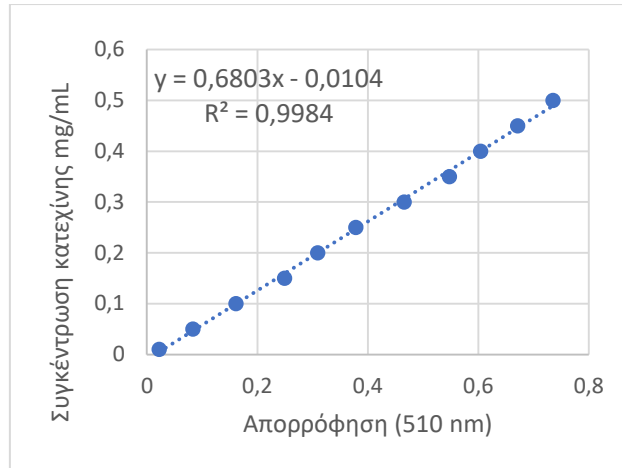
μιας νέας ζώνης απορρόφησης περίπου στα 510 nm. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο μεταξύ των φλαβονοειδών και του τρισθενούς ιόντος αργιλίου έχει αρχικά κίτρινο χρώμα, το οποίο μετατρέπεται σε ροζ-πορτοκαλί με την προσθήκη αλκαλικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH). Η προτιμώμενη ουσία αναφοράς είναι η κατεχίνη αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλες ενώσεις όπως η κερσετίνη και η ρουτίνη (Shraim et al., 2021, Ρεκαί & Pyszynska, 2014). Ο μηχανισμός της συμπλοκοποίησης του τρισθενούς ιόντος αργιλίου Al^{3+} και των φλαβονοειδών παρουσιάζεται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18. Συμπλοκοποίηση Al^{3+} και φλαβονοειδών (στη συγκεκριμένη περίπτωση η κερσετίνη) παρουσία $NaNO_2$ (Shraim et al., 2021, Ρεκαί & Pyszynska, 2014).

Η πειραματική διαδικασία κατά την οποία προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων *R. canina* L. σε φλαβονοειδή έχει ως εξής. Το πρώτο βήμα είναι η λήψη 100 mL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος και η προσθήκη σε αυτά 60 mL διαλύματος $NaNO_3$ (5%) και ακολουθεί ανάδευση και αναμονή για 6 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 120 mL διαλύματος $AlCl_3$ (10%) και ακολουθεί ανάδευση και αναμονή για 5 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται 600 mL διαλύματος $NaOH$ (1M) και 120 mL απιονισμένου H_2O , το μείγμα αναδεύεται σε vortex και ακολουθεί αναμονή για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 100 mL εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 100 mL απιονισμένου νερού. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 510 nm.

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



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

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι: $y = 0,6803 \cdot x - 0,0104$ με $R^2 = 0,9984$, όπου y η συγκέντρωση κατεχίνης σε mg/mL και x οι τιμές απορρόφησης στα 510 nm.

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε ολικά φλαβονοειδή (TFC) υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 6.

$$TFC \left(\frac{\text{mg κατεχίνης}}{L} \right) = \frac{C_{cat} \cdot V_{εκχ} \cdot Dilution}{m_{rosa}} \quad (6)$$

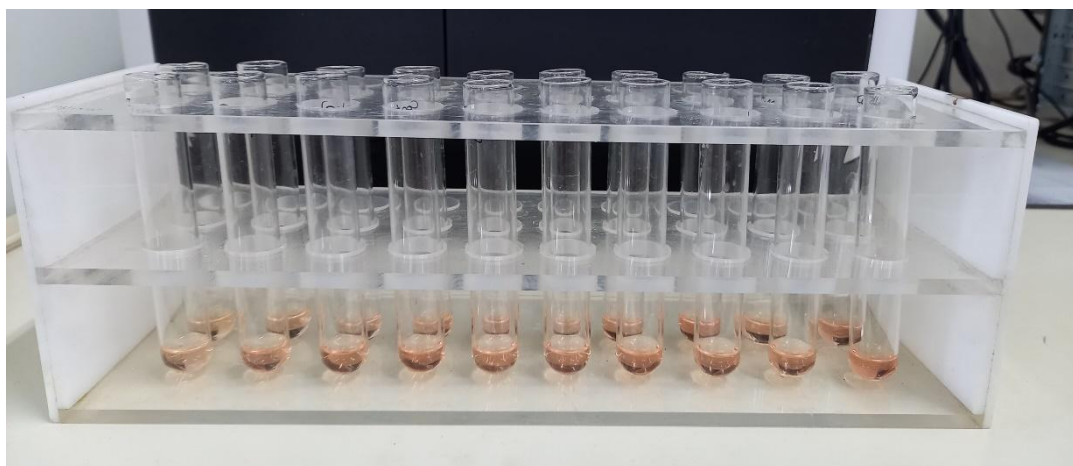
Όπου:

C_{cat} : η συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε $\frac{\text{mg κατεχίνης}}{L}$

$V_{εκχ}$: ο όγκος εκχυλίσματος σε L

m_{rosa} : η μάζα του κονιοποιημένου περικαρπίου *R. canina* L. σε g

Dilution: η αραίωση του εκχυλίσματος

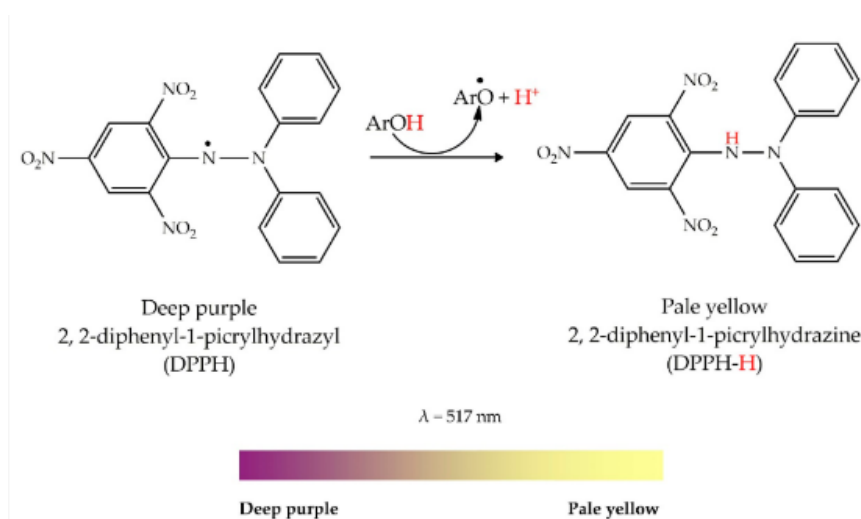


Εικόνα 19. Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.

Αντιοξειδωτική δράση (δέσμευση ρίζας DPPH)

Η ρίζα DPPH ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1920 από τους Goldschmidt και Renn. Διαθέτει έντονο ιώδες χρώμα, εμφανίζει μεγάλη απορρόφηση στα 515 nm και μεγάλη σταθερότητα λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού.

Η μέθοδος για μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης αναπτύχθηκε το 1958 από τον Blois. Κατά την αντίδραση με το δείγμα, το οποίο ελέγχεται ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, η ρίζα DPPH αποσπά άτομα H και το χρώμα αλλάζει σε κίτρινο. Στην Εικόνα 20 αναγράφεται ο μηχανισμός απενεργοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH.



Εικόνα 20. Μηχανισμός δράσης του 2,2-διφαινουλ-1-πικρυλυδραζύλιου (DPPH) με φαινολικό AO (ArOH) (Bibi Sadeer et al., 2020).

Η μέθοδος είναι διαδομένη καθώς είναι οικονομική, απλή, εύκολη, μικρής διάρκειας (30 λεπτά), εμφανίζει ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Έχει όμως και περιορισμούς. Η πειραματική διαδικασία είναι σημαντικό να εκπονείται σε σκοτεινό

χώρο καθώς η απορρόφηση της ρίζας στη μεθανόλη μειώνεται υπό έκθεση φωτός. Επίσης η ρίζα DPPH είναι διαλυτή μόνο σε οργανικούς διαλύτες και είναι ευαίσθητη σε κάποιες βάσεις κατά Lewis (Salim et al., 2022, Bibi Sadeer et al., 2020).

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH από τα εκχυλίσματα *R. canina* L. εφαρμόστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που έχουν προτείνει οι Brand-Williams (1995) με μερικές τροποποιήσεις.

Αρχικά, ζυγίζονται 2.5 mg DPPH, τα οποία μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα, προστίθεται μικρή ποσότητα μεθανόλης και ακολουθεί έντονη ανακίνηση, μέχρι πλήρους διάλυσης του αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια, γίνεται πλήρωση με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή της φιάλης και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση. Παράλληλα, τα δείγματα των εκχυλισμάτων αραιώνονται κατάλληλα με απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση C_0 , και πραγματοποιούνται περαιτέρω οι υδατικές αραιώσεις: $0,8C_0$, $0,6C_0$, $0,4C_0$ και $0,2C_0$. Έπειτα, σε 50 μL από κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος (C_0 , $0,8C_0$, $0,6C_0$, $0,4C_0$ και $0,2C_0$) προστίθενται 1,95 mL διαλύματος DPPH και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα επωάζονται σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα μετρείται η απορρόφησή τους σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 515 nm. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και για την παρασκευή δύο τυφλών δειγμάτων, στα οποία αντί για 50 μL αραιωμένου εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 50 μL απιονισμένου νερού.

Μετά την καταγραφή των απορροφήσεων, σχεδιάστηκε το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυψελίδων (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος). Η % αναστολή ορίζεται με την Εξίσωση 7:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \cdot 100\% \quad (7)$$

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

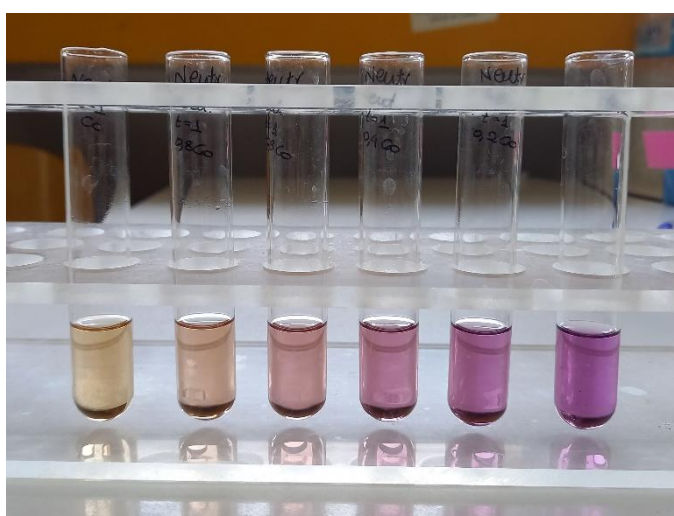
Έπειτα, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης υπολογίζεται ο δείκτης IC_{50} , ο οποίος υποδηλώνει την απαιτούμενη ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για να δεσμεύσει το 50% της ρίζας DPPH. Ο δείκτης IC_{50} προκύπτει από την Εξίσωση 8 :

$$IC_{50} \left(\frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \right) = \frac{50-b}{a} \quad (8)$$

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



Εικόνα 21. Μεθανολικό διάλυμα DPPH 2.5% w/v



Εικόνα 22. Μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. Χαρακτηρισμός εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων

Τα ενζυμικά σκευάσματα που μελετήθηκαν στις πειραματικές σειρές ήταν εμπορικά της εταιρείας Novozymes με κυτταρινολυτική (Cellic® CTec3 HS, Cellic® CTec2 HS), πηκτινολυτική (Pectinex® Ultra Color), πρωτεολυτική (Neutrase®) και ημικυτταρινολυτική δράση (Viscoferm®).

Το είδος των ενζύμων, η ενεργότητά τους, καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες δράσης τους συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 5. Χαρακτηρισμός των εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων

| Εμπορική ονομασία | Είδος ενζύμου | Σύσταση | Βέλτιστες συνθήκες δράσης (T, pH) | Ενεργότητα |
|-----------------------|--------------------|---|-----------------------------------|---|
| Cellic® CTec3 HS | Κυτταρινολυτικό | Κυτταρινάσες Ημικυτταρινάσες | 50-55°C 4.75-5.25 | 134 FPU/ mL σκευάσματος |
| Cellic® CTec2 HS | Κυτταρινολυτικό | Κυτταρινάσες Ημικυτταρινάσες | 50-55°C 5.00-5.50 | 115 FPU/ mL σκευάσματος |
| Pectinex® Ultra Color | Πηκτινολυτικό | Πηκτινάσες Ημικυτταρινάσες | 15-55°C 2.80-6.50 | 616 pectin lyase/ mL σκευάσματος) |
| Neutrase® | Πρωτεϊνολυτικό | Πρωτεάση | 30-65°C 6.00-9.00 | 6.5 protease/ mL σκευάσματος |
| Viscoferm® | Ημιπυτταρινολυτικό | Ξυλανάσες Β-γλυκοζιδάσες Κυτταρινάσες | 30-80°C 5.50-6.50 | 2224 xylanase/mL σκευάσματος |

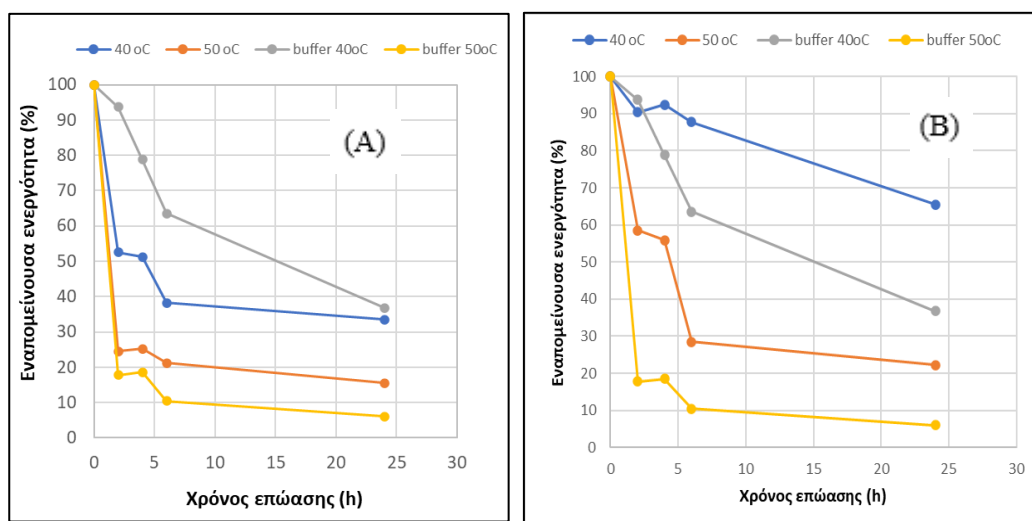
3.2. Μελέτη της σταθερότητας των ενζύμων σε Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες

Μελετήθηκε η σταθερότητα των πέντε ενζυμικών σκευασμάτων σε φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES) και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM με pH=7.5. Οι φυσικά βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε μοριακή αναλογία 1:2 και 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35 και 50% και θερμοκρασίες 40°C και 50°C.

3.2.1. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS σε NaDES

Ενζυμική σταθερότητα του Cellic CTec3 HS σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20%

Στο Διάγραμμα 4 (A) παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 και 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS. Το κυτταρινολυτικό σκευάσμα Cellic® CTec3 HS διατήρησε το 36% της ενεργότητάς του κατά την επώασή του σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7.5 στους 40°C για 24 ώρες, ενώ έχασε σχεδόν το σύνολο της ενεργότητάς του στους 50°C (η εναπομείνουσα ενεργότητα ήταν 6%). Ίδια σταθερότητα, με αυτή στο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσίασε όταν επώαστηκε σε NaDES 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% στους 40 °C. Τέλος μικρή αύξηση, 10%, της ενεργότητάς του ενζύμου σημειώθηκε σε NaDES 1:2 με 20% νερό στους 50°C συγκριτικά με αυτή στους 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα.



Διάγραμμα 4. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicCTec3 HS σε (A) Bet:Gly 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C, (B) Bet:Gly 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C, (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C.

Στο Διάγραμμα 4 (B) παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS. Μεγάλη σταθερότητα εμφάνισε το ενζυμικό σκεύασμα στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη 20% νερό στους 40 °C. Το ένζυμο διατήρησε σχεδόν το σύνολο της ενεργότητάς του (92%) μέχρι τις 4 ώρες επώασης ενώ στις 24 ώρες έχασε μόλις το 35%. Στους 50°C παρουσία NaDES (Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20%) το ενζυμικό σύστημα ήταν πιο σταθερό συγκριτικά με τη

σταθερότητα που παρουσίασε στο ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς διατήρησε το 55% της ενεργότητάς του για 4 ώρες επώασης ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα η αντίστοιχη ενεργότητα ήταν 18%. Τέλος στις 24 ώρες διατήρησε το 23% και 6% της ενεργότητάς του σε NaDES και σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίστοιχα (Διάγραμμα 4B). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της εναπομένουσας ενεργότητας το ενζυμικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα είναι πιο σταθερό στον βαθέως ευτηκτικό διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) στους 40°C.

Η απενεργοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να περιγραφεί με κινητική πρώτης τάξης. Η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται γραμμικά συναρτήσει του χρόνου όπως περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-k_d \cdot t} \Rightarrow \ln \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = -k_d \cdot t \quad (9)$$

Όπου:

A_t : η ενεργότητα του ενζύμου στο χρόνο t

A_0 : η αρχική ενεργότητα του ενζύμου

T : ο χρόνος επώασης σε ώρες

k_d : η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου (h^{-1})

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος ($E_{a(d)} \left(\frac{kJ}{mol} \right)$) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius (Εξίσωση 10).

$$k_d = k_0 e^{\left(-\frac{E_{a(d)}}{RT} \right)} \quad (10)$$

Όπου:

k_d : η σταθερά θερμικής απενεργοποίησης του ενζυμικού εκχυλίσματος (h^{-1})

k_0 : η σταθερά του παράγοντα συχνότητας ή παράγοντας Arrhenius

$E_{a(d)}$: η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ($\frac{kJ}{mol}$)

R : η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8,314 \frac{J}{mol \cdot K}$)

T : η απόλυτη θερμοκρασία (K)

Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D (Decimal reduction time, D-value) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται σε δεδομένη θερμοκρασία προκειμένου να μειωθεί κατά 90% η αρχική ενεργότητα του ενζύμου και υπολογίζεται από την εξίσωση 11 (Olusesan et al., 2011).

$$D = \frac{2.303}{k_d} \quad (11)$$

Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) ενός ενζύμου, σε δεδομένη θερμοκρασία, είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της ενεργότητάς του στο ήμισυ της αρχικής και υπολογίζεται από την εξίσωση 12 (Olusesan et al., 2011).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (12)$$

Από τις εξισώσεις 9, 10, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του κυτταρινολυτικού σκευάσματος *CellicTec3 HS* στους 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 20%

| | | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) | $(E_{a(d)})$ ($\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$) |
|---|------|---------------------------|------------------------|-------------|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 40°C | 0.08 | 9.05 | 30.07 | 116.96 |
| | 50°C | 0.31 | 2.25 | 7.48 | |
| Bet:Gly 1:2 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.03 | 22.00 | 73.11 | 165.97 |
| | 50°C | 0.23 | 3.05 | 10.15 | |
| Bet:Gly 1:3 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.02 | 41.75 | 138.73 | 205.16 |
| | 50°C | 0.19 | 3.64 | 12.08 | |

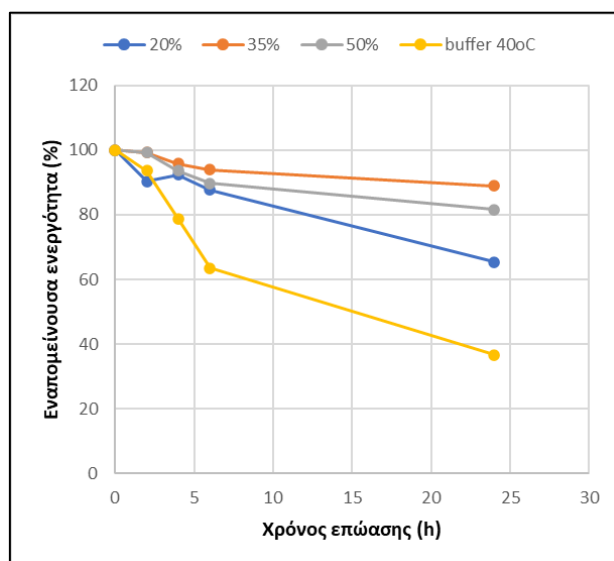
Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 50°C οδηγεί σε αύξηση των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης k_d (Πίνακας 6), γεγονός που υποδεικνύει ταχύτερη απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο χρόνος ημίσειας ζωής και στις τρεις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος στους 40°C απ' ότι στους 50°C . Συγκρίνοντας τους χρόνους ημιζωής για κάθε θερμοκρασία, στους 40°C παρατηρείται ότι ο μικρότερος αντιστοιχεί στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 (9.05 ώρες) ενώ διπλασιάζεται (22 ώρες) και πενταπλασιάζεται (41.75 ώρες) όταν το ενζυμικό σκεύασμα επάγεται σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% H₂O και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% H₂O αντίστοιχα. Ο χρόνος ημιζωής είναι σχεδόν δεκαπλάσιος στους 40°C από ότι στους 50°C γεγονός που υποδηλώνει ότι το ενζυμικό σκεύασμα είναι πιο σταθερό στους 40°C . Στους 50°C , στο ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 εμφανίζει τον μικρότερο χρόνο ημιζωής (2.25 ώρες) ενώ αύξηση καταγράφεται κατά την επώασή του στους NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% H₂O με χρόνο ημιζωής 10.15 ώρες και σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% H₂O με 12.08 ώρες όπου είναι και τα καλύτερα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα, καταδεικνύουν τον NaDES, Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) H₂O, σε θερμοκρασία 40°C ως το καλύτερο περιβάλλον για το ένζυμο. Τα αποτελέσματα της θερμικής απενεργοποίησης ($E_{a(d)}$) επιβεβαιώνουν τα παραπάνω, καθώς καταγράφηκε υψηλότερη τιμή θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) H₂O και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) H₂O υπολογίστηκε ίση με 165.97 και 205.16 kJ/mol αντίστοιχα. Η $E_{a(d)}$ του ενζύμου σε Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) H₂O ήταν σχεδόν διπλάσια από αυτή

στο ρυθμιστικό διάλυμα και ερμηνεύεται ως μεγαλύτερη απαίτηση σε ενέργεια για την απενεργοποίηση του ενζύμου (μετουσίωση πρωτεΐνης), επομένως όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή αυτή τόσο πιο σταθερό είναι το ένζυμο στο διαλύτη.

Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι NaDES δρουν σταθεροποιητικά για το ένζυμο και το προστατεύουν από τη θερμική απενεργοποίηση. Ειδικότερα το ενζυμικό σκεύασμα σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) H₂O στους 40°C εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα σταθερότητας, για αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό.

Ενζυμική σταθερότητα του CellicCTec3 HS σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστά 35 και 50%

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος Cellic CTec3 HS σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό (35 και 50% (v/v)) στους 40°C. Το ενζυμικό σκεύασμα παρέμεινε σχεδόν σταθερό για 4 ώρες επώασης στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3, καθώς καταγράφηκε μικρή μείωση της ενεργότητας που κυμάνθηκε μεταξύ 4-7% για τα διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Μεγαλύτερη σταθερότητα, μέχρι τις 24 ώρες εμφάνισε το ένζυμο όταν επώαστηκε σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 35% νερό συν-διαλύτη. Η μετρούμενη εναπομείνουσα ενεργότητα ήταν 65, 88 και 81% για 24 ώρες σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35, 50% αντίστοιχα (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicCTec3 HS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v) (●) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (●).

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του κυτταρινολυτικού σκευάσματος CellicCTec3 HS στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35% και 50% (v/v).

| | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) |
|--|--------------------|--------------------|---------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 0.08 | 9.05 | 30.07 |
| Bet:Gly 1:3 + 35% (v/v) H ₂ O | 0.005 | 150.68 | 500.65 |
| Bet:Gly 1:3 + 50% (v/v) H ₂ O | 0.008 | 85.57 | 284.32 |

Η μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης, k_d , (Πίνακας 7) του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του καταγράφηκε όταν επώαστηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ μικρότερες σταθερές κατά μία τάξη μεγέθους υπολογίστηκαν όταν το ένζυμο επώαστηκε σε NaDES με συν-διαλύτη 35% και 50% (v/v). Από τον Πίνακα 7, προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS είναι μεγαλύτερος για το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 35% (v/v) H₂O, για την ακρίβεια είναι σχεδόν 17 φορές μεγαλύτερος (150.68 ώρες) από το χρόνο ημιζωής του ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα (9.05 ώρες) και σχεδόν δεκαπλάσιος σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 50% (v/v) H₂O.

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση συν-διαλύτη 35% και 50% δεν υπολογίζεται η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης καθώς η μελέτη έγινε για μια θερμοκρασία, 40°C.

Συμπερασματικά, το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS είναι πιο σταθερό στους 40°C από ότι στους 50°C. Ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 ενισχύει περισσότερο τη σταθερότητα του σκευάσματος και στις 2 θερμοκρασίες, ακολουθεί ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 και τέλος το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5.

3.1.2. Ενζυμική σταθερότητα του πηκτινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color σε NaDES

Ενζυμική σταθερότητα του Pectinex® Ultra Color σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20%

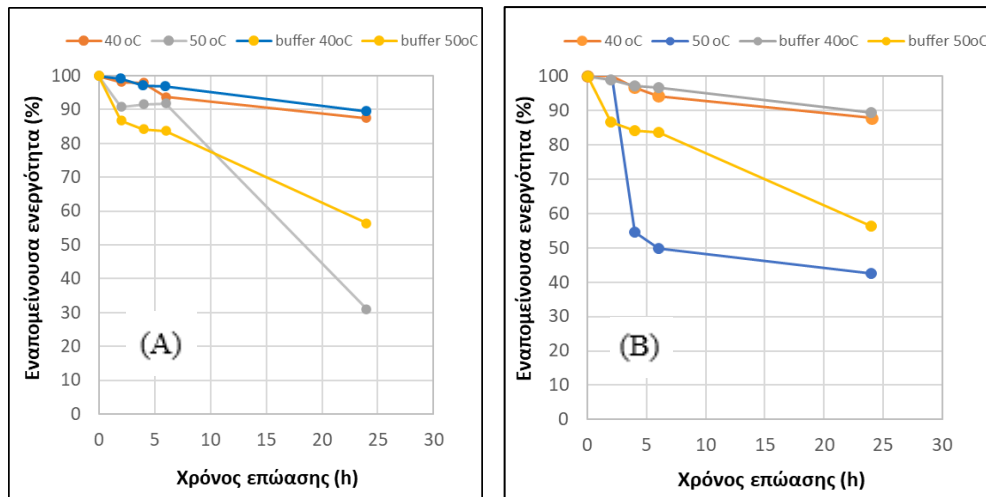
Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή της ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color κατά την επώασή του για 24 ώρες σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 20% (v/v) συν-διαλύτη (H₂O),

Bet:Gly 1:2 με προσθήκη 20% (v/v) συν-διαλύτη H₂O και ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5.

Στο Διάγραμμα 6A παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color. Αρχικά παρατηρείται ότι η σταθερότητα του σκευάσματος είναι καλύτερη στους 40 °C από ότι στους 50 °C. Συγκρίνοντας τα ρυθμιστικά διαλύματα σε αυτές τις δύο θερμοκρασίες, η ενεργότητα στις 24 ώρες έχει παραμείνει στο 90% για τους 40 °C και στο 56% της αρχικής για τους 50 °C. Αντίστοιχα στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) η ενεργότητα στις 24 ώρες διατηρήθηκε στο 87% για τους 40 °C και στο 31% της αρχικής για τους 50 °C.

Στους 40 °C το ενζυμικό σκεύασμα πηκτινολυτικών ενζύμων παρουσιάζει παρόμοια σταθερότητα στο ρυθμιστικό διάλυμα και στο NaDES (87 και 90% αντίστοιχα για τις 24 ώρες). Στους 50 °C μέχρι τις 6 ώρες ο NaDES ενισχύει τη σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος καθώς η ενεργότητα του έχει διατηρείται στο 92% της αρχικής ενώ με το ρυθμιστικό σημειώνεται μικρή μείωση της ενεργότητας. Η μετρούμενη εναπομένουσα ενεργότητα βρέθηκε στο 84% της αρχικής.

Στο Διάγραμμα 6B παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color. Μεγάλη σταθερότητα εμφάνισε το ενζυμικό σκεύασμα στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη 20% (v/v) νερό στους 40 °C. Το ένζυμο διατήρησε σχεδόν το σύνολο της ενεργότητάς του (94%) μέχρι τις 6 ώρες επώασης ενώ στις 24 ώρες έχασε μόλις το 12%. Στους 50°C παρουσία NaDES (Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) το ενζυμικό σύστημα ήταν λιγότερο σταθερό συγκριτικά με τη σταθερότητα που παρουσίασε στο ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα το σκεύασμα διατήρησε το 50% της ενεργότητάς του για 6 ώρες επώασης ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα η αντίστοιχη ενεργότητα ήταν 84%. Τέλος στις 24 ώρες διατήρησε το 43% και 56% της ενεργότητάς του σε NaDES και σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίστοιχα (Διάγραμμα 6B). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της εναπομείνουσας ενεργότητας το ενζυμικό κυτταρινολυτικό σκεύασμα είναι πιο σταθερό στον βαθύως ευτηκτικό διαλύτη Βεταΐνη: Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v).



Διάγραμμα 6. Ενζυμική σταθερότητα του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 (●) 40°C και (●) 50°C.

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$), χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και σταθερές θερμικής απενεργοποίησης του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color για 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20% v/v.

| | | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) | $(E_{a(d)}) \left(\frac{kJ}{mol}\right)$ |
|--|------|--------------------|--------------------|--------|--|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 40°C | 0.0045 | 154.02 | 511.78 | 132.24 |
| | 50°C | 0.0217 | 31.94 | 106.13 | |
| Bet:Gly 1:2 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.0054 | 128.35 | 426.48 | 187.74 |
| | 50°C | 0.0504 | 13.75 | 45.69 | |
| Bet:Gly 1:3 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.0054 | 128.35 | 426.48 | 151.12 |
| | 50°C | 0.0326 | 21.26 | 70.64 | |

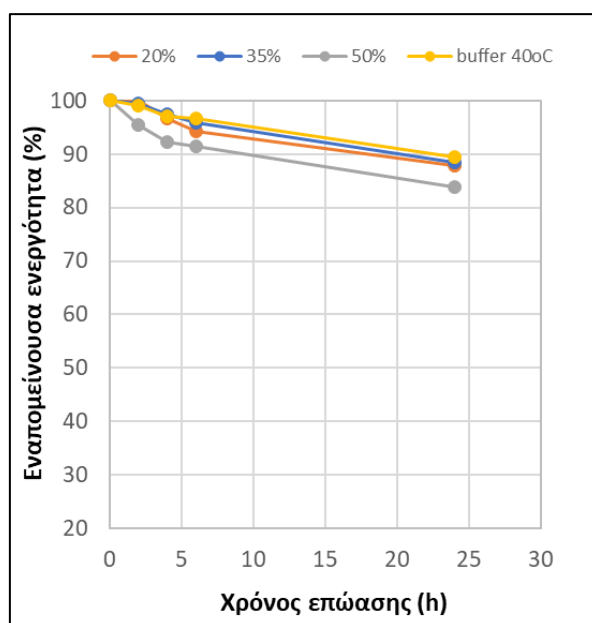
Για το Pectinex® Ultra Color από τον Πίνακα 8 προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής και στις τρεις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος στους 40°C από ότι στους 50°C. Συγκεκριμένα, στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) H₂O ο χρόνος ημιζωής είναι σχεδόν δεκαπλάσιος στους 40°C (128.35 ώρες) από ότι στους 50°C (13.75 ώρες) και στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) H₂O, 6 φορές μεγαλύτερος (128.35 ώρες στους 40°C και 21.26 ώρες στους 50°C). Αυτό συνεπάγεται ότι το ενζυμικό παρασκεύασμα είναι πιο σταθερό στους 40°C. Τα αποτελέσματα της

θερμικής απενεργοποίησης ($E_{a(d)}$) επιβεβαιώνουν τα παραπάνω, καθώς καταγράφηκε υψηλότερη τιμή θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES 1:2 και 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v).

Ενζυμική σταθερότητα του Pectinex® Ultra Color σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35 και 50% (v/v)

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με διαφορετικά ποσοστά νερού ως συν-διαλύτη (35% και 50%, v/v) στους 40°C.

Το ενζυμικό σκεύασμα παρέμεινε σχεδόν σταθερό για 4 ώρες επώασης στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3, καθώς καταγράφηκε μικρή μείωση της ενεργότητας που κυμάνθηκε μεταξύ 2-7% για τα διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Μεγαλύτερη σταθερότητα, μέχρι τις 24 ώρες, εμφάνισε το ένζυμο όταν επώαστηκε σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 35% (v/v) νερό ως συν-διαλύτη, αλλά και για ποσοστό 20% (v/v). Η μετρούμενη εναπομείνουσα ενεργότητα ήταν 88, 88 και 84% για 24 ώρες σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35, 50% (v/v) αντίστοιχα, ενώ για το ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 ήταν 90% (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7. Ενζυμική σταθερότητα του ηηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex Ultra Color σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v) και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωή και, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του πηκτινολυτικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 35 και 50%.

| | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) |
|--|--------------------|--------------------|---------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 0.0045 | 154.03 | 511.78 |
| Bet:Gly 1:3 + 35% (v/v) H ₂ O | 0.0052 | 133.30 | 442.88 |
| Bet:Gly 1:3 + 50% (v/v) H ₂ O | 0.0063 | 110.02 | 365.56 |

Η μεγαλύτερη σταθερά θερμικής απενεργοποίησης (Πίνακας 9) του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του, καταγράφηκε όταν το ένζυμο επώαστηκε σε NaDES με συν-διαλύτη 50% (v/v) νερό. Από τον Πίνακα 9, προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος Pectinex® Ultra Color είναι μεγαλύτερος για το ρυθμιστικό διάλυμα (154.03 ώρες) και ακολουθεί ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 35% H₂O (133.30 ώρες), ενώ δεν απέχει πολύ και ο χρόνος ημιζωής που παρουσιάζει σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό(128.35 ώρες).

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση συν-διαλύτη 35% και 50% δεν υπολογίζεται η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης, καθώς η μελέτη έγινε για μια θερμοκρασία, 40°C.

Συμπερασματικά, το πηκτινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Pectinex® Ultra Color είναι πιο σταθερό στους 40°C από ότι στους 50°C. Ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 ενισχύει τη σταθερότητα του σκευάσματος στους 50°C σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα.. Στους 40°C το ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 καθώς και οι δύο NaDES είναι εξίσου αποτελεσματικοί στη διατήρηση της σταθερότητας του ενζυμικού σκευάσματος.

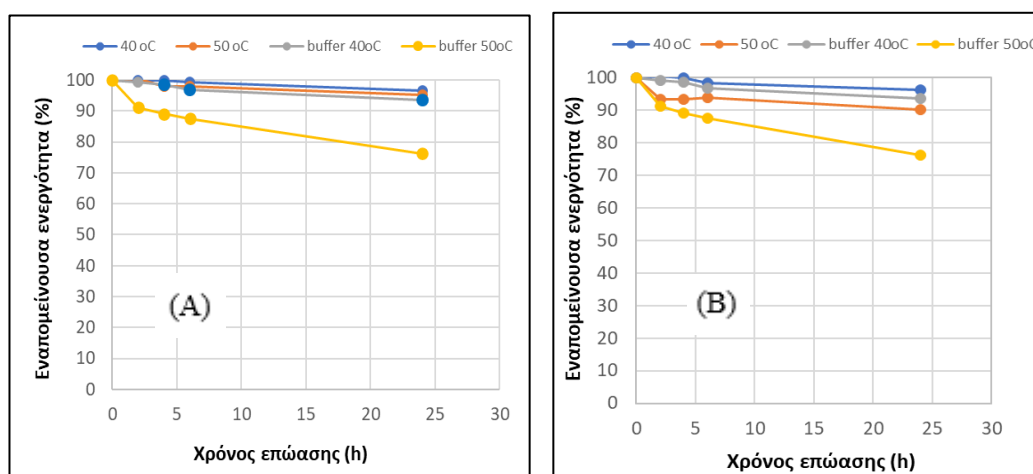
3.1.3. Ενζυμική σταθερότητα του Neutrase® σε NaDES

Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Neutrase® σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20% (v/v)

Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 (A) και 1:3 (B) με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase®. Το ενζυμικό σκεύασμα πρωτεολυτικών ενζύμων παρουσιάζει παρόμοια σταθερότητα στο ρυθμιστικό διάλυμα και στους NaDES με την διαφορετική αναλογία στους 40°C. Παραμένει

σταθερό μέχρι τις 6 ώρες (περίπου 98%) και χάνει 3-6 % της αρχικής του ενεργότητας μέχρι τις 24 ώρες. Στους 50°C εμφανίζει μειωμένη σταθερότητα αλλά είναι καλύτερη στους NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (Διάγραμμα 8A), καθώς διατηρεί το 98% και το 94% της ενεργότητάς του μέχρι τις 6 ώρες, ενώ για το ρυθμιστικό διάλυμα στις 24 ώρες η ενεργότητα μειώνεται στο 76% της αρχικής.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της εναπομείνουσας ενεργότητας το ενζυμικό πρωτεολυτικό σκεύασμα Neutrase® είναι πιο σταθερό στους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% στους 40°C.



Διάγραμμα 8. Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase® σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) στους (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) στους (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C.

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 10.

Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (Πίνακας 10), γεγονός που υποδεικνύει ταχύτερη απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο χρόνος ημίσειας ζωής και στις τρεις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος στους 40°C απ' ό τι στους 50°C. Συγκρίνοντας τους χρόνους ημιζωής για κάθε θερμοκρασία, στους 40°C παρατηρείται ότι ο μικρότερος αντιστοιχεί στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 (256.70 ώρες), ακολουθεί ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό (407.71 ώρες) και ο μεγαλύτερος χρόνος αντιστοιχεί όταν το ενζυμικό σκεύασμα επώάζεται σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) νερό (462.07 ώρες). Ο χρόνος ημιζωής στο ρυθμιστικό είναι σχεδόν τετραπλάσιος στους 40°C από ότι στους 50°C γεγονός που υποδηλώνει ότι το ενζυμικό σκεύασμα είναι πιο σταθερό στους 40°C. Στους 50°C η επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφανίζει το μικρότερο χρόνο ημιζωής (70.72 ώρες), εν συνεχεία ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό με χρόνο ημιζωής 182.39

ώρες και τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) νερό με 346.55 ώρες. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τον NaDES, Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) νερό, σε θερμοκρασία 40°C ως το καλύτερο περιβάλλον για το ένζυμο.

Πίνακας 10. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase® στους 40°C και 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20% (v/v).

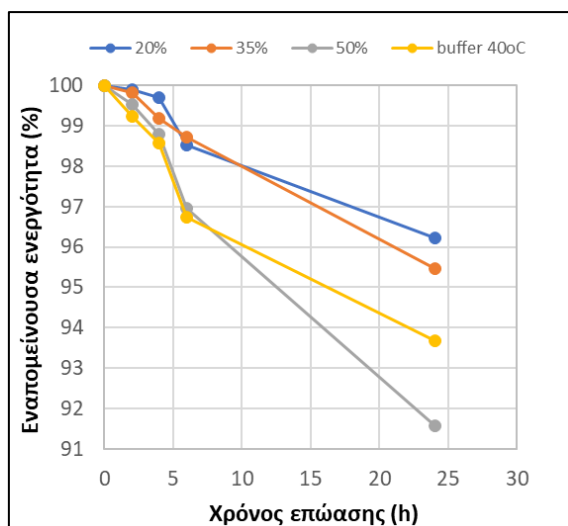
| | | $k_d (h^{-1})$ | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) | $(E_{a(d)}) (\frac{kJ}{mol})$ |
|--|------|----------------|--------------------|---------|-------------------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 40°C | 0.0027 | 256.70 | 852.96 | 108.36 |
| | 50°C | 0.0098 | 70.72 | 235.00 | |
| Bet:Gly 1:2 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.0015 | 462.07 | 1525.33 | 24.18 |
| | 50°C | 0.0020 | 346.55 | 1151.50 | |
| Bet:Gly 1:3 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.0017 | 407.71 | 1354.71 | 67.61 |
| | 50°C | 0.0038 | 182.39 | 606.05 | |

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) νερό και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό υπολογίστηκε ίση με 24.18 και 67.61 kJ/mol αντίστοιχα.

Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι NaDES δρουν σταθεροποιητικά για το ένζυμο και το προστατεύουν από τη θερμική απενεργοποίηση.

Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Neutrase® σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35 και 50%

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος Neutrase® σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό (35 και 50%) στους 40°C. Το ενζυμικό σκεύασμα παρέμεινε σταθερό για 4 ώρες επώασης στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3, καθώς καταγράφηκε μικρή μείωση της ενεργότητας που κυμάνθηκε μεταξύ 1-2% για τα διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Μεγαλύτερη σταθερότητα, μέχρι τις 24ώρες εμφάνισε το ένζυμο όταν επώαστηκε σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 20% νερό συν-διαλύτη. Η μετρούμενη εναπομένουσα ενεργότητα ήταν 96, 95 και 92% για 24 ώρες σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35, 50% αντίστοιχα (Διάγραμμα 9). Παρατηρείται ότι πρόκειται για ένα ιδιαίτερα σταθερό ενζυμικό σκεύασμα στους 40°C και σε διαλύτη NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3.



Διάγραμμα 9. Ενζυμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού σκευάσματος Neutrase σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40 °C. Σύμβολα: (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v), και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του πηκτινολυτικού σκευάσματος Neutrase® στους 40°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 35% και 50% (v/v).

| | k_d (h ⁻¹) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) |
|--|--------------------------|--------------------|---------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 0.0027 | 256.72 | 825.96 |
| Bet:Gly 1:3 + 35% (v/v) H ₂ O | 0.0020 | 346.57 | 1151.50 |
| Bet:Gly 1:3 + 50% (v/v) H ₂ O | 0.0037 | 187.34 | 622.43 |

Η μεγαλύτερη σταθερά θερμικής απενεργοποίησης (Πίνακας 11) του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του καταγράφηκε όταν επωάστηκε στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 50% (v/v), ενώ μικρότερη σταθερά υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 35% (v/v). Από τον Πίνακα 11, προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος Neutrase® είναι μεγαλύτερος για το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 35% (v/v) νερό, για την

ακρίβεια είναι σχεδόν διπλάσιος (346.57 ώρες) από το χρόνο ημιζωής του ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα (187.34 ώρες). Συνεπώς το ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® είναι περισσότερο σταθερό για NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό και θερμοκρασία 40°C.

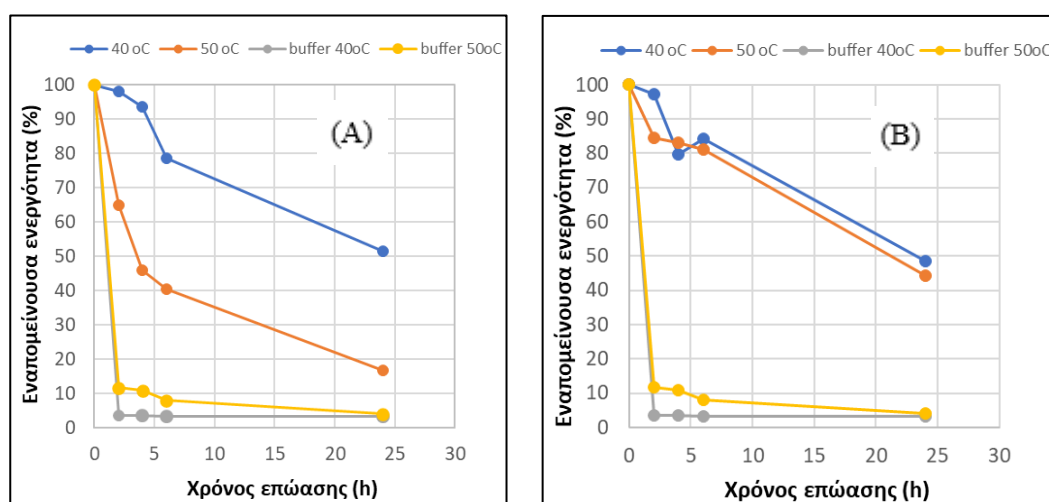
Σημειώνεται ότι στην περίπτωση συν-διαλύτη 35% και 50% (v/v) νερό δεν υπολογίζεται η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης, καθώς η μελέτη έγινε για μια θερμοκρασία, 40°C.

Συμπερασματικά, το πρωτεολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® είναι πιο σταθερό στους 40°C από ότι στους 50°C. Ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 ενισχύει τη σταθερότητα του σκευάσματος στους 50°C. Στους 40°C οι δύο NaDES είναι εξίσου αποτελεσματικοί στη διατήρηση της σταθερότητας του ενζυμικού σκευάσματος.

3.1.4. Ενζυμική σταθερότητα του ημικυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm® σε NaDES

Ενζυμική σταθερότητα του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm® σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20%

Στο Διάγραμμα 10 (A) παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% σε δύο θερμοκρασίες 40° και 50°C για 24 ώρες στην σταθερότητα του ενζυμικού ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm®.



Διάγραμμα 10. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm σε (A) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C. (B) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε (●) 40°C και (●) 50°C, και ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 σε (●) 40°C και (●) 50°C.

Το σκεύασμα έχασε σχεδόν το σύνολο της ενεργότητάς του στο ρυθμιστικό διάλυμα στους 40°C και στους 50°C (η εναπομείνουσα ενεργότητα ήταν 3% στις 24 ώρες) αλλά παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα με τη χρήση NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20%. Μάλιστα, στους 40 °C με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη

1:2 με νερό 20% τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά με την ενεργότητα να διατηρείται σε ποσοστό 79% στις 6 ώρες και 51% στις 24. Αντίστοιχα για τον ίδιο διαλύτη, τα ποσοστά αυτά ήταν 40% στις 6 ώρες και 17% στις 24 στους 50°C.

Στο Διάγραμμα 10 (B) παρουσιάζεται η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v) σε δύο θερμοκρασίες, 40° και 50°C, για 24 ώρες στην σταθερότητα του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm®. Καλύτερη σταθερότητα εμφάνισε το ενζυμικό σκεύασμα στον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με συν-διαλύτη 20% (v/v) νερό συγκριτικά με το ρυθμιστικό, και στις 2 θερμοκρασίες. Στις 6 ώρες η ενεργότητα στους 40° και 50°C ήταν αντίστοιχα 84% και 81%, ενώ στις 24 ώρες τα ποσοστά αυτά αντιστοιχούν σε 49% και 44%. Στη περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος τα ποσοστά στις 6 ώρες ήταν 3% και 8% της αρχικής ενεργότητας.

Από τις εξισώσεις 10, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής, χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D και ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm στους 40°C και 50 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v).

| | | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) | $(E_{a(d)})$ ($\frac{kJ}{mol}$) |
|--|------|--------------------|--------------------|-------|-----------------------------------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.5 | 40°C | 1.077 | 0.64 | 2.14 | 37.36 |
| | 50°C | 1.680 | 0.41 | 1.37 | |
| Bet:Gly 1:2 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.028 | 24.49 | 81.38 | 69.63 |
| | 50°C | 0.065 | 10.70 | 35.54 | |
| Bet:Gly 1:3 + 20% (v/v) H ₂ O | 40°C | 0.030 | 23.42 | 77.80 | 87.87 |
| | 50°C | 0.084 | 8.23 | 27.35 | |

Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 50°C οδηγεί σε αύξηση των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης (Πίνακας 12). Οι εν λόγω σταθερές στο ρυθμιστικό διάλυμα και τις δύο θερμοκρασίες είναι πολύ υψηλές υποδεικνύοντας ταχύτερη απενεργοποίηση του ενζύμου συγκριτικά με τους NaDES. Ο χρόνος ημίσειας ζωής και στις τρεις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος στους 40°C απ' ότι στους 50°C. Συγκρίνοντάς τους για κάθε θερμοκρασία, στους 40°C παρατηρείται ότι ο μικρότερος αντιστοιχεί στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.5 (0.64 ώρες ή 39 λεπτά) ενώ για τις 2 αναλογίες NaDES οι χρόνοι ημιζωής έχουν κοντινές, υψηλές τιμές. Ο χρόνος ημιζωής είναι κατά πολύ μεγαλύτερος στους 40°C από ότι στους 50°C γεγονός που υποδηλώνει ότι το ενζυμικό σκεύασμα είναι πιο σταθερό στους 40°C.

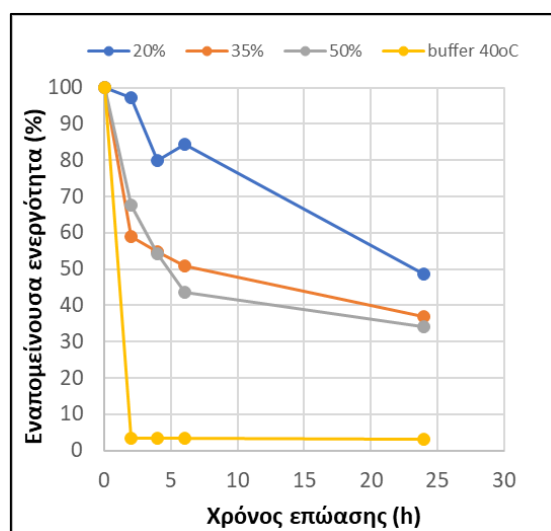
Ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό σε θερμοκρασία 40°C φαίνεται ως το καλύτερο περιβάλλον για το ένζυμο. Τα αποτελέσματα της θερμικής

απενεργοποίησης επιβεβαιώνουν τα παραπάνω, καθώς καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές σε NaDES. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 + 20% (v/v) νερό και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + (v/v) νερό υπολογίστηκε ίση με 69.63 και 87.87 kJ/mol αντίστοιχα έναντι 37.36 kJ/mol που υπολογίστηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η $E_{a(d)}$ του ενζύμου σε Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό ήταν διπλάσια από αυτή στο ρυθμιστικό και ερμηνεύεται ως μεγαλύτερη απαίτηση σε ενέργεια για την απενεργοποίηση του ενζύμου, δηλαδή μεγαλύτερη σταθερότητα του ενζύμου στον διαλύτη.

Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι NaDES δρουν σταθεροποιητικά για το ένζυμο και το προστατεύουν από τη θερμική απενεργοποίηση. Ειδικότερα το ενζυμικό σκεύασμα σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 20% (v/v) νερό στους 40°C εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα σταθερότητας, για αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό.

Ενζυμική σταθερότητα του Viscoferm® σε NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστά 35 και 50%

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm® σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό (35 και 50%, v/v, νερό) στους 40°C. Μεγαλύτερη σταθερότητα, μέχρι τις 24 ώρες εμφάνισε το ένζυμο όταν επώαστηκε σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 20% νερό συν-διαλύτη. Η μετρούμενη εναπομένουσα ενεργότητα ήταν 84, 51 και 44% για 24 ώρες σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 20, 35, 50% αντίστοιχα (Διάγραμμα 11).



Διάγραμμα 11. Ενζυμική σταθερότητα του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 και NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη. Η επώαση έγινε για 24 ώρες στους 40°C. Σύμβολα: (●) Bet:Gly 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 35% (v/v), (●) Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% (v/v), και (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών °C.

Από τις εξισώσεις 9, 11 και 12 προκύπτουν τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζύμου, χρόνοι ημίσειας ζωής και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού D του ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος Viscoferm στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και NaDES με συν-διαλύτη νερό σε ποσοστό 35 και 50% (v/v).

| | k_d (h^{-1}) | Χρόνος ημιζωής (h) | D (h) |
|--|---------------------------|--------------------|---------|
| Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{pH}=7.5$ | 1.077 | 0.64 | 2.138 |
| Bet:Gly 1:3 + 35% (v/v) H_2O | 0.030 | 22.88 | 76.01 |
| Bet:Gly 1:3 + 50% (v/v) H_2O | 0.035 | 19.80 | 65.80 |

Η μεγαλύτερη σταθερά θερμικής απενεργοποίησης (Πίνακας 13) του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του καταγράφηκε όταν επώαστηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ μικρότερες σταθερές κατά μία τάξη μεγέθους υπολογίστηκαν όταν το ένζυμο επώαστηκε σε NaDES με συν-διαλύτη 20, 35 και 50% (v/v) νερό. Από τον Πίνακα 13, προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος Viscoferm® είναι μεγαλύτερος για το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 + 35% (v/v) νερό. Από τον Πίνακα 12 ο χρόνος ημιζωής για ποσοστό 20% (v/v) συν-διαλύτη είναι ίσος με 23.42 ώρες, συνολικά ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής.

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση συν-διαλύτη 35% και 50% (v/v) δεν υπολογίζεται η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης καθώς η μελέτη έγινε για μια θερμοκρασία, 40°C .

Συμπερασματικά, το ημικυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® είναι πιο σταθερό στους 40°C από ότι στους 50°C . Αναφορικά με η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε NaDES καταγράφηκε παρόμοια σταθερότητα και στους δύο NADES, σύμφωνα με τις μετρούμενες σταθερές, παρόλα αυτά ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 ενισχύει περισσότερο τη σταθερότητα του σκευάσματος στους 50°C , συγκριτικά με τον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2

Οι NaDES ενισχύουν την ενζυμική ενεργότητα και σταθερότητα. Αυτή τους η ιδιότητα οφείλεται στο ισχυρό δίκτυο που δημιουργείται στο μείγμα λόγω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει ο NaDES με την επιφάνεια του ενζύμου σταθεροποιώντας το. Έχουν μελετηθεί πολλά ένζυμα σε συστήματα NaDES και έχουν επιδείξει υψηλότερη ενεργότητα και σταθερότητα, συμπεριλαμβανομένων υδρολασών, πρωτεασών, εστερασών και λιπασών (Durand et al., 2016). Παρακάτω

παρατίθενται βιβλιογραφικές αναφορές αναφορικά με τη σταθερότητα των ενζύμων σε NaDES.

Οι NaDES χρησιμοποιούνται στις ενζυμικές αντιδράσεις είτε ως συν-διαλύτες είτε ως μέσο αντίδρασης. Ενισχύουν την ενζυμική ενεργότητα των λακκασών, βελτιώνουν τη σταθερότητα των λιπασών και αυξάνουν την απόδοση των οξειδοαναγωγάσων (Gajardo-Parra et al., 2022)

Οι λακκάσες οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος ανόργανων και αρωματικών ενώσεων και ιδιαίτερα φαινολικές ενώσεις. Είναι όμως αδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα και έτσι η ενεργότητα τους υπολογίζεται σε οργανικούς διαλύτες. Καθώς όμως οι διαλύτες αυτοί εμφανίζουν τοξικότητα, άρχισαν να γίνονται μελέτες για υπολογισμό της ενεργότητας των λακκασών σε NaDES. Επίσης, η ευρεία χρήση των λακκασών στη βιομηχανία περιορίζεται από την ενζυμική απενεργοποίηση με τη πάροδο του χρόνου, ιδιαίτερα όταν οι συνθήκες της διεργασίας δεν είναι οι βέλτιστες για το ένζυμο, δηλαδή θερμοκρασίες πάνω από 30°C-40°C και pH μεγαλύτερα του 6-7. Συνεπώς είναι επιθυμητή η εύρεση ενός διαλύτη με θερμοπροστατευτικές και σταθεροποιητικές ιδιότητες (Delorme et al., 2020). Η επώαση της λακκάσης σε NaDES οδήγησε σε δραστική αύξηση της ενεργότητάς της. Μάλιστα, η βεταΐνη εμφάνισε αποτελεσματικότερη δράση συγκριτικά με τη χλωριούχο χολίνη δρώντας θερμοπροστατευτικά για το ένζυμο (Khodaverdian et al., 2018).

Σε μελέτες που έγιναν για τη σταθερότητα της λακκάσης στους 80°C και στους 90°C, η παρουσία NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 ενίσχυσε τη σταθερότητα του ενζύμου συγκριτικά με τη σταθερότητα του σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η αυξημένη σταθερότητα οδηγεί σε βελτιωμένη ενεργότητα του ενζύμου. Η θερμική σταθερότητα είναι αποτέλεσμα των δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ των συστατικών που αποτελούν τον NaDES και του ενζύμου. Μάλιστα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου τα επιμέρους συστατικά του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως παρασκευή NaDES (δηλαδή μεμονωμένα ένζυμο σε Βεταΐνη και μεμονωμένα σε Γλυκερόλη). Διαπιστώθηκε ότι η σταθερότητα του ενζύμου ήταν υψηλότερη στη περίπτωση του NaDES (Khodaverdian et al., 2018).

Η Horseradish peroxidase (HRP), ένα οξειδωαναγωγικό ένζυμο, μελετήθηκε ως προς την ενεργότητά του στους 37°C σε διάφορους NaDES, συμπεριλαμβανομένου του Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 και σε όλες τις περιπτώσεις η σχετική ενεργότητα ήταν υψηλότερη από ότι στο ρυθμιστικό. NaDES με συστατικό τη βεταΐνη έχουν χρησιμοποιηθεί για σταθεροποίηση πρωτεϊνών και κρυοπροστασία.

Οι αλλαγές που συμβαίνουν στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, α-έλικες και β-φύλλα, παρουσία NaDES, υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες υφίστανται ανακατατάξεις σε αυτούς λόγω των δεσμών υδρογόνου. Αυτές οι δομικές μεταβολές, ιδιαίτερα η αύξηση στις α-έλικες, αυξάνουν την ενζυμική ενεργότητα, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα των NaDES για χρήση τους σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις (Gajardo-Parra et al., 2022).

Οι συνθήκες που επιλέγονται για χαρακτηρισμό της σταθερότητας όλων των ενζύμων είναι: η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 40°C, το ρυθμιστικό διάλυμα έχει

pH=7.5 και ο διαλύτης που επιλέγεται είναι Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 20%, 35%, 50% v/v συν-διαλύτη (νερό).

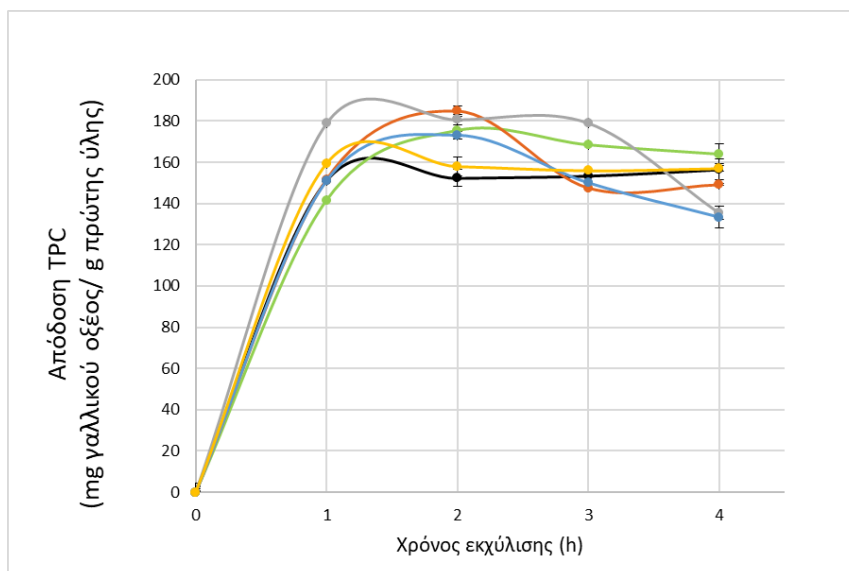
3.2. Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση σε NaDES

Μελετήθηκε η EYE (με τη χρήση πέντε εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων σε NaDES (Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3) με διαφορετικά ποσοστά νερού ως συν-διαλύτη, (20%, 35% και 50%, v/v). Οι συνθήκες που επιλέγονται για τη συνδυασμένη εκχύλιση είναι: στερεή πρώτη ύλη με 7.5% (w/v) κοκκομετρίας < 500 μm, ενζυμικό φορτίο 1% (v/v) σε θερμοκρασία εκχύλισης 40°C και ρυθμό ανάδευσης στις 1300 rpm. Παρακολουθείται η εξέλιξη της απόδοσης σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και αντιοξειδωτική δράση ως προς το χρόνο, μέχρι τις 4 ώρες.

3.2.1. Ολικό Περιεχόμενο σε Φαινολικές Ενώσεις (TPC)

Τα διαγράμματα που ακολουθούν αφορούν τη χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων ανάλογα με το ποσοστό νερού που έχει προστεθεί στο NaDES για τα διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα.

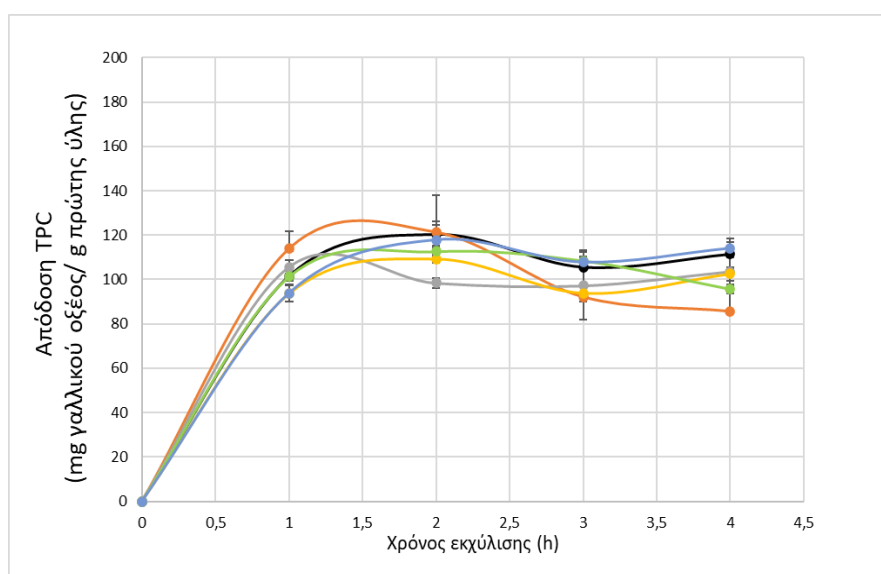
Στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τα πέντε ένζυμα και ποσοστό συν-διαλύτη νερό στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 στο 20% (v/v).



Διάγραμμα 12. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 20% (v/v), για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Viscoferm® και (●) Neutralse®.

Από το Διάγραμμα 11 παρατηρείται ότι στις 2 ώρες εκχύλισης εμφανίζεται μέγιστη απόδοση φαινολικών ενώσεων. Τα εκχυλίσματα μόνο με NaDES εμφανίζουν χαμηλότερες αποδόσεις από τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις σε NaDES. Υψηλότερες αποδόσεις καταγράφηκαν στην περίπτωση των εκχυλισμάτων που επεξεργάστηκαν με NaDES και τα ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec3 HS (180 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης) και Pectinex® (184 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης) για 2 ώρες εκχύλισης.

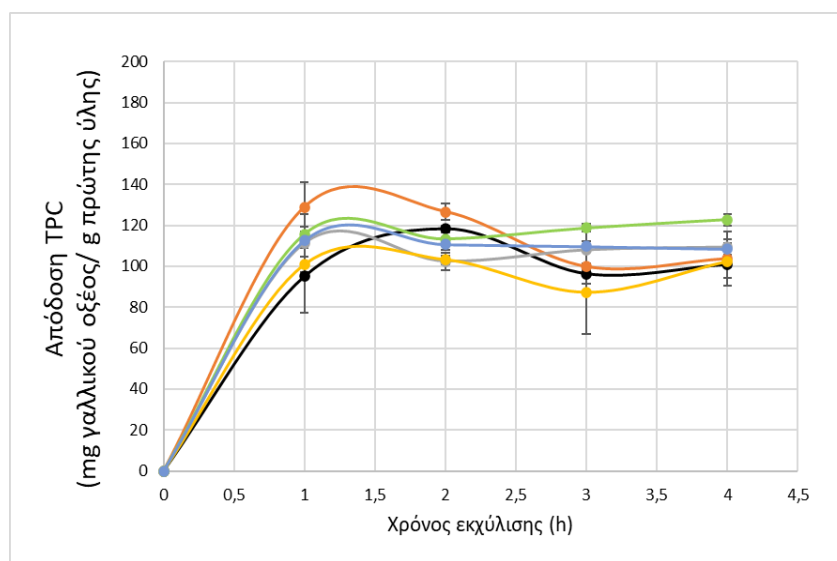
Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τα πέντε ένζυμα για ποσοστό νερού στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 στο 35% (v/v).



Διάγραμμα 13. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη 35%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) Cellic® CTec2 HS και (●) Viscoferm®.

Παρατηρούνται αυξημένες τιμές του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις στο διάστημα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ώρας εκχύλισης (Διάγραμμα12). Γενικά οι αποδόσεις εμφανίζουν φθίνουσα πορεία μετά τις δύο ώρες. Το εκχύλισμα με NaDES εμφανίζει αρκετά υψηλές τιμές απόδοσης. Η μέγιστη απόδοση ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) επιτυγχάνεται με χρήση του κυτταρινολυτικού ενζυμικού σκευάσματος Cellic® CTec3 HS σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 35% (v/v) νερού στις 2 ώρες εκχύλισης (122 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης).

Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TPC για τα πέντε ένζυμα για ποσοστό νερού στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 στο 50%:



Διάγραμμα 14. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Βετ:Γλυ 1:3 με συν-διαλύτη 50%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) CelliC® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) CelliC® CTec2 HS και (●) Viscoferm®.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 13) το εκχύλισμα με τη μέγιστη απόδοση φαινολικών ενώσεων στο διάστημα πρώτης και δεύτερης ώρας είναι το υποβοηθούμενο από το ενζυμικό σκεύασμα CelliC® CTec3 HS σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 50% (v/v) με απόδοση ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις ίση με 140 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης. Απαιτούμενος χρόνος για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με διαλύτη NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 είναι μεταξύ της 1^{ης} και 2^{ης} ώρας καθώς μετά το πέρας αυτών δεν αυξάνεται η απόδοση TPC.

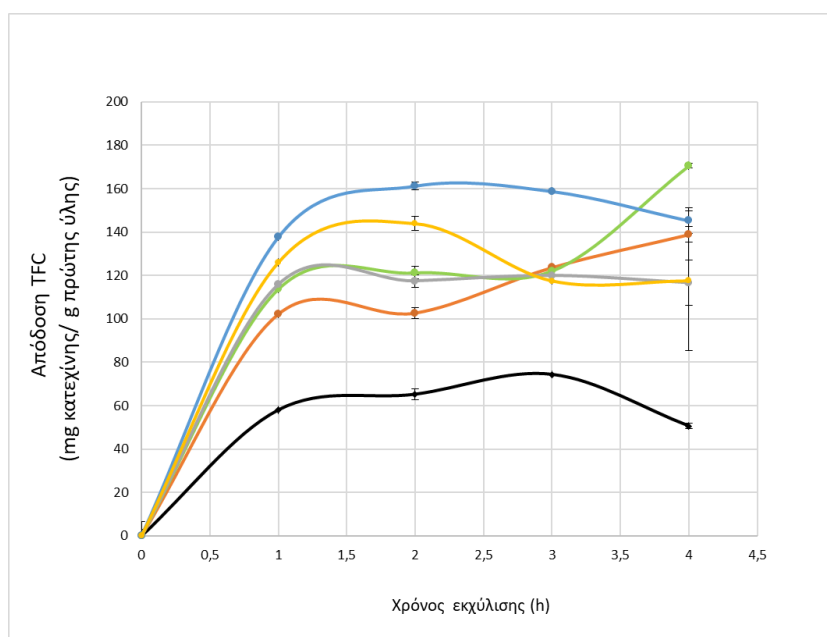
Συνολικά η πιο αποδοτική εκχύλιση είναι στις συνθήκες NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 20% (v/v) συν-διαλύτη συγκριτικά με 35 και 50% (v/v) όπου οι μέγιστες εκχυλισθέντες τιμές κυμαίνονται στο εύρος 150-190 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης έναντι των τιμών 80-130 και 80-140 mg γαλλικού/g πρώτης ύλης για ποσοστά συν-διαλύτη 35 και 50% (v/v) αντίστοιχα.

Απαιτούμενος χρόνος είναι οι 2 ώρες και περαιτέρω δεν εκχυλίζονται παραπάνω ενώσεις.

3.2.2. Ολικό Περιεχόμενο σε Φλαβονοειδή (TFC)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα που αφορούν τη χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων ανάλογα με το ποσοστό νερού που έχει προστεθεί στο NaDES.

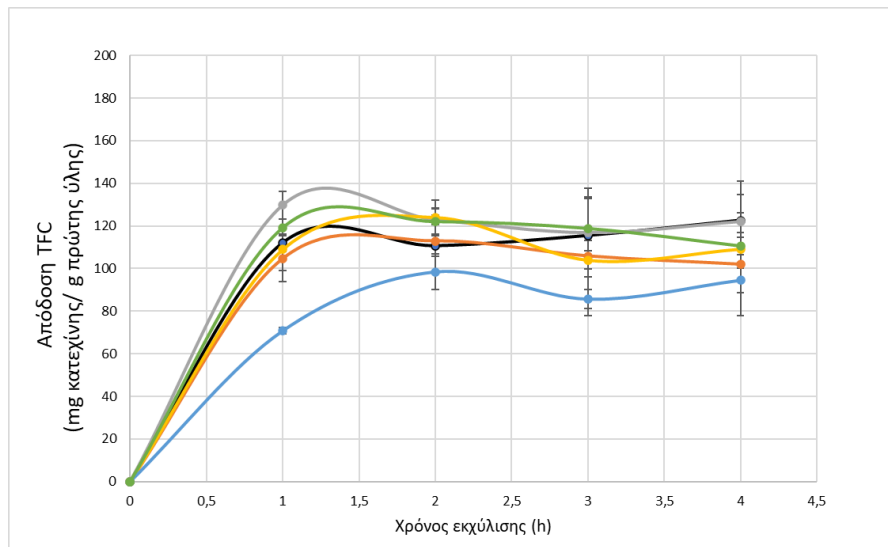
Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τα πέντε ένζυμα για ποσοστό νερού στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 στο 20% (v/v):



Διάγραμμα 15. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 20%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Cellic® CTec2 HS, (●) Pectinex®, (●) Viscoferm® και (●) Neutrase®.

Από το Διάγραμμα 14 είναι εμφανές ότι στο συγκεκριμένο ποσοστό νερού στο NaDES τα ένζυμα δρουν ενισχυτικά στην εκχύλιση όσον αφορά το ολικό περιεχομένου σε φλαβονοειδή, καθώς η απόδοση TFC είναι υψηλότερη για όλα τα ένζυμα από αυτή των εκχυλισμάτων απουσία ενζύμου (control). Βέλτιστη δράση εμφανίζει το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® με μέγιστη απόδοση ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) ίση με 160 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης τιμή διπλάσια από το εκχύλισμα απουσία ενζύμου όπου η μέγιστη τιμή πλησιάζει τα 80 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης. Προκύπτει ότι ο χρόνος για να εκχυλιστούν οι μέγιστες τιμές φλαβονοειδών ενώσεων είναι οι 2 ώρες καθώς τότε επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση σε TFC.

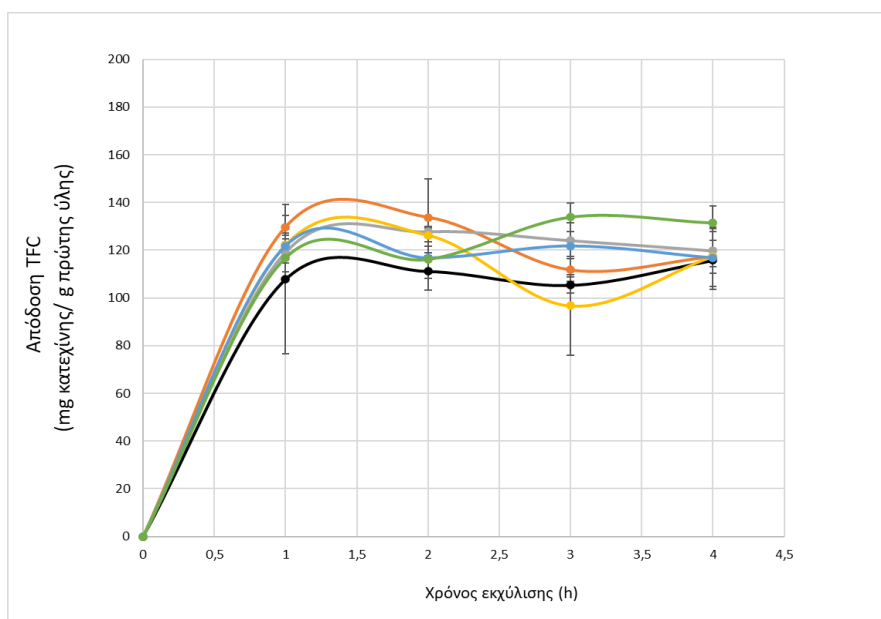
Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη της απόδοσης TFC για τα πέντε ένζυμα για ποσοστό νερού στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 στο 35% (v/v).



Διάγραμμα 16. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 35%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) Viscoferm® και (●) Cellic® CTec2 HS

Στο Διάγραμμα 15 εμφανίζεται αύξηση της απόδοσης TFC μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ώρας εκχύλισης με τη βέλτιστη δράση να την παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα με τα ενζυμικά σκευάσματα Pectinex® Ultra Color, (140 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης) και Cellic® CTec2 HS (130 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης). Στο εκχύλισμα, απουσία ενζύμου η τιμή απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) δε ξεπερνά τα 120 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης. Και σε αυτή τη περίπτωση, στις 2 ώρες επιτυγχάνεται η εκχύλιση της μέγιστης ποσότητας φλαβονοειδών ενώσεων.

Η ΕΥΕ εκχύλιση σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 50% όσον αφορά το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα έναντι του εκχυλίσματος αναφοράς (απουσία ενζύμου) (Διάγραμμα 16). Τα ένζυμα δρουν ενισχυτικά στην εκχύλιση, καθώς η απόδοση TFC είναι υψηλότερη σε όλα τα εκχυλίσματα. Βέλτιστη δράση παρουσιάζουν τα ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec3 HS και Pectinex® με απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) 140 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης και 132 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης αντίστοιχα. Και σε αυτή τη περίπτωση, στις 2 ώρες επιτυγχάνεται η εκχύλιση της μέγιστης ποσότητας φλαβονοειδών ουσιών.



Διάγραμμα 17. Χρονική μεταβολή της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων με διαλύτη *Bet:Gly 1:3* με ποσοστό συν-διαλύτη 50%, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina L.* 7,5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα: (●) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7.5 αντί ενζύμου, (●) Cellic® CTec3 HS, (●) Pectinex®, (●) Neutrase®, (●) Viscoferm® και (●) Cellic® CTec2 HS.

Συνολικά, βέλτιστα αποτελέσματα απέδωσε η ενζυμική εκχύλιση με συνδυασμό NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 20% (v/v) όπου επιτεύχθηκε απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) 180 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης από το ημικυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm®. Ικανοποιητικά αποτελέσματα προέκυψαν επίσης από το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS για ποσοστό συν-διαλύτη 50% (v/v) με τιμή απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) 140 mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης. Οι 2 ώρες εκχύλισης κρίνονται επαρκής χρόνος εκχύλισης φλαβονοειδών ουσιών.

3.2.3. Αντιοξειδωτική δράση (δέσμευση ρίζας DPPH)

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC₅₀ για διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 20% (v/v) νερού. Ως control αναφέρονται τα δείγματα που προέκυψαν από την εκχύλιση μόνο με NaDES. Οι τιμές των δεικτών IC₅₀ έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 1-6 που παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Από τον Πίνακα 14 παρατηρείται ότι τα ενζυμικά υποβοηθούμενα εκχυλίσματα σε NaDES στις 2 ώρες παρουσιάζουν χαμηλότερους δείκτες IC₅₀ από ότι τα

εκχυλίσματα των NaDES, επομένως παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH. Την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή τους χαμηλότερους δείκτες IC₅₀, στις 2 ώρες εκχύλισης παρουσιάζουν τα ενζυμικά σκευάσματα Pectinex® Ultra Color και Neutrase®. Σημειώνεται ότι γενικά οι χαμηλότερες τιμές του δείκτη IC₅₀ αντιστοιχούν στις 4 ώρες για τα ενζυμικά σκευάσματα Viscoferm® και Neutrase®.

Πίνακας 14. Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (H₂O) 20% για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για t=1,2,3,4.

| Χρόνος (h) | IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος) | | | | | |
|------------|--|------------------|------------------|-----------------------|--------------|---------------|
| | Control | Cellic® CTec2 HS | Cellic® CTec3 HS | Pectinex® Ultra Color | Viscoferm® | Neutrase® |
| 1 | 0,406 ±0,024 | 0,458 ±0,023 | 0,457 ±0,023 | 0,387 ±0,023 | 0,429 ±0,039 | 0,380 ±0,027 |
| 2 | 0,456 ±0,023 | 0,455 ±0,032 | 0,385 ±0,027 | 0,334 ±0,027 | 0,394 ±0,008 | 0,365 ±0,018 |
| 3 | 0,400 ±0,020 | 0,417 ±0,025 | 0,548 ±0,018 | 0,360 ±0,018 | 0,393 ±0,031 | 0,314 ±0,025 |
| 4 | 0,422 ±0,021 | 0,443 ±0,022 | 0,573 ±0,014 | 0,473 ±0,014 | 0,306 ±0,015 | 0,327 ±0,0016 |

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC₅₀ για διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 35% (v/v) νερού. Οι τιμές των δεικτών IC₅₀ έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 7-12 που παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Πίνακας 15. Δείκτης IC₅₀ των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με 35% συν-διαλύτη H₂O για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για t=1,2,3,4.

| Χρόνος (h) | Total IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος) | | | | | |
|------------|--|------------------|------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | Control | Cellic® CTec2 HS | Cellic® CTec3 HS | Pectinex® Ultra Color | Viscoferm® | Neutrase® |
| 1 | 0,368 ±0,019 | 0,376 ±0,018 | 0,365 ±0,030 | 0,356 ±0,037 | 0,446 ±0,019 | 0,426 ±0,021 |
| 2 | 0,328 ±0,015 | 0,364 ±0,029 | 0,357 ±0,039 | 0,426 ±0,007 | 0,379 ±0,001 | 0,370 ±0,000 |
| 3 | 0,320 ±0,019 | 0,386 ±0,038 | 0,412 ±0,014 | 0,408 ±0,070 | 0,544 ±0,004 | 0,445 ±0,022 |
| 4 | 0,302 ±0,034 | 0,416 ±0,012 | 0,610 ±0,003 | 0,397 ±0,022 | 0,505 ±0,022 | 0,387 ±0,009 |

Στα εκχυλίσματα υποβοηθούμενα από τα ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec2 HS και Cellic® CTec2 HS παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την δέσμευση

του 50% της ρίζας DPPH, δηλαδή παρατηρούνται μικρότερες τιμές του δείκτη IC_{50} . (Πίνακας 15). Σημειώνεται όμως ότι για το συγκεκριμένο ποσοστό συν-διαλύτη το εκχύλισμα υποβοηθούμενο μόνο από το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με 35% (v/v) H_2O απέδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή χαμηλότερο δείκτη IC_{50} .

Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα διαγράμματα 11-16, όπου στις 2 ώρες παρουσιάζεται η μέγιστη απόδοση σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών (TPC και TFC αντίστοιχα).

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται συνοπτικά οι τιμές των δεικτών IC_{50} για διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 50% (v/v) νερού. Οι τιμές των δεικτών IC_{50} έχουν προκύψει από την κλίση και την αποτέμνουσα των Διαγραμμάτων 8-13 που παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Πίνακας 16. Δείκτης IC_{50} των εκχυλισμάτων για πέντε ένζυμα για ποσοστό στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, με διαλύτη Bet:Gly 1:3 με ποσοστό 50% H_2O για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για $t=1,2,3,4$.

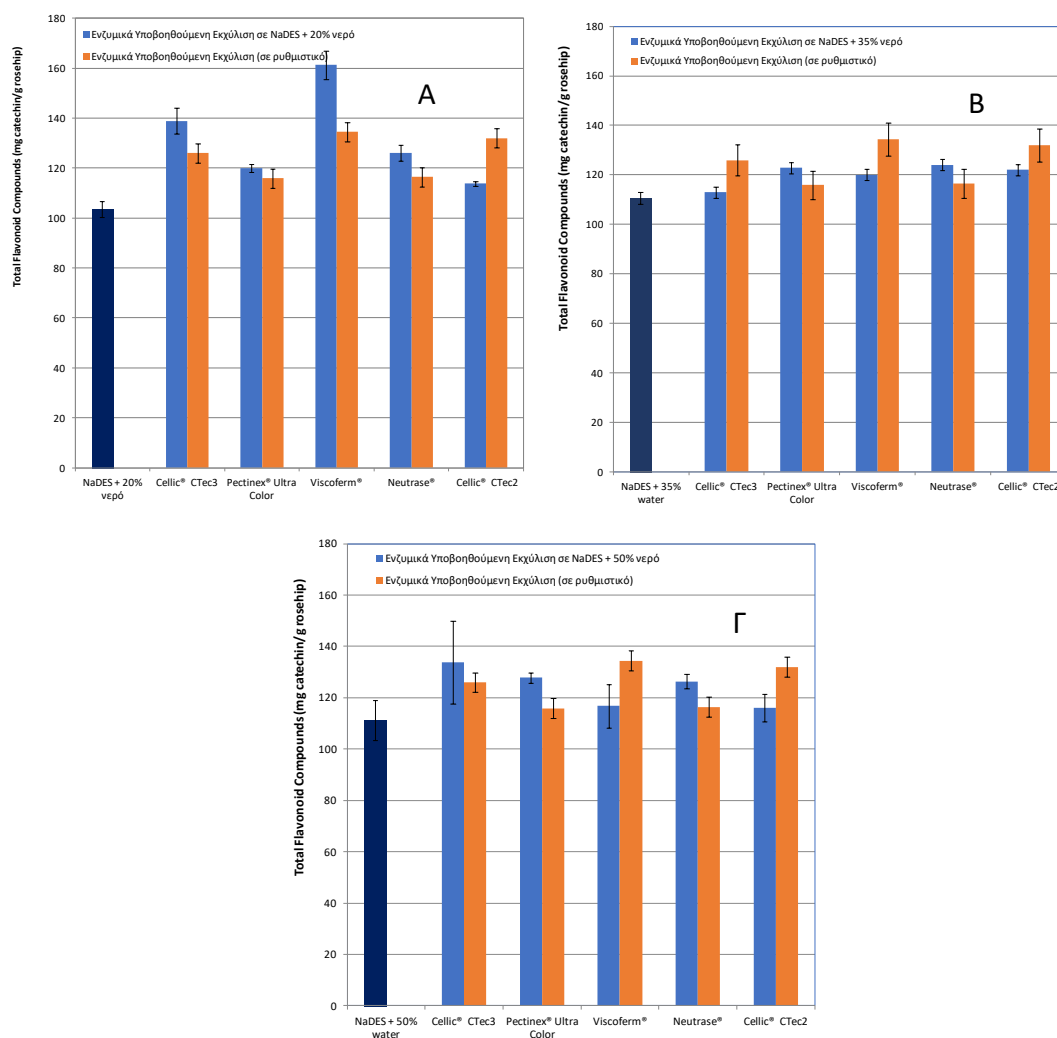
| Χρόνος (h) | IC_{50} (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος) | | | | | |
|------------|---|------------------|------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| | Control | Cellic® CTec2 HS | Cellic® CTec3 HS | Pectinex® Ultra Color | Viscoferm® | Neutrase® |
| 1 | 0,383 ±0,087 | 0,372 ±0,026 | 0,407 ±0,091 | 0,387 ±0,037 | 0,502 ±0,009 | 0,403 ±0,015 |
| 2 | 0,328 ±0,033 | 0,351 ±0,003 | 0,333 ±0,038 | 0,346 ±0,007 | 0,504 ±0,010 | 0,343 ±0,007 |
| 3 | 0,291 ±0,002 | 0,340 ±0,000 | 0,292 ±0,014 | 0,434 ±0,024 | 0,523 ±0,032 | 0,510 ±0,082 |
| 4 | 0,337 ±0,054 | 0,378 ±0,066 | 0,373 ±0,003 | 0,391 ±0,039 | 0,546 ±0,032 | 0,359 ±0,001 |

Από τον Πίνακα 16 προκύπτει ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα για το σύνολο των ενζύμων, δηλαδή οι χαμηλότεροι δείκτες IC_{50} αντιστοιχούν στις 2 και στις 3 ώρες εκχύλισης. Συγκεκριμένα, το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS εμφανίζει τους χαμηλότερους δείκτες IC_{50} στις 2 και στις 3 ώρες εκχύλισης που προσεγγίζουν τις τιμές των εκχυλισμάτων των NaDES.

3.2.4. Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES

Για την εύρεση της πιο αποδοτικής εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης, της απλής EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και της EYE σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συνδιαλύτη νερό σε διαφορετικά ποσοστά (20, 35, 50% v/v). Τα αποτελέσματα της απλής EYE εκχύλισης έχουν προκύψει από προγενέστερες πειραματικές σειρές. Οι συνθήκες της απλής EYE που εφαρμόστηκαν ήταν 7.5% (w/v) πρώτη ύλη κοκκομετρίας < 500 μm, ενζυμικό φορτίο 1% (v/v) σε θερμοκρασία εκχύλισης 50°C για 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 και 48 ώρες. Η σύγκριση γίνεται σε χρόνο εκχύλισης στις 2 ώρες καθότι η EYE με NaDES εμφάνισε τα βέλτιστα αποτελέσματα εκχύλισης σε φλαβονοειδείς και φαινολικές ενώσεις.

Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς τις εκχυλιζόμενες φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC)



Διάγραμμα 188. Σύγκριση της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων της EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και της EYE με NaDES με διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (A) 20% v/v (B) 35% v/v, (Γ) 50% v/v, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης R.

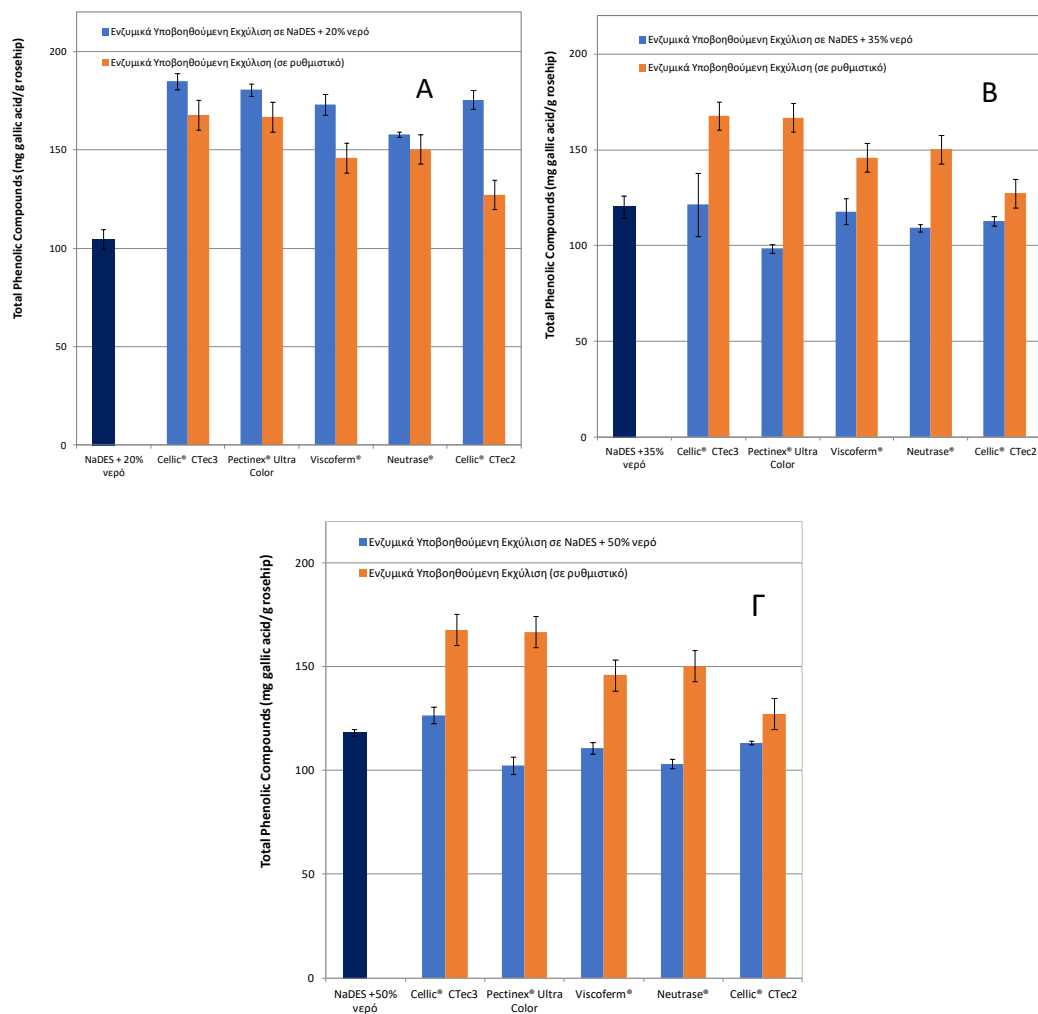
canina L. 7.5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα (■) EYE σε NADES με διαφορετικό ποσοστό συνδιαλύτη νερό, (■) απλή EYE

Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις στα εκχυλίσματα προκύπτει ότι:

- η εκχύλιση με NaDES με συνδιαλύτη νερό σε όλα τα ποσοστά παρουσιάζει τις μικρότερες τιμές εκχυλισθέντων φλαβονοειδών ενώσεων και από EYE και από την EYE με NaDES.
- η EYE με NaDES με συνδιαλύτη νερό 20% (v/v) είναι πιο αποδοτική συγκριτικά με την απλή EYE (εκτός από την περίπτωση του Cellic® CTec2 HS) αλλά και από την EYE με NaDES με συνδιαλύτη νερό (35+50%)(v/v), δηλαδή η προσθήκη μεγαλύτερου ποσοστού νερού στον NaDES δεν επέφερε αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης.
- η απλή ενζυμική εκχύλιση που εμφανίζει μικρότερες τιμές φλαβονοειδών ενώσεων συγκριτικά με την EYE με NaDES με συνδιαλύτη νερό 20% (v/v) έχει πραγματοποιηθεί στους 50°C ενώ η EYE με NaDES στους 40°C. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ταχύτερη απενεργοποίηση των ενζύμων στους 50°C σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης της σταθερότητας των ενζύμων σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε NaDES με συνδιαλύτη νερό στα διαφορετικά ποσοστά (Κεφάλαιο 3.2). Εάν συγκριθούν οι σταθερές απενεργοποίησης των ενζύμων k_d σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 50°C και σε NaDES σε 40°C θα διαπιστωθεί ότι οι εν λόγω σταθερές είναι πολύ υψηλές στο ρυθμιστικό διάλυμα στους 50°C, γεγονός που υποδηλώνει ταχύτερη απενεργοποίηση του ενζύμου, μετουσίωση της πρωτεΐνης (Πίνακες 6-13). Η αποδοτικότερη εκχύλιση σε χαμηλότερη θερμοκρασία δίνει την δυνατότητα για περαιτέρω διερεύνηση κλιμάκωσης μεγέθους της διεργασίας με απώτερο σκοπό την εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα. Είναι γνωστό ότι οι βιομηχανίες στοχεύουν στην μείωση της ετήσιας κατανάλωσης ενέργειας. Σύμφωνα με το Άρθρο 194 της Συνθήκης για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης , (ΣΛΕΕ) έχει τεθεί πλέον νέος στόχος στις βιομηχανίες για μείωση της ετήσιας κατανάλωσης ενέργειας κατά τουλάχιστον 32.5 % έως το 2030, ενώ ο προηγούμενος στόχος ήταν μείωση 20% μέχρι το 2020.
- η EYE εμφανίζει τις μέγιστες τιμές εκχυλισθέντων φλαβονοειδών ενώσεων σε χρόνους εκχύλισης μεταξύ 4 και 6 ωρών με εύρος τιμών TFC 132-148 (mg κατεχίνης/gr πρώτης ύλης), ενώ η EYE με NaDES στις 2 ώρες . Η EYE με NaDES υπερέχει χρονικά έναντι της απλής ενζυμικής γεγονός που δίνει τη δυνατότητα για περαιτέρω διερεύνηση κλιμάκωσης μεγέθους και βιομηχανική εφαρμογή.

Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς τις εκχυλιζόμενες φαινολικές ενώσεις (TPC).

Στο Διάγραμμα 19 (A, B, Γ) απεικονίζεται η EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και η EYE με NaDES με συνδιαλύτη νερό σε διαφορετικά ποσοστά ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 199. Σύγκριση της απόδοσης του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων της EYE σε ρυθμιστικό διάλυμα και της EYE με NaDES με διαλύτη Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη (A) 20% v/v (B) 35% v/v, (Γ) 50% v/v, για όλα τα προς εξέταση ένζυμα, για συγκέντρωση στερεής πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v και για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v. Σύμβολα (■) EYE σε NADES με διαφορετικό ποσοστό συνδιαλύτη νερό, (■) απλή EYE

Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα προκύπτει ότι:

- η αποδοτικότερη μέθοδος εκχύλισης είναι η EYE με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συνδιαλύτη νερό 20% v/v καθώς καταγράφηκαν οι υψηλότερες τιμές εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τις υπόλοιπες εκχύλισεις στις διαφορετικές συνθήκες.
- η προσθήκη μεγαλύτερου ποσοστού νερού στον NaDES είχε αρνητικό αποτέλεσμα στο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα.
- η EYE με το κυτταρινολυτικό και το πηκτινολυτικό εμπορικό σκεύασμα σε συνδυασμό με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συνδιαλύτη νερό 20% v/v παρουσίασαν τα βέλτιστα αποτελέσματα απόδοσης σε φαινολικές ενώσεις.

Σύγκριση απλής EYE και συνδυασμού EYE με NaDES ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα IC₅₀

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την EYE και την EYE με NaDES παρουσίασαν πολύ καλή αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία κυμάνθηκε από 0.2-0.6 μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος.

Συμπερασματικά η αποδοτικότερη μέθοδος εκχύλισης είναι EYE με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συνδιαλύτη νερό 20% (v/v), 1% v/v ενζυμικό φορτίο, 7.5% (w/v) πρώτη ύλη κοκκομετρίας < 500 μm, σε θερμοκρασία και χρόνο εκχύλισης 40°C. και 2 ώρες αντίστοιχα.

Η συνθήκη αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι ο εν λόγω NaDES αποτελεί συστατικό στις καλλυντικές κρέμες και δεν χρειάζεται να απομακρυνθεί, ενώ τα μικρότερα ποσοστά νερού είναι τα επιθυμητά για να αποφεύγεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών μέσα στην κρέμα.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενζυμική σταθερότητα πέντε εμπορικών σκευασμάτων με κυτταρινολυτική (Cellic®CTec3 HS, Cellic®CTec2 HS), ημικυτταρινολυτική (Viscoferm®), πηκτινολυτική (Pectinex® Ultra Color), και πρωτεολυτική (Neutrase®) δράση της εταιρείας Novozymes, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.5 mM με pH=7.5 και σε Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) με διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη νερό, σε θερμοκρασίες 40 και 50°C για 24 ώρες.

Ως υποψήφιοι προς εξέταση NaDES επιλέχθηκε ο συνδυασμός Βεταΐνη-Γλυκερόλη σε μοριακή αναλογία 1:2 και 1:3 όχι μόνο γιατί εμφανίζουν ένα εύρος pH κοντινό σε αυτό των περισσότερων ενζύμων αλλά και γιατί η Βεταΐνη και η Γλυκερόλη είναι συστατικά συμβατά με καλλυντικές εφαρμογές σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό Καλλυντικών ΕΚ αριθ. 1223/2009, Παράρτημα II (Benoit et al., 2021).

Ως προς την σταθερότητα των ενζυμικών σκευασμάτων σε NaDES και σε ρυθμιστικό διάλυμα, το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Cellic®CTec3 HS εμφάνισε αυξημένη σταθερότητα στους NaDES συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι χρόνοι ημιζωής των ενζύμων που υπολογίστηκαν σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 ήταν σχεδόν 5 και 2 φορές παραπάνω συγκριτικά με τον αντίστοιχο χρόνο ημιζωής σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 40°C. Η μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάστηκε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 για 35% (v/v) ποσοστό συν-διαλύτη H_2O . Πιο γρήγορη απενεργοποίηση του κυτταρινολυτικού σκεύασματος καταγράφηκε στους 50°C με τους NaDES να εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα.

Το πηκτινολυτικό σκεύασμα Pectinex® Ultra Color εμφάνισε την ίδια σταθερότητα στους 40°C σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε NaDES. Παρόλα αυτά μικρή αύξηση της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης ($E_{(a)d}$) καταγράφηκε σε NaDES συγκριτικά με αυτή στο ρυθμιστικό διάλυμα. Ο χρόνος ημιζωής και στις τρεις περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερος στους 40°C από ότι στους 50°C.

Το ενζυμικό πρωτεολυτικό σκεύασμα Neutrase® παρουσίασε αυξημένη σταθερότητα στους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20% στους 40°C καθότι εμφάνισε υψηλότερες τιμές χρόνου ημίσειας ζωής και χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value) ενώ οι σταθερές θερμικής απενεργοποίησης k_d (h^{-1}) ήταν μικρότερες γεγονός που υποδεικνύει πιο αργή απενεργοποίηση του ενζύμου. Ο χρόνος ημιζωής και στις τρεις περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερος στους 40°C από ότι στους 50°C.

Το ημικυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® παρουσίασε ίδια συμπεριφορά σταθερότητας όπως και τα υπόλοιπα ενζυμικά σκεύασματα.

Εμφανίστηκε πιο σταθερό σε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και 1:2. Συγκεκριμένα, στους 40°C ο χρόνος ημιζωής για τους NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και 1:2 ήταν 1405 και 1470 λεπτά αντίστοιχα, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα μόλις 39 λεπτά. Ο χρόνος ημιζωής και στις τρεις περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερος στους 40°C από ότι στους 50°C. Για παράδειγμα, για τον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 ο χρόνος ημιζωής στους 40°C είναι 1405 λεπτά ενώ στους 50°C είναι τρεις φορές μικρότερος, 494

λεπτά. Η μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάστηκε NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 για 20% (v/v) ποσοστό συν-διαλύτη H_2O .

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι οι Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες δρουν σταθεροποιητικά ως προς τα ενζυμικά σκευάσματα.

Η ενίσχυση των ενζυμικών σκευασμάτων από τους NaDES έχει αποδειχθεί και από μελέτες που έχουν γίνει σε υδρολάσεις, πρωτεάσες, εστεράσες λιπάσες και λακάσες (Durand et al., 2016, Khodaverdian et al., 2018). Ενώ η βεταΐνη ως συστατικό έδειξε πιο αποτελεσματική δράση σε σύγκριση με τη χλωριούχο χολίνη και επιπλέον έδρασε θερμοπροστατευτικά για το ένζυμο. Ένα οξειδοαναγωγικό ένζυμο Horseradish peroxidase (HRP), το οποίο μελετήθηκε ως προς την ενεργότητά του στους 37°C σε διάφορους NaDES, συμπεριλαμβανομένου του Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:2 εμφάνισε υψηλότερη σχετική ενεργότητα στους NaDES απ'ότι στο ρυθμιστικό (Gajardo-Parra et al. 2022). Η ενισχυτική δράση των NaDES οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει ο NaDES με την επιφάνεια του ενζύμου σταθεροποιώντας το.

Τα αποτελέσματα της σταθερότητας κατέδειξαν τον NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με συν-διαλύτη νερό 20% στους 40°C το καταλληλότερο περιβάλλον για τα διαφορετικά ενζυμικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Ο παραπάνω NaDES επιλέγεται ώστε να συνδυαστεί με την Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού του *Rosa canina* L.. Εξετάστηκε η απόδοση του κάθε ενζυμικού σκευάσματος που μελετήθηκε παραπάνω ως προς τη σταθερότητα (σημειώνεται ότι εξετάστηκε επιπλέον και το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 HS το οποίο αποτελεί προηγούμενη έκδοση του σκευάσματος Cellic® CTec3 HS). Ως συνθήκες εκχύλισης ορίστηκαν η θερμοκρασία εκχύλισης στους 40°C και ρυθμός ανάδευσης στις 1300 rpm, ενζυμικό φορτίο 1% v/v 7,5 w/v πρώτη ύλη (αποξηραμένο περικάρπιο *Rosa canina* L). με κοκκομετρία <500 μm.

Η πιο αποδοτική εκχύλιση αναφορικά με το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC) επιτεύχθηκε με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη 20% συν-διαλύτη σε σύγκριση με 35 και 50% όπου οι μέγιστες εκχυλισθέντες τιμές είναι στο εύρος 150-190 $\frac{mg \text{γαλλικού οξέος}}{g \text{πρώτης ύλης}}$ έναντι των τιμών 80-130 και 80-140 $\frac{mg \text{γαλλικού οξέος}}{g \text{πρώτης ύλης}}$ για ποσοστά συν-διαλύτη 35 και 50% v/v αντίστοιχα. Το ενζυμικό σκεύασμα που εμφάνισε τη βέλτιστη απόδοση σε φαινολικές ενώσεις και στα τρία ποσοστά συν-διαλύτη είναι το Cellic® CTec3 HS (185, 122 και 140 $\frac{mg \text{γαλλικού οξέος}}{g \text{πρώτης ύλης}}$ για ποσοστά συν-διαλύτη (H_2O) 20, 35 και 50% v/v αντίστοιχα).

Βέλτιστα αποτελέσματα αναφορικά με το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) απέδωσε η ενζυμική εκχύλιση με συνδυασμό NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με ποσοστό συν-διαλύτη 20% όπου επιτεύχθηκε απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) 180 $\frac{mg \text{κατεχίνης}}{g \text{πρώτης ύλης}}$ από το ημικυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα

Viscoferm®. Ικανοποιητικά αποτελέσματα προέκυψαν επίσης από το κυτταρινολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS για ποσοστό συν-διαλύτη 50% με τιμή απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) $140 \frac{mg \text{κατεχίνης}}{g \text{πρώτης ύλης}}$ και για ποσοστό συν-διαλύτη 35% με τιμή απόδοση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) $122 \frac{mg \text{κατεχίνης}}{g \text{πρώτης ύλης}}$

Για το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά (TPC) και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) η μέγιστη απόδοση επιτυγχάνεται μέχρι τις 2 ώρες εκχύλισης.

Η αντιοξειδωτική δράση που υπολογίστηκε μέσω της δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH για ποσοστό συν-διαλύτη 20% v/v NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 βρέθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητική για το ημικυτταρινολυτικό σκεύασμα Viscoferm® (δείκτης IC_{50} 0.306) και το πρωτεολυτικό σκεύασμα Neutrase® (δείκτης IC_{50} 0.327) για τις 4 ώρες εκχύλισης. Για ποσοστό συν-διαλύτη 35% χαμηλότερο δείκτη IC_{50} έδειξε το σκεύασμα Cellic® CTec3 HS (0.357) για τις 2 ώρες εκχύλισης. Τέλος, για ποσοστό συν-διαλύτη 50% το κυτταρινολυτικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS εμφανίζει τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση για τις 2 και 3 ώρες, 0.333 και 0.292 αντίστοιχα.

Είναι δύσκολο να επιλεγεί μία κοινή συνθήκη για όλα τα ενζυμικά σκευάσματα καθώς εμπλέκονται πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν ταυτόχρονα τη πορεία της αντίδρασης. Για παράδειγμα, η προσθήκη του συν-διαλύτη (H_2O) αλλάζει όχι μόνο το ιξώδες του διαλύτη αλλά και το pH. Επομένως η προσθήκη νερού μπορεί να μειώσει το ιξώδες του NaDES βελτιώνοντας τα φαινόμενα μεταφοράς, μεταφέροντας περισσότερα βιοενεργά συστατικά από την πρώτη ύλη στον κύριο όγκο του υγρού και παράλληλα να δημιουργηθεί NaDES ανάλογα το ποσοστό του συν-διαλύτη με διαφορετικά, pH.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, ο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη H_2O σε ποσοστό 20% v/v, με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με κυτταρινολυτικά, ημικυτταρινολυτικά και πηκτινολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν εκχυλίσματα με μεγαλύτερες αποδόσεις συγκριτικά με εκχυλίσματα που έχουν προκύψει από την εκχύλιση με εφαρμογή μόνο με NaDES. Η ενοποιημένη διεργασία παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα καθότι τα ένζυμα δρουν εκλεκτικά αποικοδομώντας το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα ενώ οι NaDES δρουν προστατευτικά σε αλλαγές που συμβαίνουν στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, α-έλικες και β-φύλλα ενισχύοντας την σταθερότητα των ενζύμων ενώ παράλληλα αποικοδομούν την ημικυτταρίνη και την λιγνίνη, δημιουργώντας μεγαλύτερη αποσταθεροποίηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, αυτή η συνέργεια των ενζύμων με τους NaDES οδηγεί σε εκχυλίσματα με περισσότερα εκχυλισθέντα βιοενεργά συστατικά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της απλής EYE στους 50°C με την ενοποιημένη EYE με NaDES στους 40°C σε 2 ώρες χρόνο εκχύλισης. Η πιο αποδοτική εκχύλιση ήταν η ενοποιημένη διεργασία δηλαδή EYE με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη H_2O σε ποσοστό 20% v/v στους 40°C.

Η χρησιμοποίηση των NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη στην EYE παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι αποτελούν συστατικά των καλλυντικών κρεμών και σε κλιμάκωση μεγέθους για βιομηχανική εφαρμογή δεν θα χρειάζεται να απομακρυνθούν τα εν λόγω συστατικά. Η EYE με NaDES είναι πιο αποδοτική στους 40°C σε 2ωρες συγκριτικά με την απλή EYE στους 50°C, η ενοποιημένη διεργασία έχει μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις και μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω για κλιμάκωση μεγέθους. Τέλος η συνθήκη της EYE με NaDES που εμφάνισε τις καλύτερες αποδόσεις σε βιοενεργά συστατικά περιείχε το μικρότερο ποσοστό νερού ως συνδιάλυτη στον NaDES, γεγονός που αποτελεί ακόμα ένα πλεονέκτημα για βιομηχανική εφαρμογή καθώς υπάρχει απαίτηση για μικρή περιεκτικότητα σε νερό στις καλλυντικές κρέμες για αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η ενοποιημένη διεργασία εκχύλισης είναι μια πολλά υποσχόμενη διεργασία για περαιτέρω διερεύνηση και σχεδιασμό της διεργασίας για βιομηχανική εφαρμογή.

5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Από τη παρούσα Διπλωματική Εργασία έγινε εμφανές ότι οι Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES) μπορούν με ιδιαίτερη επιτυχία να αξιοποιηθούν ως διαλύτες εκχυλίσεων βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες, ενώ παράλληλα αποτελούν μία πράσινη εναλλακτική. Η προσαρμοστικότητά τους και οι αναρίθμητοι συνδυασμοί τους, τους καθιστούν ιδανικούς για πληθώρα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων και των βιομηχανιών τροφίμων και καλλυντικών. Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός τους με Ενζυμικά Υποβοηθούμενες Εκχυλίσεις (EYE) έδειξε να αυξάνει επιπλέον την απόδοση της εκχύλισης, επομένως περαιτέρω ενασχόληση με τη παρούσα ερευνητική δράση είναι ενθαρρυντική τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο.

Οι NaDES, καθώς προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες, είναι φιλικό για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και μπορούν να αντικαταστήσουν τοξικούς οργανικούς διαλύτες. Τα ένζυμα αποτελούν επίσης μια πράσινη μέθοδο εκχύλισης ενώ δεν απαιτούν πολύπλοκα στάδια διαχωρισμού και καθαρισμού του τελικού προϊόντος. Ήπιες συνθήκες λειτουργίας απαιτούνται και τις δύο προαναφερθέντες περιπτώσεις, μειώνοντας το ενεργειακό και κατά συνέπεια το οικονομικό κόστος. Ταυτόχρονα προστατεύονται θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες στο εκχύλισμα, όπως η βιταμίνη C, αυξάνοντας την αξία του τελικού προϊόντος το οποίο είναι πιο ενισχυμένο σε θρεπτικά συστατικά. Από την επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων προέκυψε ότι η διεργασία της εκχύλισης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για διάρκεια 2 ωρών επομένως ελαττώνονται τα λειτουργικά κόστη της διεργασίας.

Οι NaDES μειονεκτούν ως προς το υψηλό κόστος τους και συχνά ως προς το υψηλό ιξώδες τους το οποίο μπορεί να αποτελέσει τροχοπέδη στη πλήρη διάχυση του ενζύμου στον όγκο του διαλύτη. Προσθήκη νερού ή άλλων συνδιάλυτων ή/και

αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ένα σημείο είναι κάποιοι τρόποι που μπορούν να μειώσουν το ιξώδες του διαλύτη διευκολύνοντας τα φαινόμενα μεταφοράς των βιοδραστικών ουσιών μέσα σε αυτόν. Δεδομένου όμως ότι η προσθήκη συν-διαλύτη επηρεάζει το pH, το προστιθέμενο ποσοστό πρέπει να είναι ελεγχόμενο.

Για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού του *Rosa canina* L. επιλέχθηκαν οι NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 και 1:2 με συν-διαλύτη νερό 20, 35 και 50%. Θα είχε ενδιαφέρον να επεκταθεί η συγκεκριμένη μελέτη και με άλλους συνδυασμούς NaDES και συν-διαλυτών.

Μία ακόμα εφαρμογή που θα μπορούσε να δοκιμαστεί είναι η σύζευξη του συνδυασμού της Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης με NaDES με κάποια άλλη μέθοδο μη συμβατικής εκχύλισης όπως οι υπέρηχοι (UAE) ή τα μικροκύματα (MAE) με σκοπό τη βελτιστοποίηση της απόδοσης και τη μείωση του απαιτούμενου χρόνου εκχύλισης.

Εκτός από τα παραπάνω, πρόταση για περαιτέρω έρευνα αποτελεί η μελέτη της συνεργιστικής δράσης ενζύμων σε περιβάλλον NaDES. Η ενζυμική δράση πιθανότατα να ενισχυθεί με το συνδυασμό ενζυμικών σκευασμάτων, ιδιαίτερα σε ένα περιβάλλον που δρα προστατευτικά για τα ένζυμα όπως είναι οι NaDES. Η ενισχυμένη δράση εάν επιτευχθεί θα οδηγήσει σε υψηλή απόδοση σε συντομότερο χρονικό διάστημα επιταχύνοντας τη διάρκεια και συνεπώς χαμηλότερο λειτουργικό κόστος.

Αν και η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση είναι αποδοτική και ως έχει, συχνά τα ένζυμα χάνουν μέρος της ενεργότητάς τους λόγω των συνθηκών και της καταπόνησης κατά τη διεργασία. Καθώς η προμήθειά τους είναι κοστοβόρα, είναι σημαντική η διατήρηση της ενεργότητάς τους στο μέγιστο δυνατό. Σε αυτό δίνουν λύση οι NaDES οι οποίοι δρουν σταθεροποιητικά για τα ένζυμα αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους.

Συμπληρωματικά, άλλοι παράγοντες του προαναφερθέντος συνδυασμού μεθόδων που θα μπορούσαν να μελετηθούν είναι το ενζυμικό φορτίο και η ποσότητα στερεάς ουσίας (*Rosa canina* L.). Για παράδειγμα εάν επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα με μικρότερη ποσότητα ενζυμικού φορτίου, θα μειωθεί το κόστος της εκχύλισης.

Η ανάπτυξη ενζυμικών καταλυτικών συστημάτων σε βιομηχανική κλίμακα μελετάται ενδελεχώς, υπάρχουν όμως κάποιες προκλήσεις στην υλοποίηση κυρίως εξαιτίας του υψηλού κόστους των ενζύμων. Συνεπώς, για να γίνουν πιο ανταγωνιστικά θα πρέπει να γίνουν κάποια από τα παρακάτω: ελάττωση του κόστους παραγωγής των ενζύμων, βελτίωσή τους και επαναχρησιμοποίησή τους, μέσω της ακινητοποίησής τους κατά τη διεργασία (Marathe et al., 2017). Η ακινητοποίηση αυτή των ενζύμων γίνεται είτε σε ανόργανους φορείς όπως οι ζεόλιθοι, το αλουμίνιο και το πυρίτιο είτε σε μαγνητικά νανοσωματίδια (magnetic nanoparticles, MNPs). Τα MNPs συγκεντρώνουν πολλά θεμιτά χαρακτηριστικά. Έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια, εύκολη πρόσβαση στο υπόστρωμα και υποστηρίζουν ικανοποιητική ποσότητα φορτίου. Παράλληλα απομακρύνονται με ευκολία από το διάλυμα με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Εκτός αυτών, η βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητά

τους, η χαμηλή τοξικότητα και κόστος θα καθιστούν ιδανική επιλογή για ακινητοποίηση των ενζύμων (Nadar et al., 2018).

Ο τομέας των Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών αποτελεί μία καινοτόμα και πρόσφατη ανακάλυψη με πολλά υποσχόμενες εφαρμογές σε πολλούς τομείς. Έτσι, υπάρχουν πολλά περιθώρια για έρευνα αξιοποιώντας τους.

6. Βιβλιογραφία

Angelov, G., Boyadzhieva, S., & Georgieva, S. (2014). Rosehip extraction: Process optimization and antioxidant capacity of extracts. *Central European Journal of Chemistry*, 12(4), 502-508. <http://dx.doi.org/10.2478/s11532-013-0395-0>

Ayati Z., M. S. Amiri M. S., Ramezani M., Delshad E., Sahebkar A., and Emami S.A., "Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 24, no. 35, 2018, doi: 10.2174/1381612824666181010151849.

Bastola K. , Guragain Y. , Bhadriraju V. and Vadlani, P. (2017) Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8, 416-431. doi: 10.4236/ajac.2017.86032.

Benoit, C., Virginie, C., & Boris, V. (2021). Chapter Twelve -The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research*, 97, 309-332, <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.009>

Benvenuti, L., Ferreira Zielinski, A. A., & Salvador Ferreira, S. R. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 133-146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>

Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin G., Mahomoodally M.F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*. 2020; 9(8):709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

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., and Tzia C., *Solid-liquid extraction*, vol. 2. CRC Press Boca Raton, FL, USA, 2014.

Cheng X., Bi L., Zhao Z., and Chen Y., "Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products," 2015. doi: 10.2991/ic3me-15.2015.72.

Colegate S.M., & Molyneux R.J. (Eds.). (2007). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, Second Edition (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420006889>

Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G., and others, "Natural products (secondary metabolites)," in *Biochemistry and molecular biology of plants*, vol. 24, American Society of Plant Physiologists Rockville, MD, 2000, pp. 1250– 1319.

Da Silva R. F. et al., "Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review," *Microchemical Journal*, vol. 175. 2022. doi: 10.1016/j.microc.2022.107184.

Delorme, A. E., Andanson, J. M., & Verney, V. (2020). Improving laccase thermostability with aqueous natural deep eutectic solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 919-926.

Durand E., Lecomte J., & Villeneuve P. (2016). From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie*, 120, 119-123.

- El Achkar, T., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* 19, 3397–3408 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>
- Ellison S. L. (2016). Carotenoids: Physiology. *Encyclopedia of Food and Health*, 670–675. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00120-3
- Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, 104(4), 1379-1384, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.053>.
- Erkin Ö., *Herbal Medicine in Stamps: History of Rosa Canina through Philately*, Galore International Journal of Health Sciences and Research Vol.2, Issue: 4, 2017.
- Farooq, M. Q., Abbasi, N. M., & Anderson, J. L. (2020). Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1633, 461613. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461613>
- Fascella G. et al., “Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora,” *Food Chem.*, vol. 289, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.127.
- Fierascu R.C., Fierascu I., Ortan A., Georgiev M.I., Sieniawska E. Innovative Approaches for Recovery of Phytoconstituents from Medicinal/Aromatic Plants and Biotechnological Production. *Molecules*. 2020; 25(2):309. <https://doi.org/10.3390/molecules25020309>
- Gajardo-Parra N. F., Meneses L., Duarte A. R. C., Paiva A., & Held, C. (2022). Assessing the influence of betaine-based natural deep eutectic systems on horseradish peroxidase. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(38), 12873-12881.
- 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.
- Gruenwald J., Uebelhack R. and Moré M. I., “*Rosa canina* – Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanics counteracting osteoarthritis – A systematic review,” *Phytomedicine*, vol. 60, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.152958.
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M. & Sangoro, J. R. (2020). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285.
- Hikmawanti, N., Ramadan, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2091. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>
- Ijardar S. P., Singh V., & Gardas R. L. (2022). Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 27(4), 1368. <https://doi.org/10.3390/molecules27041368>
- Johnson W. et al., “Safety Assessment of *Rosa canina*-derived Ingredients as Used in Cosmetics,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 41, no. 1_suppl, 2022, doi: 10.1177/10915818221080088.

Joshi D. R. and Adhikari N., "An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity," *J. Pharm. Res. Int.*, 2019, doi: 10.9734/jpri/2019/v28i330203.

Kerasioti E. et al., "Polyphenolic composition of *rosa canina*, *rosa sempervivens* and *pyrocantha coccinea* extracts and assessment of their antioxidant activity in human endothelial cells," *Antioxidants*, vol. 8, no. 4, 2019, doi: 10.3390/antiox8040092.

Khodaverdian S., Dabirmanesh B., Heydari A., Dashtban-Moghadam E., Khajeh K., & Ghazi F. (2018). Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2574-2579.

Kocabiyik, S., Erdem, B., 2002. Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles: detection of protease heterogeneity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR). *Bioresour. Technol.* 84, 29–33

Kumar A.K., Parikh B.S. & Pravakar M. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. *Environ Sci Pollut Res* 23, 9265–9275 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4780-4>

Kumar N. & Goel N., "Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications," *Biotechnology Reports*, vol. 24. 2019. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.

Maloupa E. et al., "Molecular Authentication, Phytochemical evaluation and asexual propagation of wild-growing *Rosa canina* L. (Rosaceae) genotypes of 129 Northern Greece for sustainable exploitation," *Plants*, vol. 10, no. 12, p. 2634, 2021.

Marathe S. J., Jadhav S. B., Bankar S. B., and Singhal R. S., "Enzyme-assisted extraction of bioactives," in *Food bioactives*, Springer, 2017, pp. 171–201.

Mármol, I., Sánchez de Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. (2017). Therapeutic Applications of Rose Hips from Different *Rosa* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1137. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061137>

McCabe W. L., Smith J. C., and Harriott P, *Unit operations of chemical engineering*, vol. 5. McGraw-hill New York, 1993.

Mehariya S., Fratini F., Lavecchia R., Zuurro A., (2021) Green extraction of value-added compounds from microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents (NaDES) and related pre-treatments, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 5. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105989>.

Mehta, S.K., & Gowder, S.J.T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* <https://doi.org/10.5772/61884>

Miller, G. L. 1959. Use of Dinitro-Salicylic as Reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426–428.

Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., VeHrpoorte, R., & Choi, Y. H., (2019). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agrifood sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (15), 2564- 2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104, 122-131.

Nadar S. S., Rao P., and Rathod V. K., "Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review," *Food Research International*, vol. 108. 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.03.006.

Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Massoma Lembe, D., Nde, Z., NDE4 , & Nyonseu, D. (2017). Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences, May 22-24, Kuala Lumpur (Malaysia). <https://doi.org/10.15242/IIE.C0517024>

Olusesan, A. T., Azura, L. K., Forghani, B., Bakar, F. A., Mohamed, A. K. S., Radu, S., ... & Saari, N. (2011). Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. *New biotechnology*, 28(6), 738-745.

Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 55(5), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>

Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M, Reis R.L., and Duarte A.R.C., *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2014, 1063-1071, DOI: 10.1021/sc500096j

Panche A. N., Diwan A. D., and Chandra S. R., "Flavonoids: an overview," *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, 2016.

Panić, M., Gunjević, V., Cravotto, G., & Redovniković, I. R. (2019). Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chemistry*, 300, 125185.

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

Platzer M., Kiese S., Herfellner T., Schweiggert-Weisz U., Eisner P. How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants*. 2021; 10(5):811. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>

Pojić M., Mišan A., Tiwari B., Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 75, 2018, Pages 93-104, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>.

Poljsak B., Šuput D., Milisav I., "Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 956792, 11 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>

Puls, J. & Putanen, K., 1989. Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: Coughlan, M.P. (ed) *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, Elsevier Applied Science, London, 151-165.

- Puri M., Sharma D., and Barrow C. J., "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants," *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 1. 2012. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014
- Roman, I., Stănilă, A., & Stănilă, S. (2013) Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J.*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153x-7-73>
- Roberts M. F. (Ed.). (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- Salim M., Saeed A., Iqbal M., Khan B. A., Khan N., Rabbani I., Rasul A. (2022). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. *Brazilian Journal of Biology*, 84 doi:10.1590/1519-6984.256486
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Sedlaczek L. & Smith L. L. (1988) Biotransformations of Steroids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 7:3, 187-236, doi: 10.3109/07388558809146602
- 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 doi:10.1016/j.lwt.2021.111932
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Song Y., Shi X., Ma S. et al. A novel aqueous gallic acid-based natural deep eutectic solvent for delignification of hybrid poplar and enhanced enzymatic hydrolysis of treated pulp. *Cellulose* 27, 8301–8315 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03342-z>
- Stéphane, F.F.Y., Jules, B.K.J., Batiha, G.E., Ali, I., & Bruno, L.N. (2021). Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In ElShemy, H.A. (Ed), *Natural Medicinal Plants*
- Streimikyte P., Viskelis P., and Viskelis J., "Enzymes-Assisted Extraction of Plants for Sustainable and Functional Applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 4, p. 2359, 2022.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Zhang, L., & Demain, A. L. (2005). *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*.
- Tabaszewska M. and Najgebauer-Lejko D., "The content of selected phytochemicals and in vitro antioxidant properties of rose hip (*Rosa canina* L.) tinctures," *NFS J.*, vol. 21, 2020, doi: 10.1016/j.nfs.2020.09.003.
- Tzani A, Kalafateli S, Tatsis G, Bairaktari M, Kostopoulou I, Pontillo ARN, Detsi A. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*. 2021; 2(4):576-598. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>
- Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21 (6), 628-638.

Wang N., & Li Q. (2022). Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from radix bupleuri by natural deep eutectic solvents combined with ultrasound-assisted enzymolysis. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30 doi:10.1016/j.scp.2022.100877

Winther, K., Vinther Hansen, A. S., & Campbell-Tofte J. (2016). Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and antiinflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, 6, 11-23. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S91385>

Wils, L., Hilali, S., & Boudesocque-Delaye, L. (2021). Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France?. *Molecules*, 26(21), 6556. <https://doi.org/10.3390/molecules26216556>

Yang, Z. (2019). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology., 31-59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67

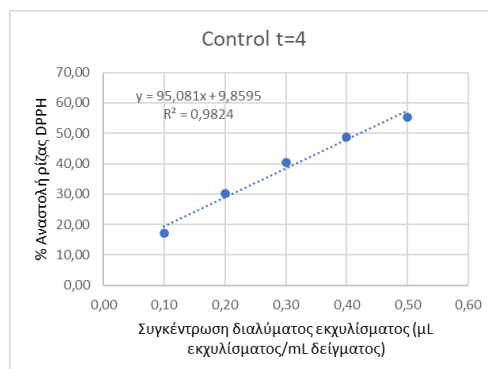
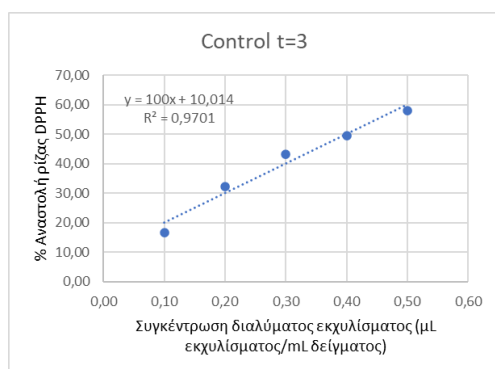
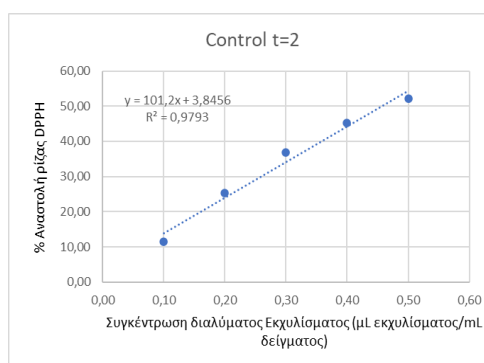
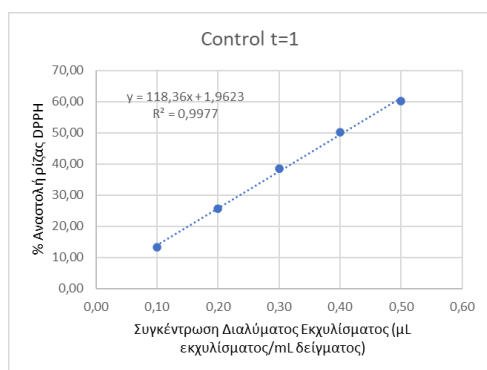
Τόπακας Ε. και Χριστακόπουλος Π., Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015. [Online]. Available: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/1721>

Χαμηλάκης Σ., ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ: Φαρμακευτική χρήση – Καθημερινή ζωή Αλκαλοειδή – Γλυκοζίτες – Αμινοξέα – Τερπένια – Στεροειδή – Ορμόνες. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2022. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/11419/8142>

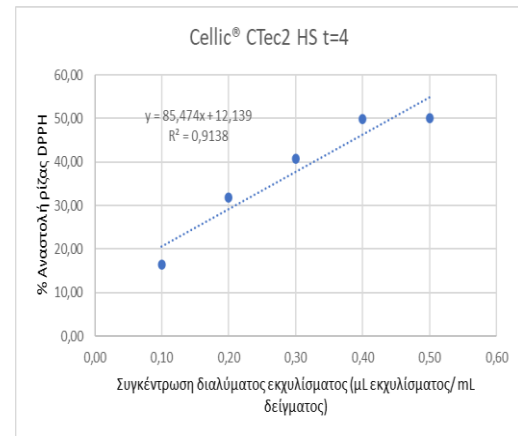
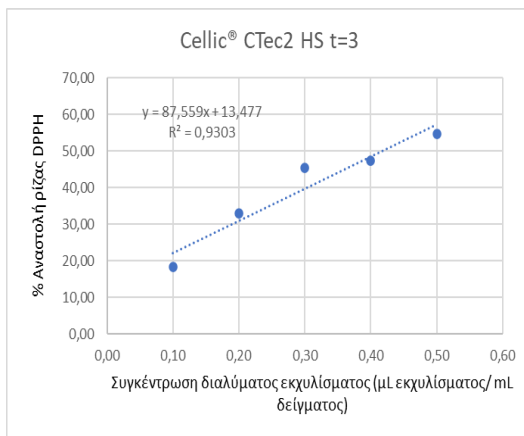
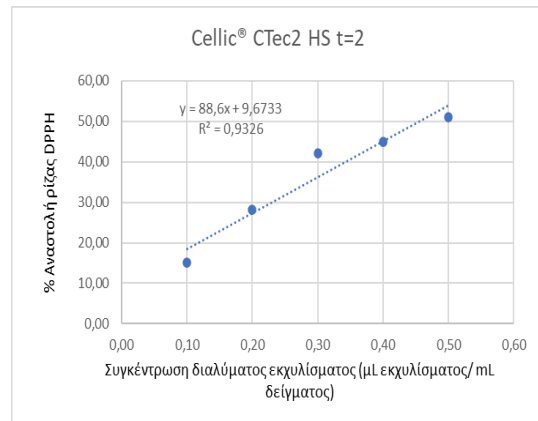
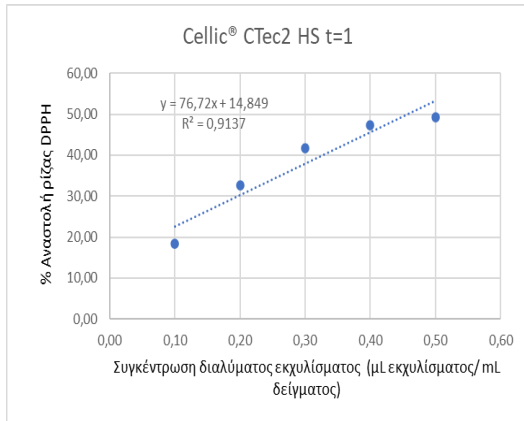
https://www.gijhsr.com/GIJHSR_Vol.2_Issue.4_Dec2017/1.pdf (ERKIN, 2017)

7. Παράρτημα

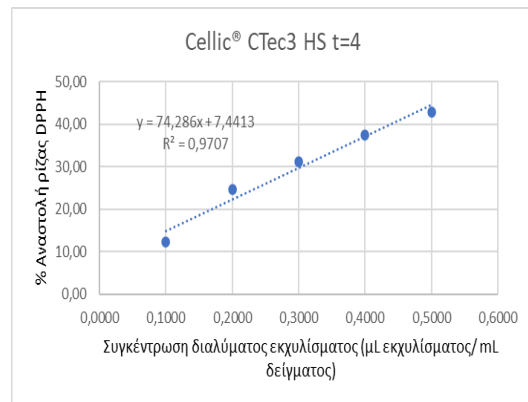
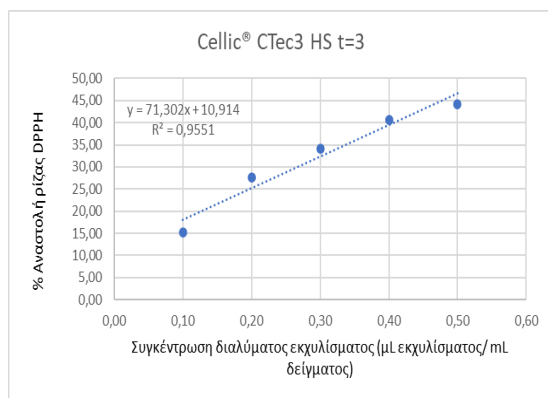
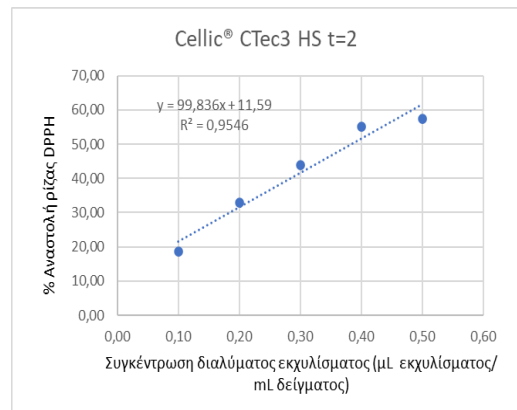
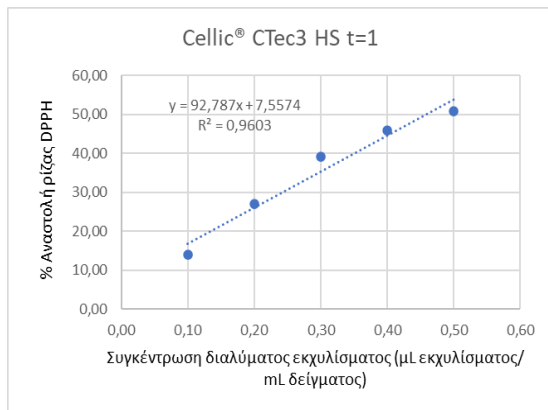
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναστολή της ρίζας του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος για τρία διαφορετικά ποσοστά συν-διαλύτη (H_2O) 20, 35 και 50% v/v στο NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 για τα ενζυμικά σκευάσματα Cellic® CTec3 HS, Cellic® CTec2 HS, Pectinex® Ultra Color, Neutrase® και Viscoferm®, στους 40°C και για χρόνους δειγματοληψίας 1, 2, 3, 4 ώρες. Στο ποσοστό συν-διαλύτη 20% αντιστοιχούν τα Διαγράμματα 1-6, στο ποσοστό συν-διαλύτη 35% αντιστοιχούν τα Διαγράμματα 7-12 και στο ποσοστό συν-διαλύτη 35% αντιστοιχούν τα Διαγράμματα 13-18.



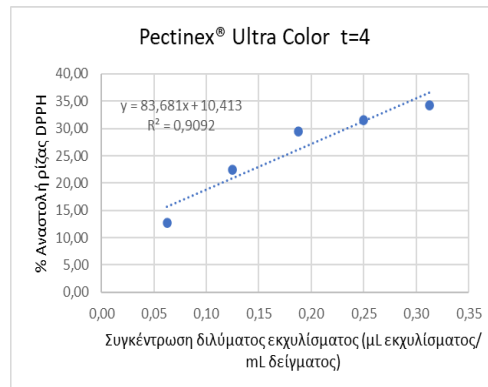
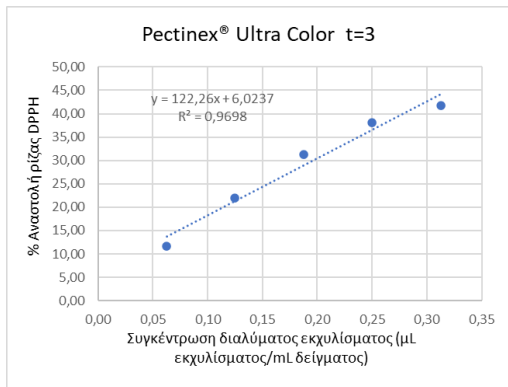
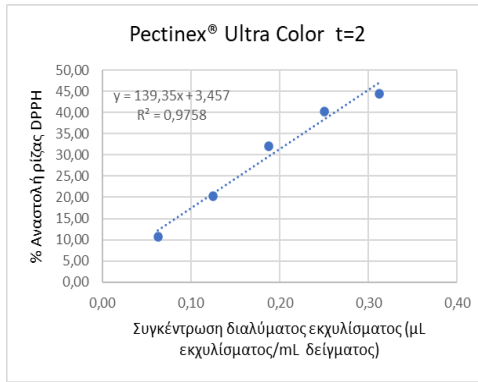
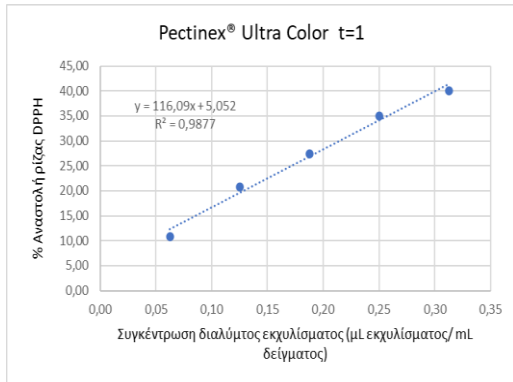
Διάγραμμα 20. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το εκχύλισμα απουσία ενζύμου (control) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H_2O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας $t=1,2,3,4$ h.



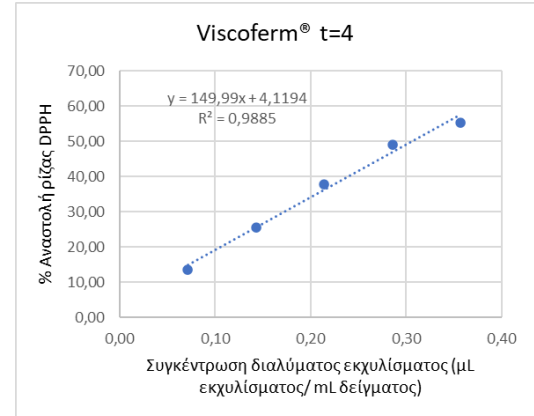
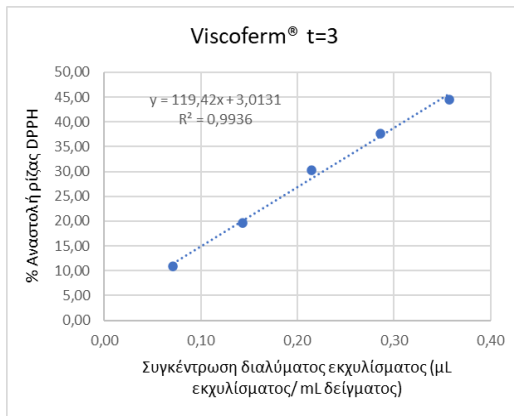
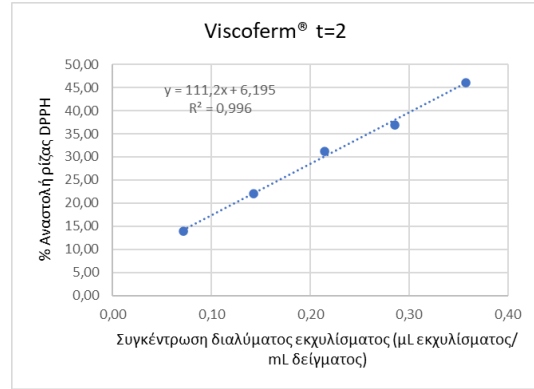
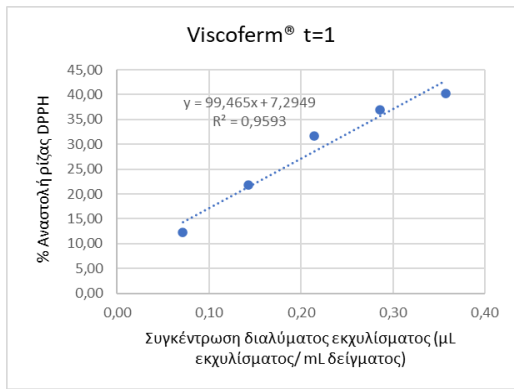
Διάγραμμα 21. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h.



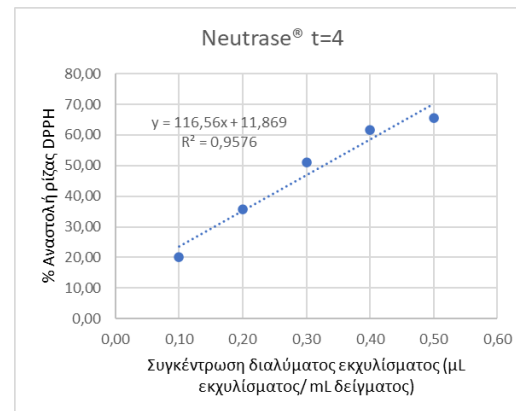
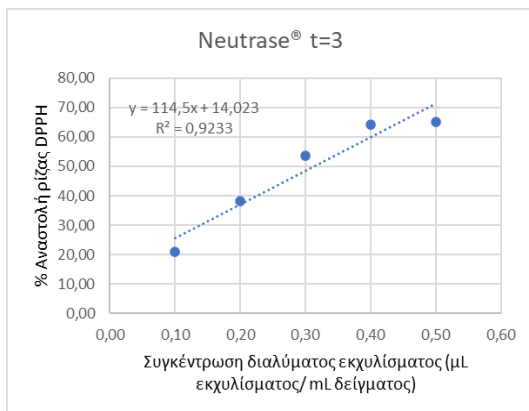
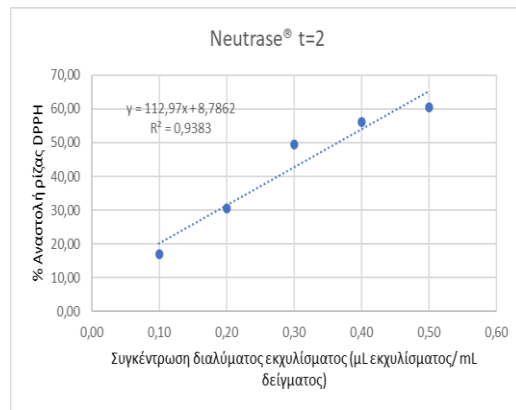
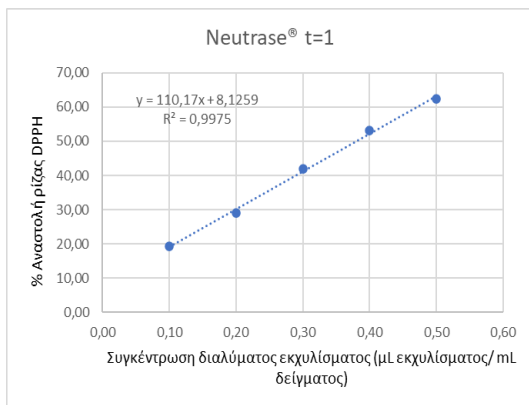
Διάγραμμα 22. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h.



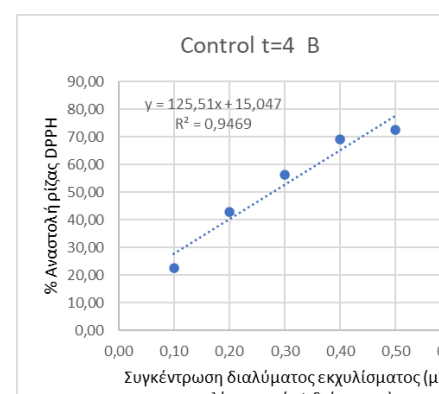
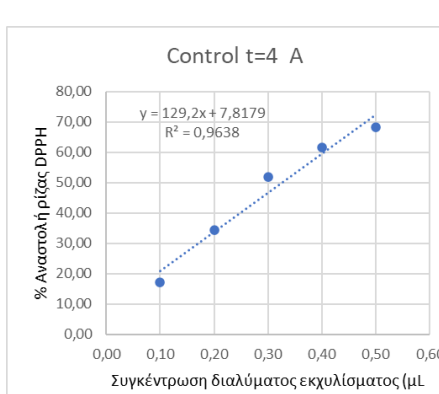
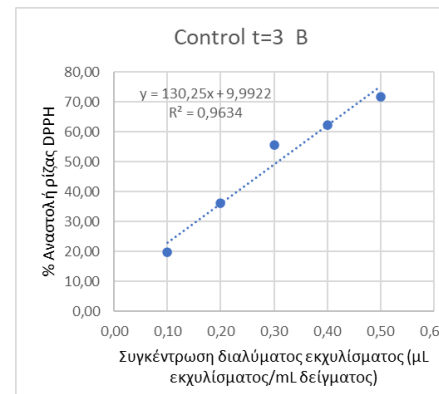
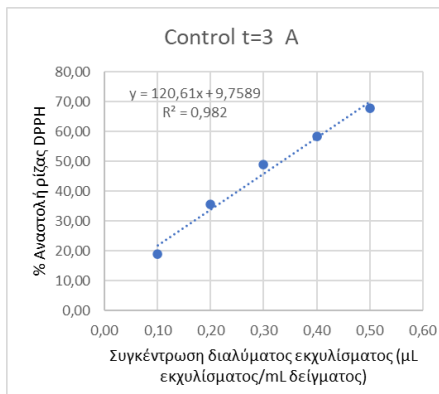
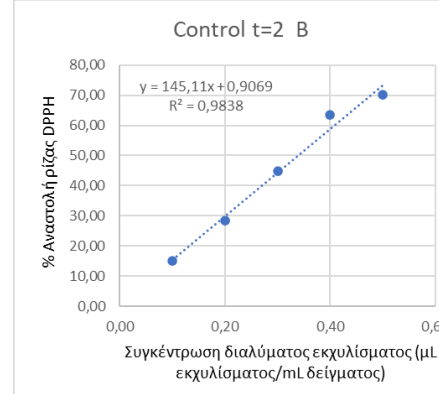
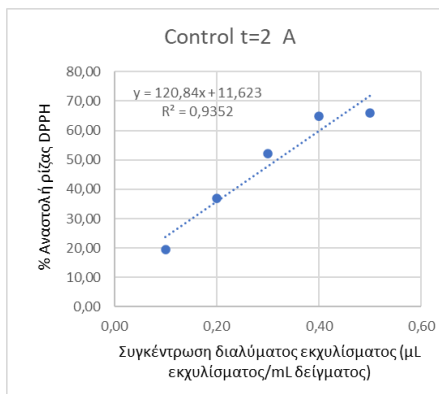
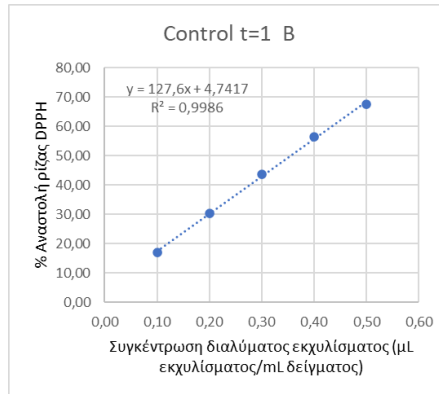
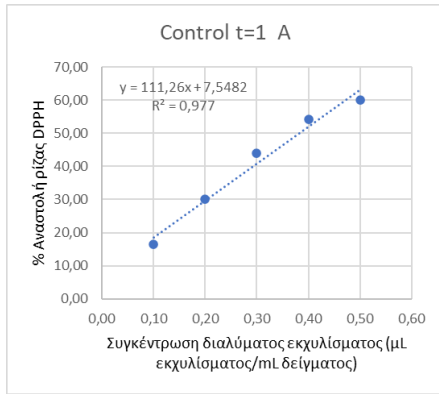
Διάγραμμα 23. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Pectinex® Ultra Color συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h.



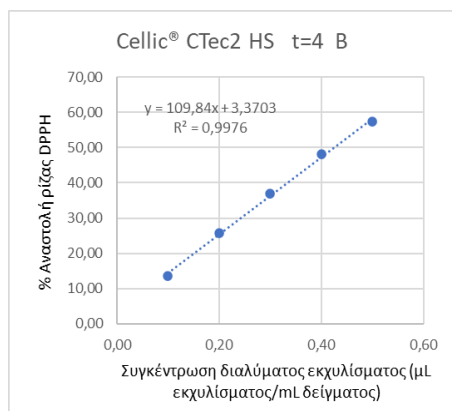
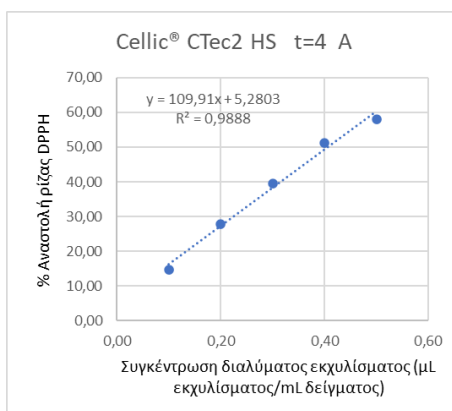
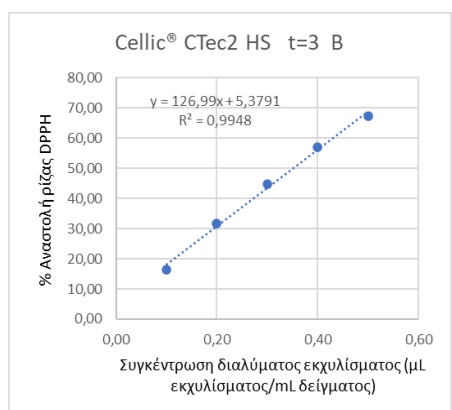
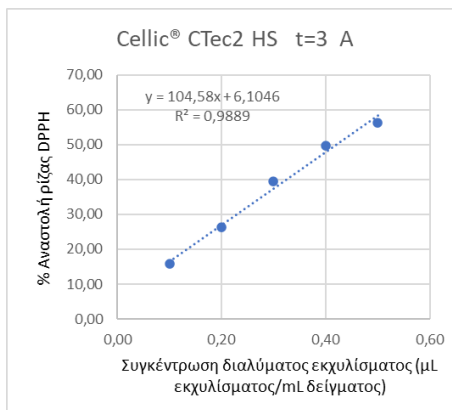
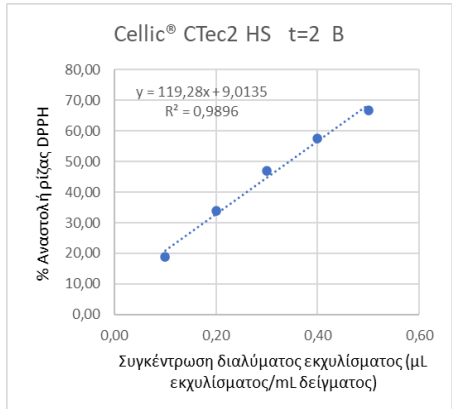
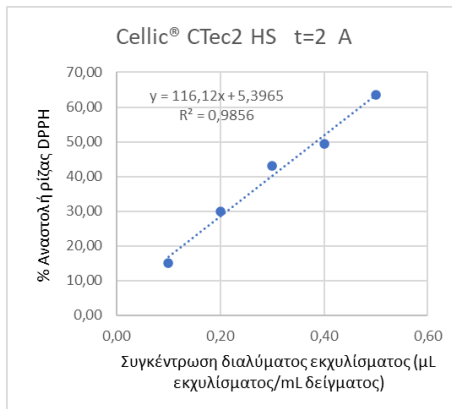
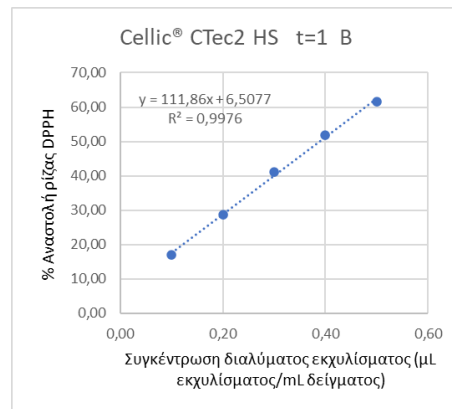
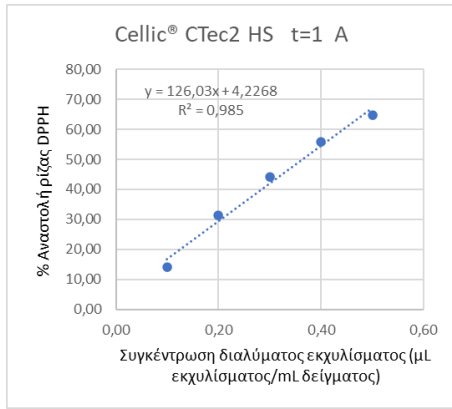
Διάγραμμα 24. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h.



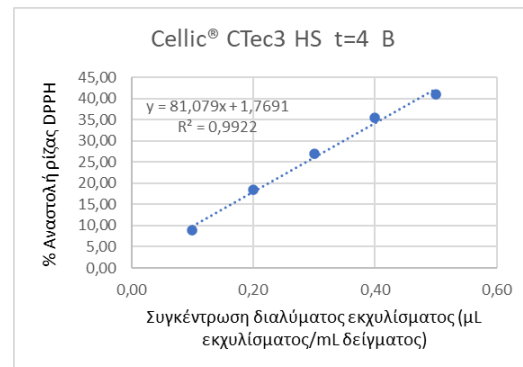
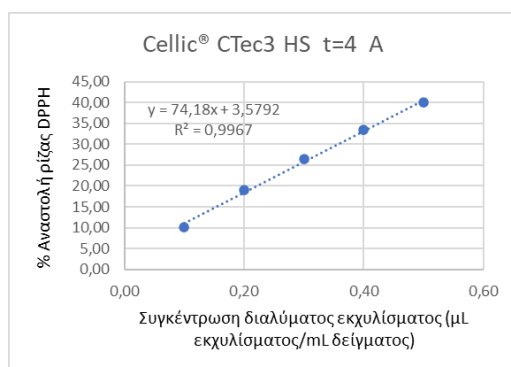
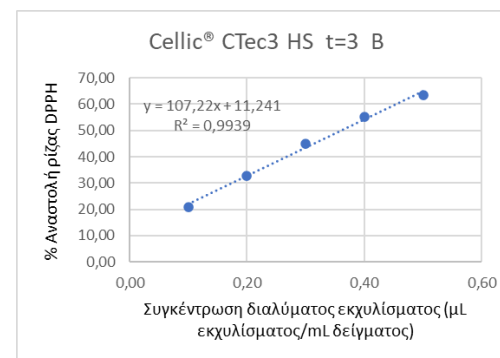
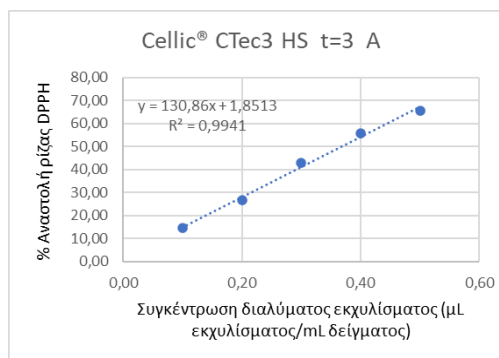
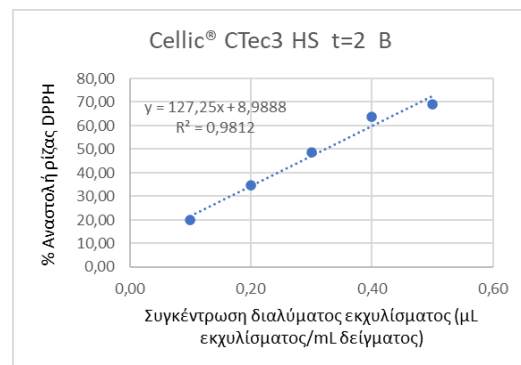
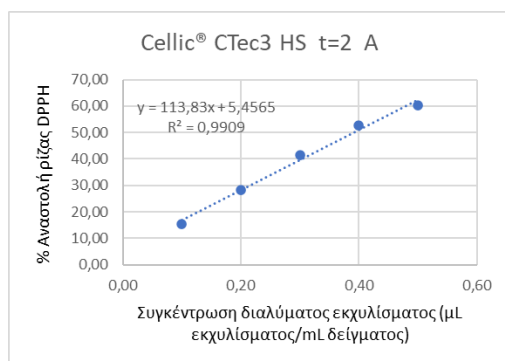
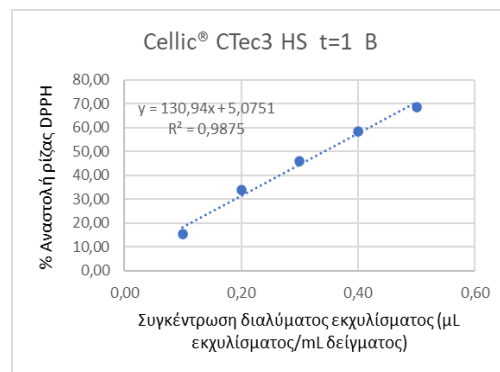
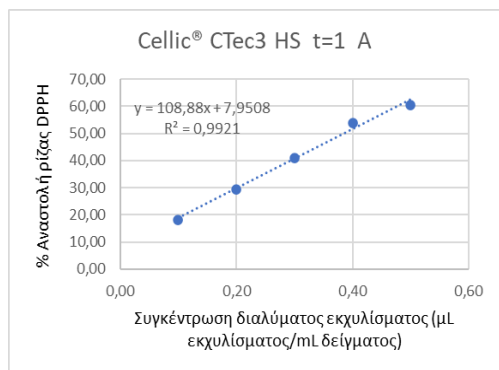
Διάγραμμα 25. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 20% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h.



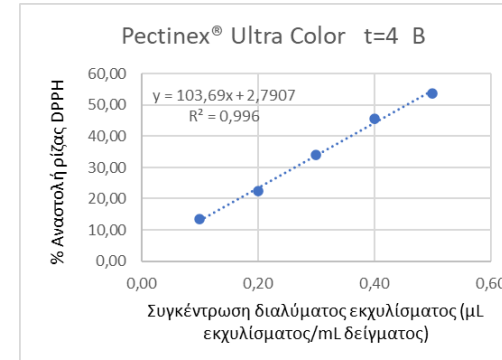
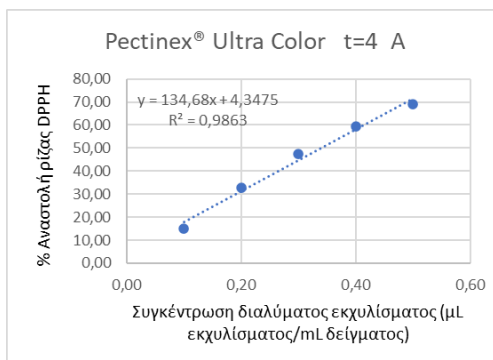
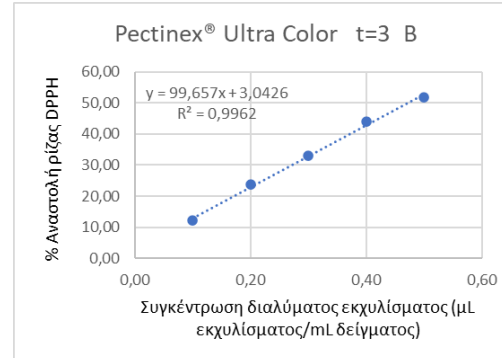
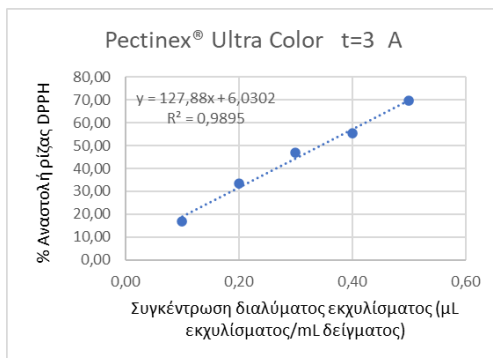
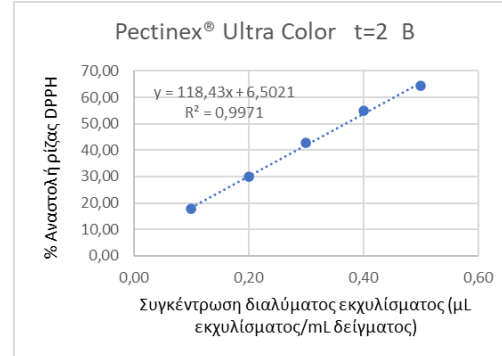
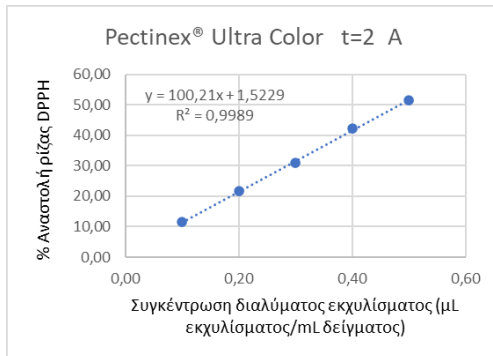
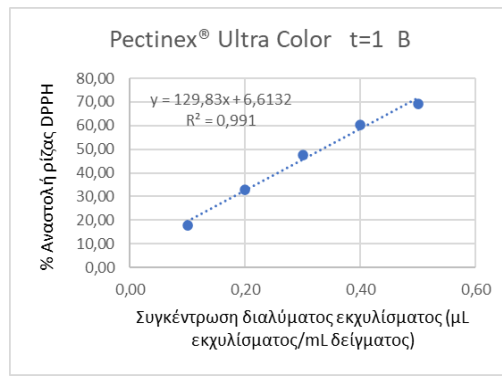
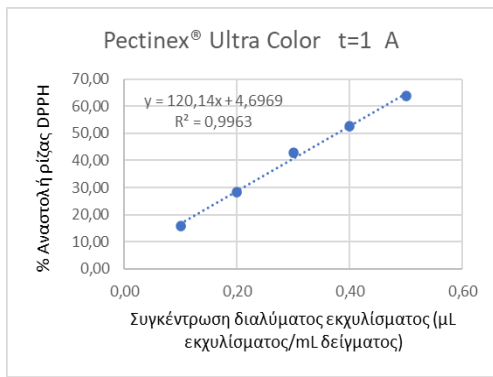
Διάγραμμα 26. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το εκχύλισμα απουσία ενζύμου (control) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H_2O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



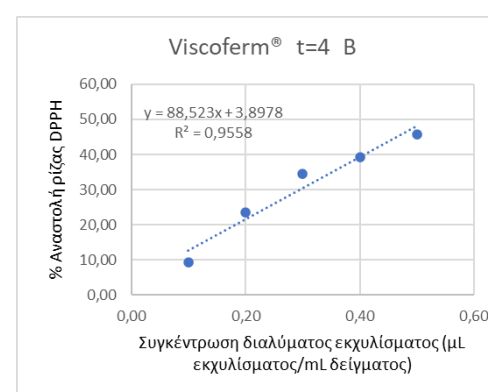
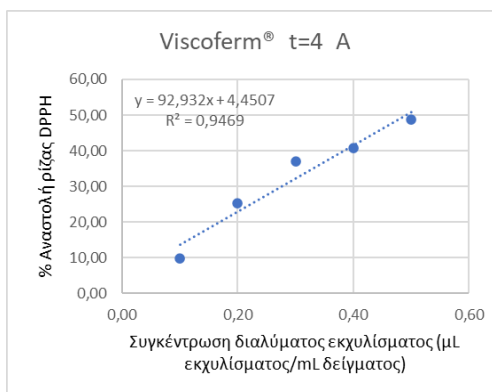
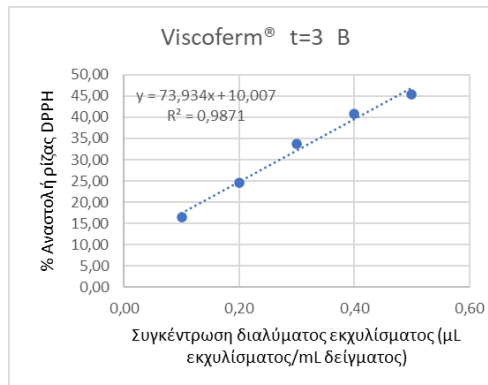
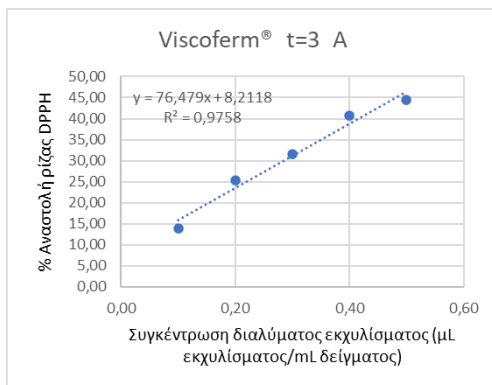
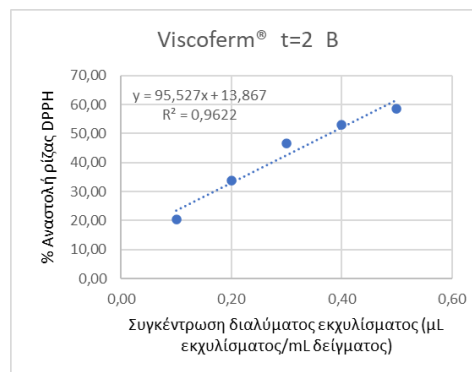
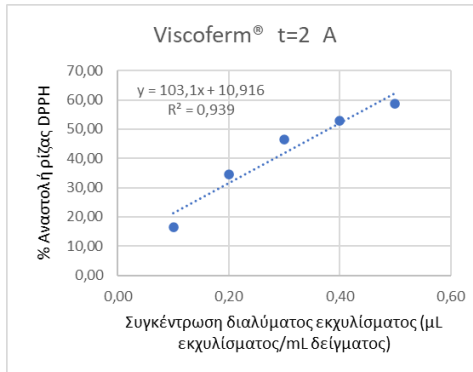
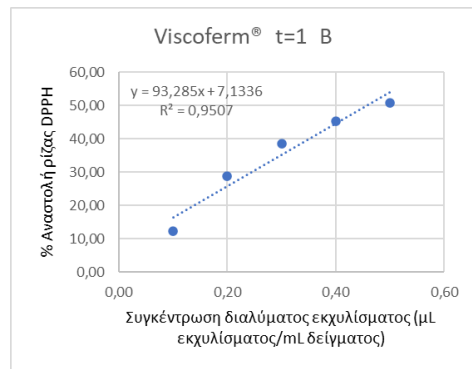
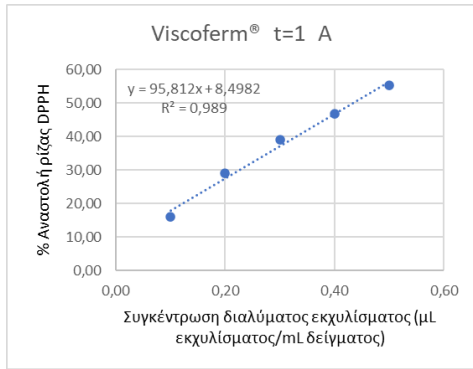
Διάγραμμα 27. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



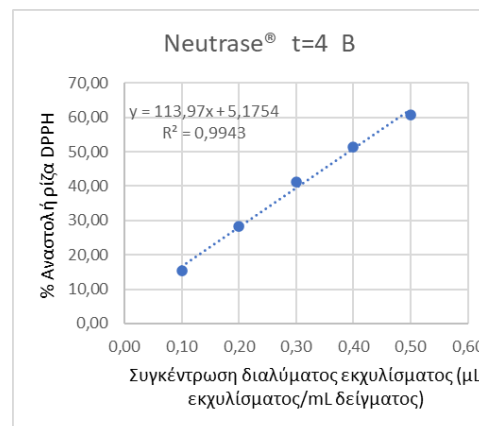
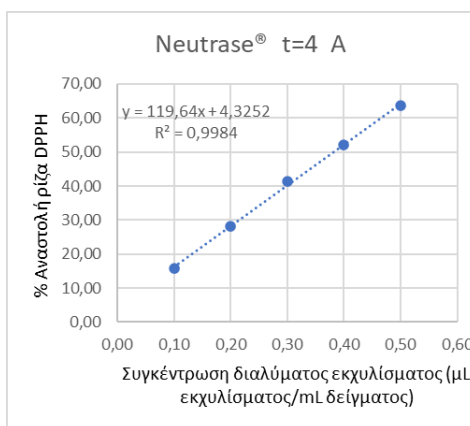
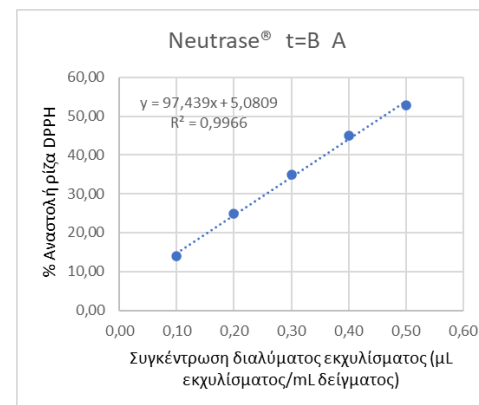
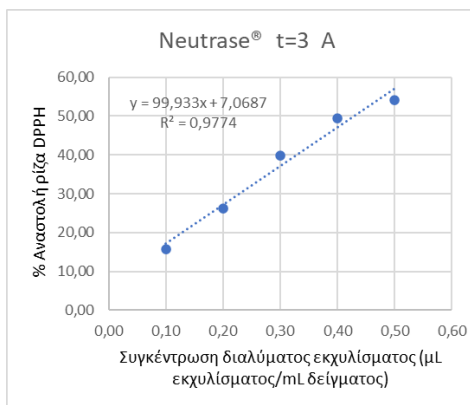
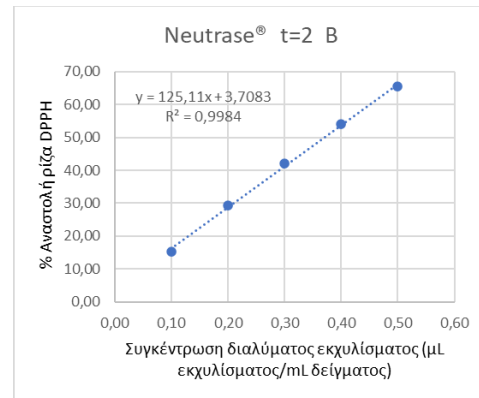
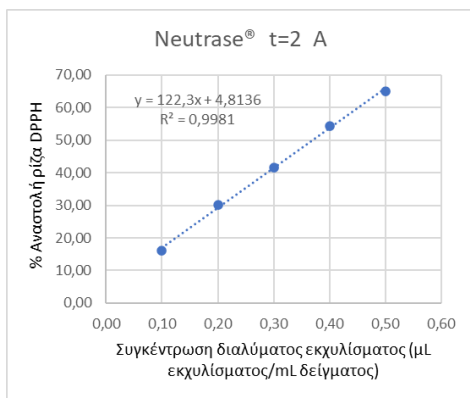
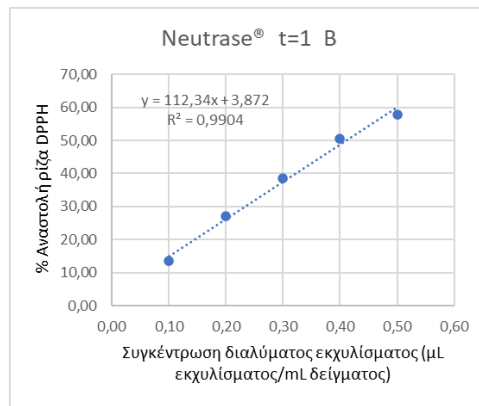
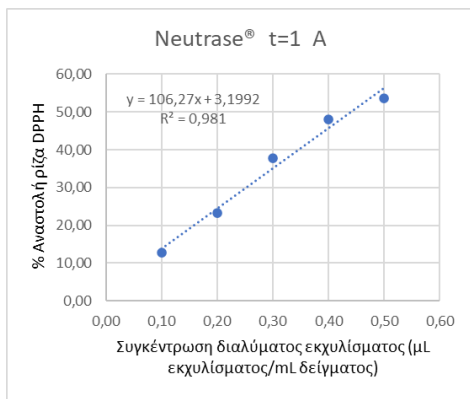
Διάγραμμα 28. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec3 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



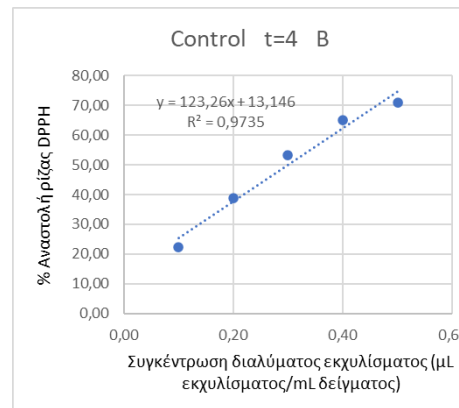
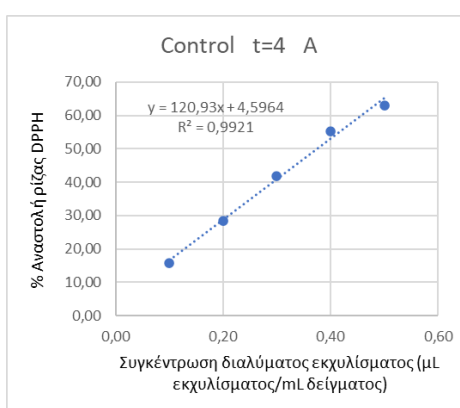
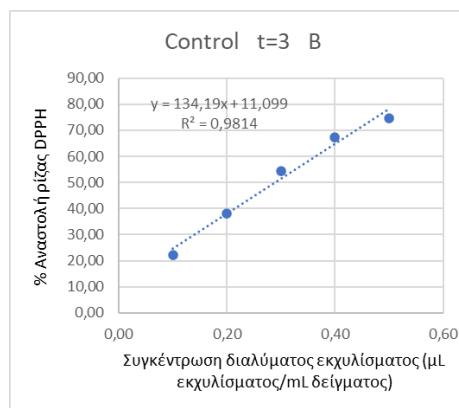
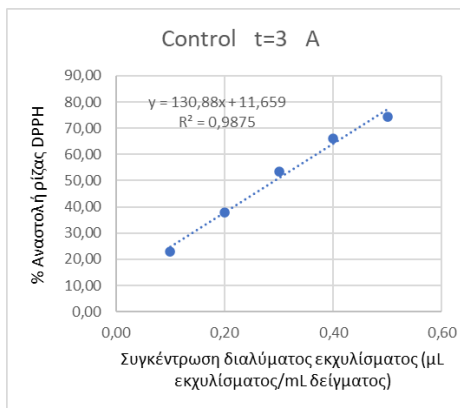
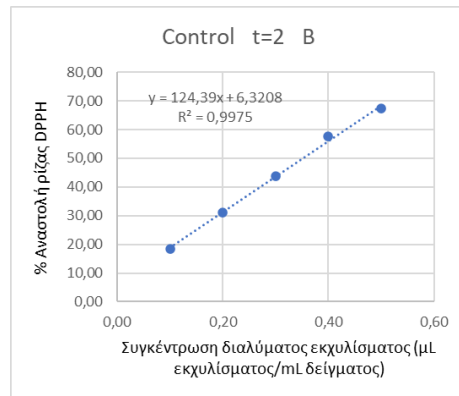
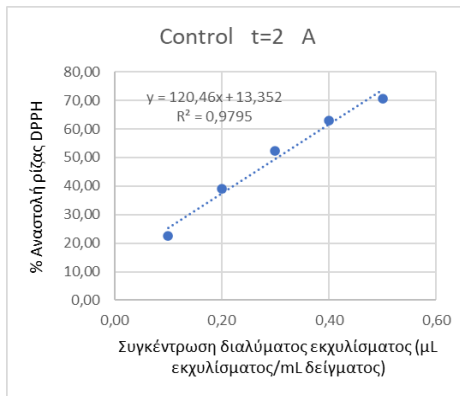
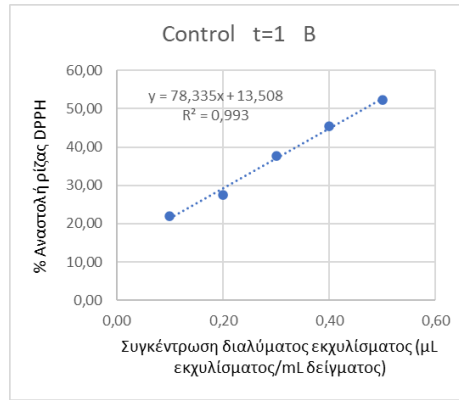
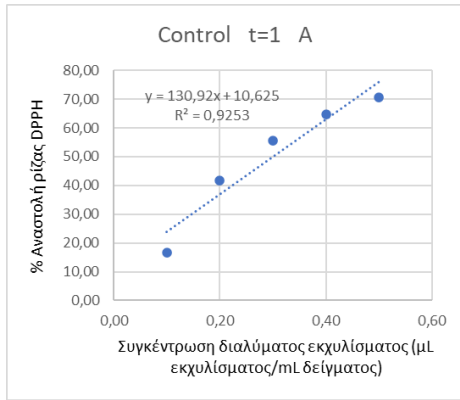
Διάγραμμα 29. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Pectinex® Ultra Color συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



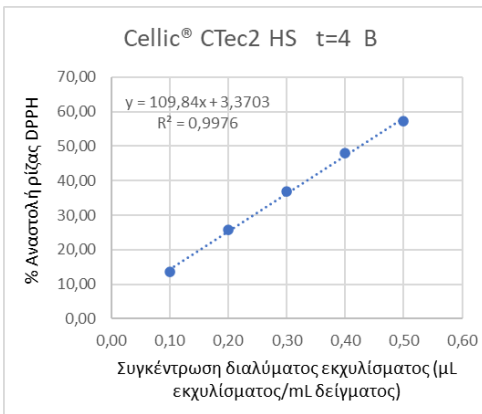
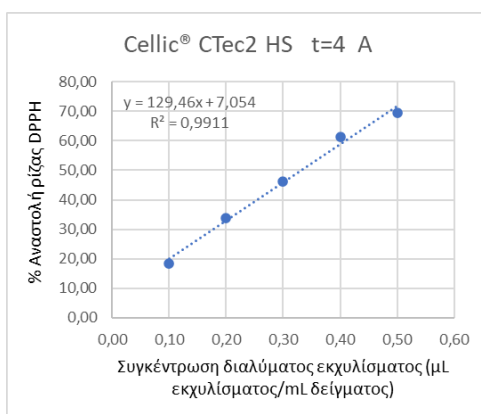
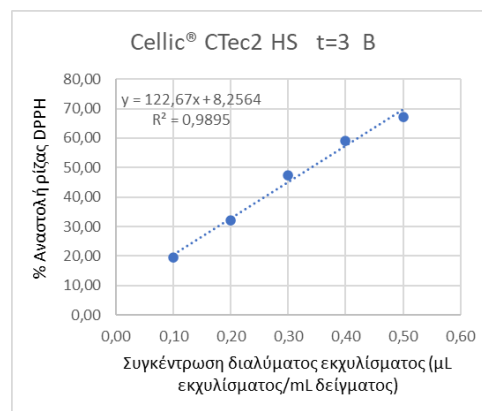
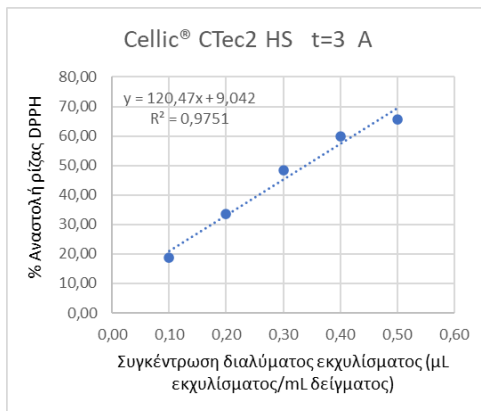
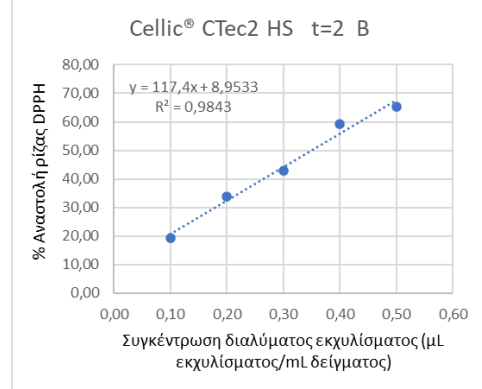
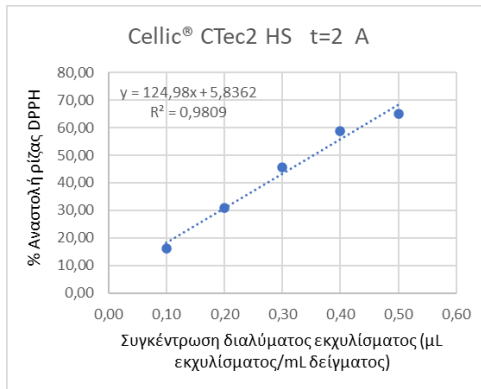
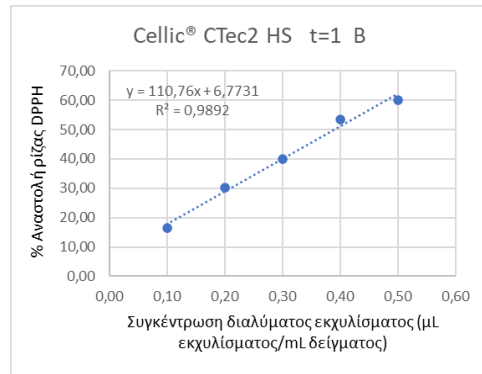
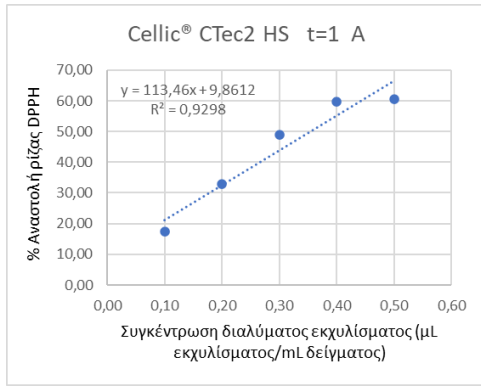
Διάγραμμα 30. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



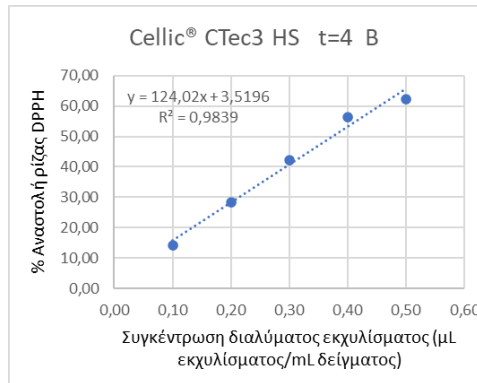
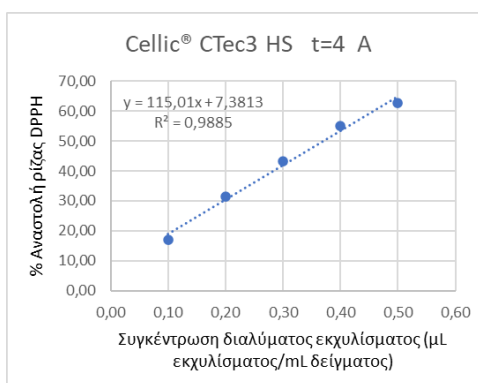
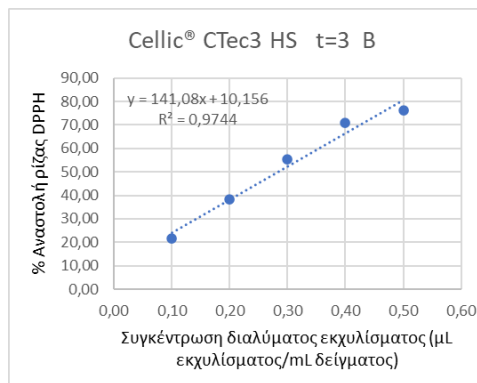
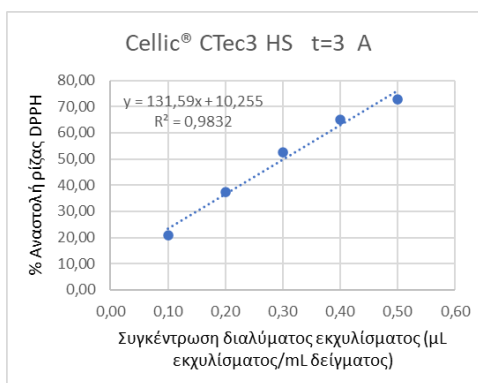
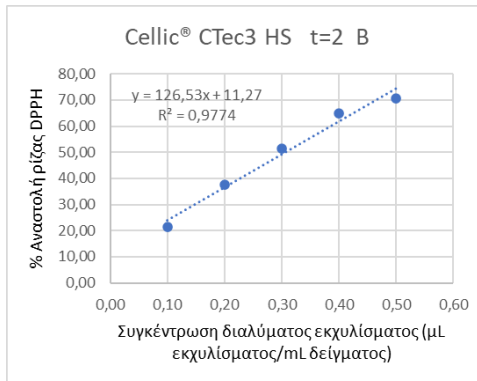
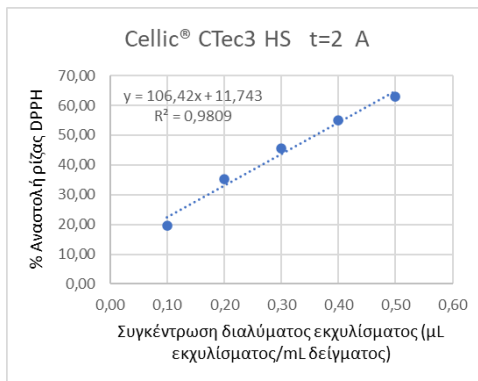
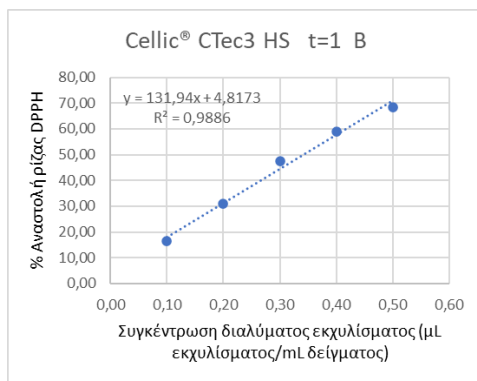
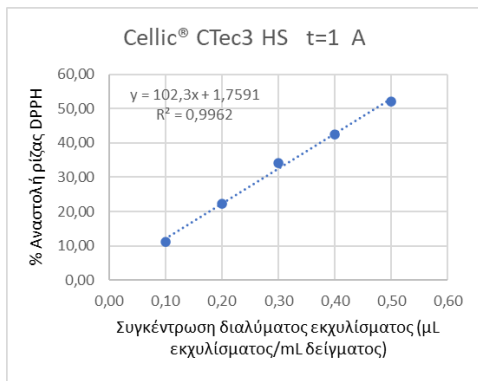
Διάγραμμα 31. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζα DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 35% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



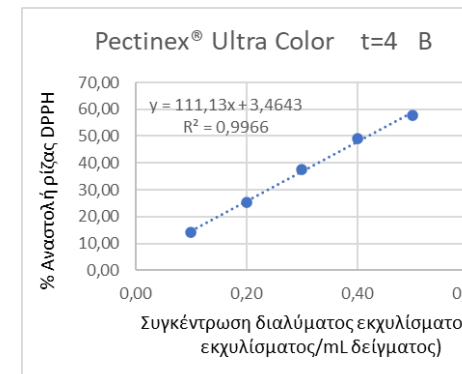
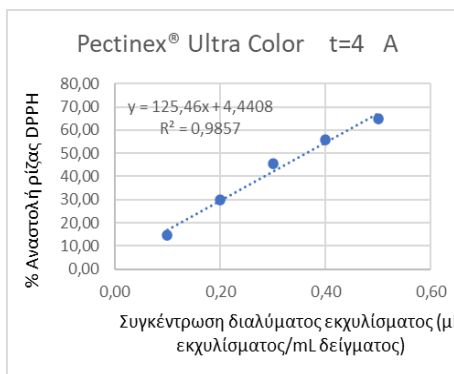
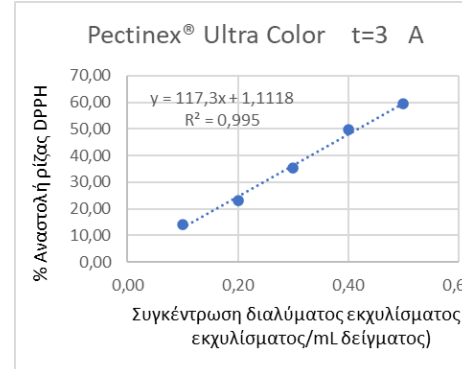
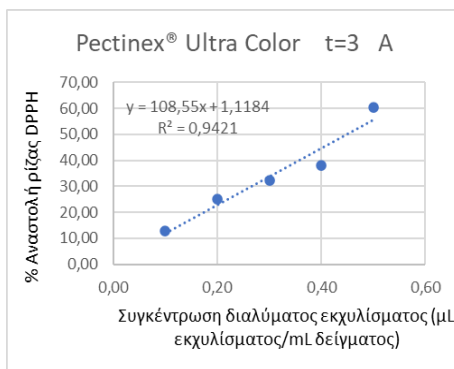
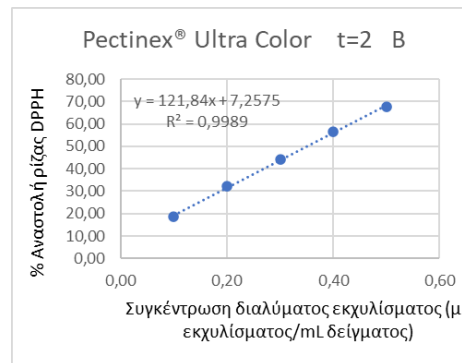
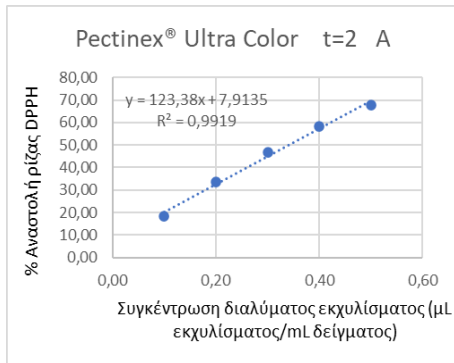
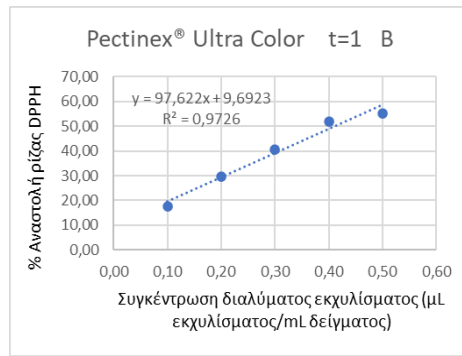
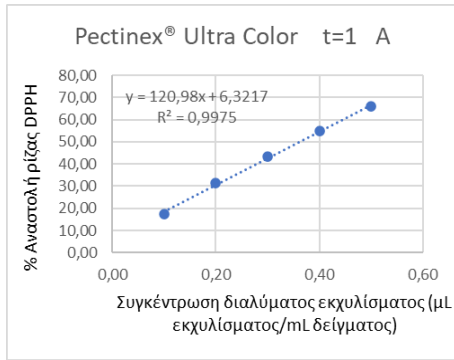
Διάγραμμα 32. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το εκχύλισμα απουσία ενζύμου (control) συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H_2O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



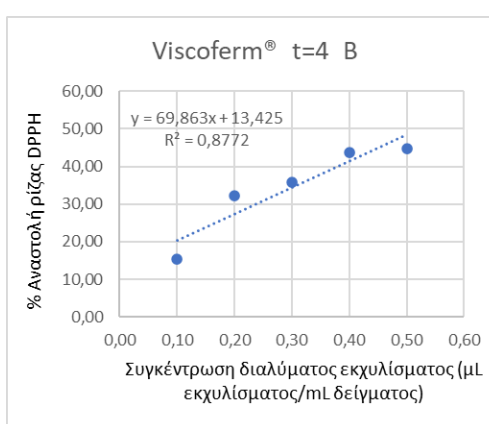
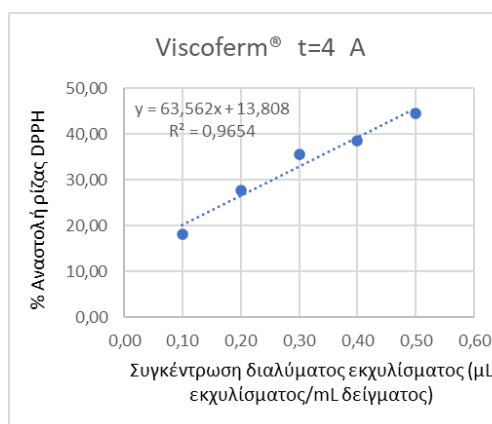
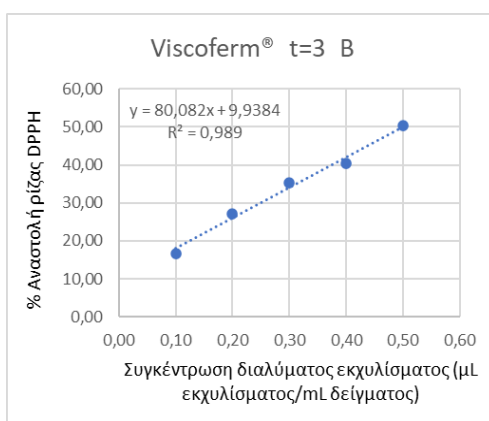
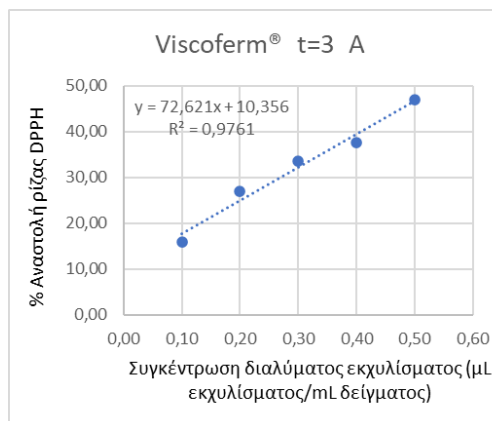
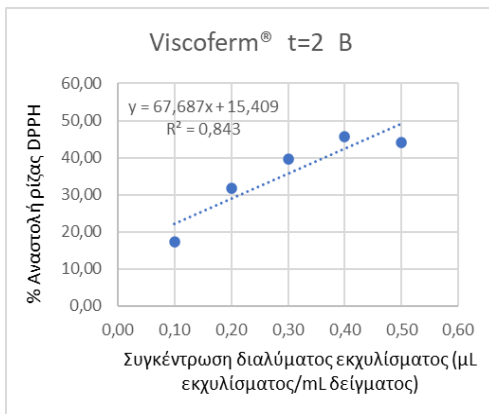
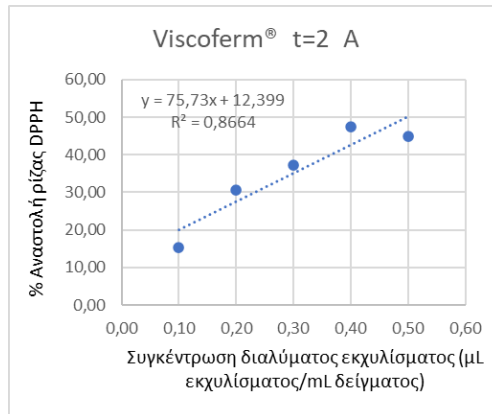
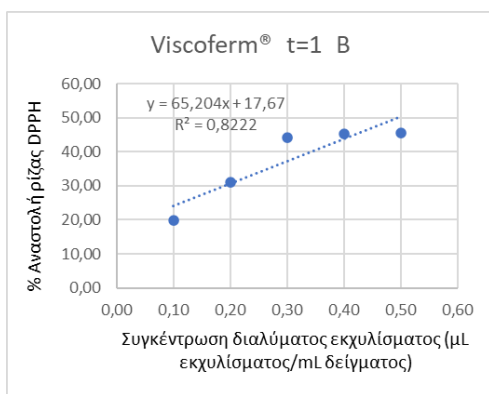
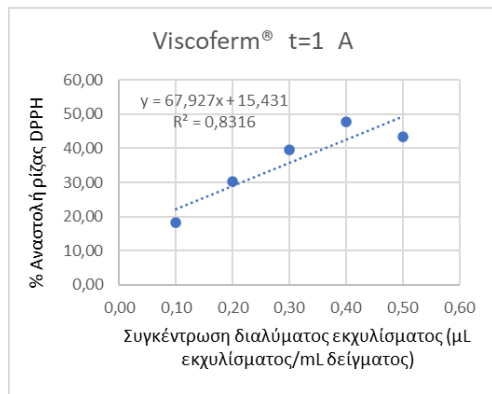
Διάγραμμα 33. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



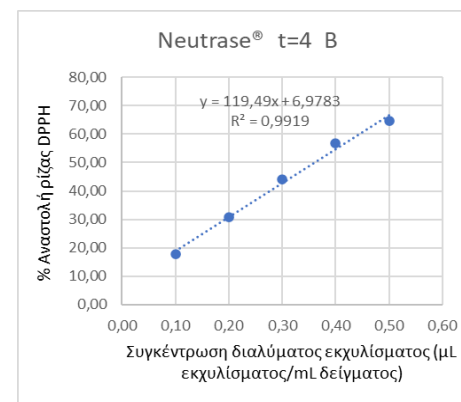
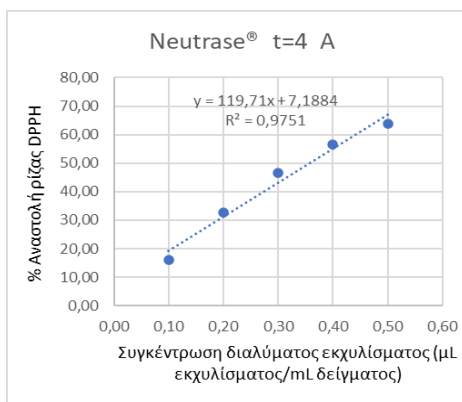
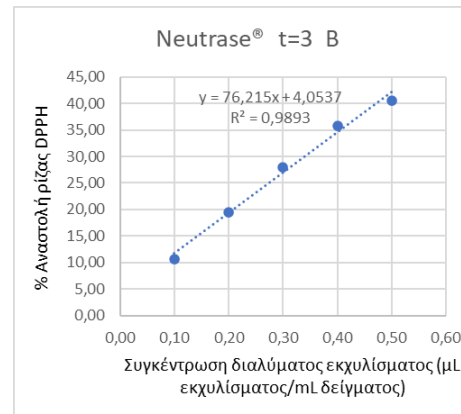
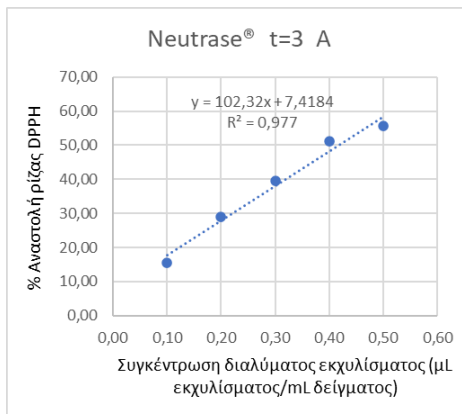
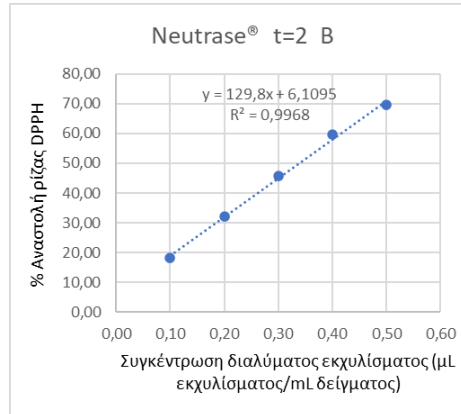
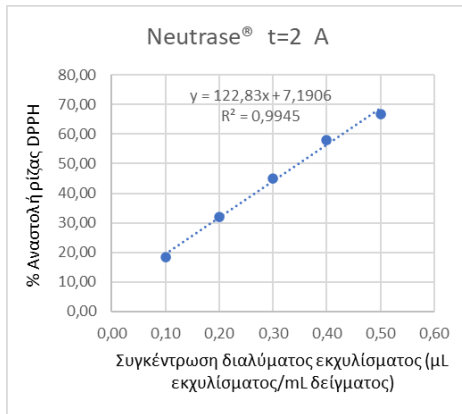
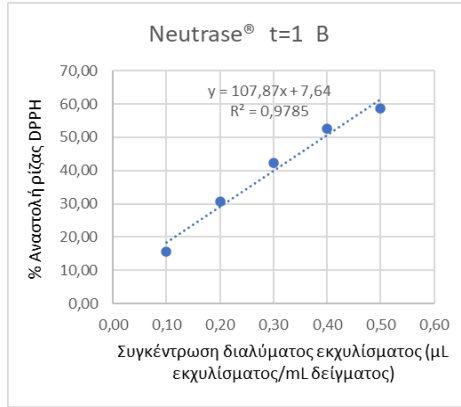
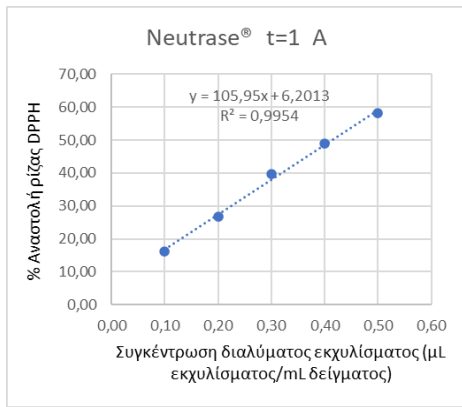
Διάγραμμα 34. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Cellic® CTec2 HS συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



Διάγραμμα 35. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Pectinex® Ultra Color συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλυτή (H₂O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



Διάγραμμα 36. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Viscoferm® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλυτή (H₂O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).



Διάγραμμα 37. Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH για το ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 με προσθήκη συν-διαλύτη (H₂O) 50% v/v, στους 40°C, για σταθερή συγκέντρωση πρώτης ύλης *R. canina* L. 7.5% w/v, για σταθερό ενζυμικό φορτίο 1% v/v και για χρόνους δειγματοληψίας t=1,2,3,4 h, για δύο επαναλήψεις (A και B).