



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Υδρολυτικά ένζυμα σε φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς  
διαλύτες (NaDES): εφαρμογή στην εκχύλιση  
βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό του άγριου  
τριαντάφυλλου (*Rosa Canina L.*)*

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Ισμήνη-Μιχαέλα Παπαδημητροπούλου

*Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Διομή Μαμμά*

**Αθήνα 2024**

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2023-2024 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαμμά Διομής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια Διομή Μαμμά για την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας καθώς και για την καθοδήγηση και την υποστήριξή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Στυλιανή Καλαντζή και την υποψήφια διδάκτορα Ζαφειρία Λεμονή για την πολύτιμη βοήθεια και το χρόνο, που αφιέρωσαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Ακόμα, επιθυμώ να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας για την εξαιρετική συνεργασία και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία υπήρξε πάντα στήριγμα για εμένα και στην οποία οφείλω τη διαδρομή μου μέχρι και σήμερα.

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία περιλαμβάνει τη μελέτη της θερμικής σταθερότητας των υδρολυτικών ενζύμων σε Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) και τη μελέτη της Ενζυμικά Υποβοηθούμενης Εκχύλισης (EYE) βιοδραστικών ενώσεων από το περικάρπιο του καρπού της άγριου τριαντάφυλλο (*Rosa Canina L.*), με τη χρήση των διαλυτών αυτών.

Στα πλαίσια της Πράσινης Χημείας, η ερευνητική δραστηριότητα στρέφεται ολοένα και περισσότερο σε φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους, οι οποίες θα είναι σε θέση να καλύψουν τις ανάγκες της βιομηχανίας των φαρμάκων, των καλλυντικών και των τροφίμων μέσω της απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων από φυτά, όπως είναι το *Rosa Canina L.* Με γνώμονα την κατεύθυνση αυτή προτάθηκε από την επιστημονική κοινότητα η εφαρμογή της EYE σε NaDES, προκειμένου να δημιουργηθεί μία «πράσινη» και παράλληλα αποτελεσματικότερη διεργασία.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η μελέτη της θερμικής σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος Neutrase® της Novozymes στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C, σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, σε NaDES με φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό σε αναλογία 1:1:5, σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 με 20% w/w συν-διαλύτη νερό και σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη σε αναλογία 1:3 με 20% w/w συν-διαλύτη νερό και σε τρία ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού φωσφορικού με pH αντίστοιχα με των NaDES, δηλαδή 8, 7,5 και 7. Βάσει των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε θερμοδυναμική ανάλυση μέσω της οποίας προέκυψε ότι το ένζυμο παρέμενε σταθερότερο στους NaDES απ'ότι στα ρυθμιστικά διαλύματα. Συγκεκριμένα, ο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% w/w συν-διαλύτη νερό ήταν διαλύτης, στον οποίο το ένζυμο διατηρούνταν σταθερότερο.

Οι Ενζυμικά Υποβοηθούμενες Εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτες τους NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% w/w συν-διαλύτη νερό και το πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα Neutrase®. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση του ενζυμικού φορτίου ταυτόχρονα με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης. Τα ενζυμικά φορτία, που επιλέχθηκαν, ήταν 0,1, 0,5, 0,75 και 1 % v/v, ενώ πραγματοποιήθηκε και εκχύλιση μόνο παρουσία του κάθε διαλύτη, χωρίς ένζυμο. Οι χρόνοι εκχύλισης ήταν 1, 2, 3 και 4 h. Στο τέλος της διαδικασίας, τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και την αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Εφαρμόστηκε επίσης και στατιστικός έλεγχος των χαρακτηρισμών αυτών με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και με post-hoc analysis (Duncan Test). Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιγηραντική και η αντιδιαβητική δράση των εκχυλισμάτων, μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας για αναστολή της ενζυμικής δράσης της τυροσινάσης και της α-γλυκοζιδάσης αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων, η εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση για το TPC (153,15 mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης για ενζυμικό φορτίο 1,0 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h), ενώ η εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% w/w συν-διαλύτη νερό παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση για το TFC (69,74 mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης για ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h). Τα αποτελέσματα του στατιστικού

ελέγχου έδειξαν ότι και ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο είναι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες για τις εκχυλίσεις και με τους τρεις NaDES. Επίσης, τα εκχυλίσματα και των τριών NaDES εμφάνισαν αρκετά ικανοποιητική αναστολή της δράσης της τυροσινάσης και συγκεκριμένα, η εκχύλιση με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v τόσο για το NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) όσο και για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% w/w συν-διαλύτη νερό παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδόσεις (93% και 92% αντίστοιχα). Ικανοποιητική ήταν και η αναστολή της δράσης της α-γλυκοζιδάσης από τα εκχυλίσματα και των τριών NaDES, με αυτά του NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) να εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα από τους τρεις.

Βάσει της έρευνας που πραγματοποιήθηκε, οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES) πράγματι αποτελούν ένα μέσο, στο οποίο το ένζυμο παρουσιάζει υψηλή θερμική σταθερότητα. Επίσης, αποδεικνύεται ότι έχουν καλή εκχυλιστική δράση με αποτέλεσμα να είναι σε θέση, να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες στην Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το *Rosa Canina L.*

#### **Λέξεις-Κλειδιά:**

NaDES (Natural Deep Eutectic Solvents), Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (EYE), καρπός άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa Canina L.*), πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα, ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC), αντιοξειδωτική δράση, στατιστικός έλεγχος, δείκτης IC<sub>50</sub>, αναστολή ενζυμικής δράσης, τυροσινάση, α-γλυκοζιδάση

## Abstract

This thesis includes the study of the thermal stability of hydrolytic enzymes in Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) and the study of Enzyme-Assisted Extraction (EAE) of bioactive compounds from the rose hip shell of wild rose (*Rosa Canina L.*), with using these solvents.

In the context of Green Chemistry, research activity is increasingly directed towards environmentally friendly methods, which will be able to meet the needs of the pharmaceutical, cosmetics and food industries through the isolation of bioactive compounds from plants, such as *Rosa Canina L.* It is in this direction that the scientific community has proposed the application of EAE in NaDES, in order to create a “green” and more efficient process.

Initially, the thermal stability of the proteolytic commercial mixture Neutrase® from Novozymes was studied at temperatures of 30, 40, 50, 60 and 70 °C, in three different solvents, in NaDES with fructose:glycerol:water at a ratio of 1:1:5, in NaDES proline:glycerol at a ratio of 1:2 with 20% w/w co-solvent water and in NaDES betaine:glycerol at a ratio of 1:3 with 20% w/w co-solvent water and in three citrate-phosphate buffer solutions with pH corresponding to NaDES, i.e. 8, 7,5 and 7. Based on the results, thermodynamic analysis was carried out, through which it was found that enzyme remained more stable in NaDES than in the buffer solutions. Specifically, NaDES betaine:glycerol (1:3) with 20% co-solvent water was a solvent, in which the enzyme remained more stable.

Enzyme-assisted extractions were performed using NaDES fructose:glycerol:water (1:1:5), proline:glycerol (1:2) with 20% co-solvent water and betaine:glycerol (1:3) with 20% w/w co-solvent water as solvents and the proteolytic commercial mixture Neutrase®. In particular, the effect of enzyme load was examined simultaneously with the effect of extraction time. The enzyme load chosen were 0,1, 0,5, 0,75 and 1 % v/v, and extraction was performed only in the presence of each solvent, without enzyme. The extraction times were 1, 2, 3 και 4 h. At the end of the procedure, the extracts were characterized in terms of total phenolic content (TPC) with the Folin-Ciocalteu method, total flavonoid content (TFC) with the aluminum chloride colorimetric method and antioxidant activity by determining the DPPH radical scavenging capacity. Statistical control of these characterizations by analysis of variance (ANOVA) and post-hoc analysis (Duncan Test) were also applied. In addition, the anti-aging and anti-diabetic activity of the extracts was studied, by determining the ability to inhibit the enzymatic activity of tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase respectively.

According to the results of the extractions, extraction with NaDES fructose:glycerol:water (1:1:5) showed the highest yield for TPC (153,15 mg gallic acid/g of raw material for an enzyme load of 1% v/v and an extraction time of 3 h), while extraction with NaDES betaine:glycerol (1:3) with 20% w/w co-solvent water showed the highest yield for TFC (69,74 mg catechin/ g raw material for an enzyme load of 0,5 % v/v and extraction time of 4 h). The results of the statistical test showed that both extraction time and enzyme load are statistically significant factors for the extractions with all three NaDES. Also, the extracts of all three NaDES showed quite satisfactory inhibition of tyrosinase activity and in particular, extraction with an enzyme load of 1% v/v for both NaDES fructose:glycerol:water (1:1:5) and

NaDES betaine:glycerol (1:3) with 20% w/w co-solvent water showed the highest yields (93% and 92% respectively). The inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by the extracts of all three NaDES was also satisfactory, with those of NaDES fructose:glycerol:water (1:1:5) showing the best results of the three.

Based on the research carried out, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) are indeed a medium in which the enzyme exhibits high thermal stability. It is also shown that they have good extractive activity, so that they are able to be used as solvents in the Enzyme-Assisted Extraction of bioactive compounds from *Rosa Canina L.*

**Keywords:**

NaDES (Natural Deep Eutectic Solvents), Enzyme-Assisted Extraction (EAE), rose hip of wild rose (*Rosa Canina L.*), proteolytic commercial mixture, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), antioxidant activity, statistical control, IC<sub>50</sub> index, enzyme inhibition, tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase

## Περιεχόμενα

1	Θεωρητικό Μέρος .....	1
1.1	Φυσικά Προϊόντα.....	1
1.1.1	Πρωτογενείς Μεταβολίτες .....	1
1.1.2	Δευτερογενείς Μεταβολίτες .....	1
1.2	<i>Rosa Canina L.</i> .....	3
1.2.1	Ιστορική Σημασία .....	4
1.2.2	Χαρακτηριστικά και Μορφολογία.....	4
1.2.3	Φυτοχημικό προφίλ.....	4
1.2.4	Φαρμακευτικές Ιδιότητες-Εφαρμογές .....	5
1.3	Εκχύλιση.....	7
1.3.1	Συμβατικές εκχυλίσεις .....	8
1.3.2	Μη συμβατικές εκχυλίσεις .....	9
1.4	Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση.....	11
1.4.1	Βασική αρχή της ΕΥΕ .....	11
1.4.2	Στάδια της ΕΥΕ .....	11
1.4.3	Πλεονεκτήματα.....	12
1.4.4	Κυτταρικό τοίχωμα .....	12
1.4.5	Υδρολυτικά ένζυμα .....	15
1.4.6	Παράγοντες που επηρεάζουν την ΕΥΕ.....	18
1.4.7	Εφαρμογές ΕΥΕ .....	21
1.5	NaDES .....	23
1.5.1	Ιστορική αναδρομή.....	23
1.5.2	Δομή και κατηγορίες .....	23
1.5.3	Ιδιότητες .....	24
1.5.4	Εφαρμογές .....	25
1.6	ΕΥΕ και NaDES .....	27
2	Υλικά και Μέθοδοι.....	29
2.1	Ενζυμικό σκεύασμα, πρώτη ύλη, αντιδραστήρια και όργανα/συσκευές .....	29
2.2	Πειραματική διαδικασία.....	30
2.2.1	Μελέτη σταθερότητας ενζύμου σε NaDES .....	30
2.2.2	Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε NaDES.....	31
3	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	38
3.1	Θερμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) και θερμοδυναμική ανάλυση.....	38

3.1.1	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	40
3.1.2	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) και 20% συν-διαλύτη νερό.....	42
3.1.3	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	45
3.1.4	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.....	47
3.1.5	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.....	49
3.1.6	Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.....	52
3.1.7	Σύγκριση σταθερότητα του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES και ρυθμιστικό διάλυμα .....	54
3.2	Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε NaDES.....	63
3.2.1	Εκχυλίσσεις σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	63
3.2.2	Εκχυλίσσεις σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό	65
3.2.3	Εκχυλίσσεις σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό	67
3.2.4	Σύγκριση αποτελεσμάτων εκχυλίσεων σε NaDES .....	69
3.3	Αναστολή της δράσης των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση .....	70
3.3.1	Αναστολή ενζυμικής δράσης της τυροσινάσης.....	70
3.3.2	Αναστολή ενζυμικής δράσης της α-γλυκοζιδάσης.....	72
4	Συμπεράσματα.....	74
5	Προοπτικές για έρευνα .....	76
6	Βιβλιογραφία.....	77
7	Παράρτημα .....	86



## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Σύσταση, ενεργότητα και βέλτιστες συνθήκες χρήσης του ενζυμικού σκευάσματος Neutrase®.....	29
Πίνακας 2: Κατάλογος αντιδραστηρίων.....	29
Πίνακας 3: Κατάλογος οργάνων και συσκευών .....	30
Πίνακας 4: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	40
Πίνακας 5: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό(1:1:5) για το θερμοκρασιακό εύρος 50-70 °C .....	41
Πίνακας 6: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) για 50 °C, 60 °C και 70 °C.....	42
Πίνακας 7: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλυτή νερό.....	43
Πίνακας 8: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλυτή νερό .....	44
Πίνακας 9: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλυτή νερό για 50 °C, 60 °C και 70 °C.....	44
Πίνακας 10: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλυτή νερό.....	46
Πίνακας 11: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλυτή νερό .....	46
Πίνακας 12: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλυτή νερό για 50 °C, 60 °C και 70 °C.....	47
Πίνακας 13: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.....	48
Πίνακας 14: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.....	49
Πίνακας 15: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8 για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C .....	49
Πίνακας 16: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.....	50
Πίνακας 17: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 .....	51
Πίνακας 18: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C.....	51
Πίνακας 19: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης $k_d$ , χρόνοι ημιζωής $t_{1/2}$ και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού $D$ του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.....	53
Πίνακας 20: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.....	53
Πίνακας 21: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 για για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C.....	54
Πίνακας 22: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	63
Πίνακας 23: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	64
Πίνακας 24: Δείκτης $IC_{50}$ ( $\mu$ L εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	64

Πίνακας 25: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	65
Πίνακας 26: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	66
Πίνακας 27: Δείκτης IC <sub>50</sub> (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	66
Πίνακας 28: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	67
Πίνακας 29: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	67
Πίνακας 30: Δείκτης IC <sub>50</sub> (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	68
Πίνακας 31: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5).....	70
Πίνακας 32: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% νερό (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	71
Πίνακας 33: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	71
Πίνακας 34: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) .....	72
Πίνακας 35: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	72
Πίνακας 36: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό .....	72

## Ευρετήριο Εικόνων

<i>Εικόνα 1: Βασικοί πρωτογενείς μεταβολίτες (Χαμηλάκης, 2022) .....</i>	1
<i>Εικόνα 2: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Khatri et al., 2019).....</i>	2
<i>Εικόνα 3: Το άνθος (αριστερά) και ο καρπός (δεξιά) του Rosa Canina .....</i>	4
<i>Εικόνα 4: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) .....</i>	11
<i>Εικόνα 5: Δομή και σύνθεση (i) πρωτοταγούς και (ii) δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος (Loix et al., 2017) .....</i>	13
<i>Εικόνα 6: Αναπαράσταση του μορίου της (Heinze, 2015) .....</i>	14
<i>Εικόνα 7: Η ημικυτταρίνη και οι διάφορες κοινές δομές της με βάση τα σάκχαρα (Lu et al., 2021) .....</i>	14
<i>Εικόνα 8: Η δράση των κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, πηκτινασών και των πρωτεασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, πηκτίνης και πρωτεΐνης αντίστοιχα, με στόχο την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών και την απελευθέρωση πολυφαινολικών ενώσεων (Gligor et al., 2019; Nadal et al., 2018; Giannopoulou et al., 2020).....</i>	18
<i>Εικόνα 9: Γενική αντίδραση οξειδοαναγωγής στη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Pérez et al., 2023) .....</i>	32
<i>Εικόνα 10: Συμπλοκοποίηση Al(III)-φλαβονοειδών παρουσία NaNO<sub>2</sub> (Shraim et al., 2021) ..</i>	34
<i>Εικόνα 11: Μεταβολή της χημικής δομής και του χρώματος του DPPH παρουσία αντιοξειδωτικού (Munteanu &amp; Apetrei, 2021) .....</i>	35

## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5). Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	40
Διάγραμμα 2: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) για το θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C.....	41
Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	42
Διάγραμμα 4: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ του ενζύμου για το NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό για το θερμοκρασιακό εύρος 50 °C έως 70 °C.....	44
Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	45
Διάγραμμα 6: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό για το θερμοκρασιακό εύρος από 50 °C έως 70 °C.....	46
Διάγραμμα 7: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	47
Διάγραμμα 8: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8, για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C.....	48
Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5. Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	50
Διάγραμμα 10: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C.....	51
Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Το $\blacklozenge$ αντιστοιχεί στους 30 °C, το $\blacksquare$ στους 40 °C, το $\blacktriangle$ στους 50 °C, το $\blacksquare$ στους 60 °C και το $\blacksquare$ στους 70 °C. ....	52
Διάγραμμα 12: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης $E_d$ του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C.....	53
Διάγραμμα 13: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\Delta H^*$ και $\Delta G^*$ του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8... 56	56

Διάγραμμα 14: Γραφική απεικόνιση της θερμοδυναμικής παραμέτρου $\Delta S^*$ του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.....	56
Διάγραμμα 15: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\Delta H^*$ και $\Delta G^*$ του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.....	57
Διάγραμμα 16: Γραφική απεικόνιση της θερμοδυναμικής παραμέτρου $\Delta S^*$ του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.....	58
Διάγραμμα 17: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\Delta H^*$ και $\Delta G^*$ του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.....	59
Διάγραμμα 18: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\Delta S^*$ του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.....	59
Διάγραμμα 19: Γραφική απεικόνιση του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) του ενζύμου στους τρεις NaDES.....	60
Διάγραμμα 20: Γραφική απεικόνιση της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου στους τρεις NaDES.....	61
Διάγραμμα 21: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\Delta H^*$ και $\Delta G^*$ του ενζύμου στους τρεις NaDES.....	61

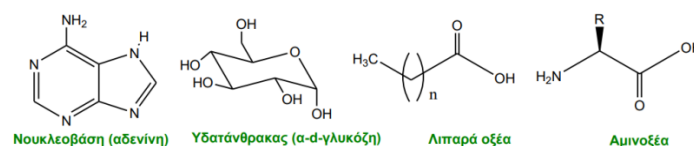
# 1 Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Φυσικά Προϊόντα

Ο όρος «φυσικό προϊόν» αναφέρεται σε οποιαδήποτε οργανική ένωση που παράγεται από κάποιο έμβιο οργανισμό. Οι ενώσεις αυτές δεν συντίθεται τεχνητά σε εργαστήριο, αλλά αποτελούν αποτέλεσμα βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν τα ζώα, τα φυτά, οι μικροοργανισμοί καθώς και οι θαλάσσιοι οργανισμοί. Συγκεκριμένα ο αριθμός των φυσικών προϊόντων που έχει καταχωριθεί ξεπερνά τα 200.000, με ορισμένα από αυτά να βρίσκονται σε διάφορες περιοχές του κόσμου ενώ άλλα σε καθορισμένες. Τα φυσικά προϊόντα διαθέτουν επίσης μεγάλη ποικιλομορφία δομής καθώς και μοναδικές βιοδραστικές και φαρμακολογικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να βρίσκουν εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα τομέων με χαρακτηριστικότερα την ιατρική, τα φάρμακα, τα τρόφιμα, τη γεωργία και την βιομηχανία. Χαρακτηρίζονται συχνά ως όλα τα προϊόντα του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού, ωστόσο στους τομείς της φαρμακευτικής χημείας και φαρμακογνωσίας θεωρείται ότι φυσικά προϊόντα είναι τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού (Χαμηλάκης, 2022).

### 1.1.1 Πρωτογενείς Μεταβολίτες

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες πρόκειται για ενδιάμεσα προϊόντα καταβολικών και αναβολικών διεργασιών, που λαμβάνουν χώρα στους οργανισμούς και συνδέονται άμεσα με ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Κρίνονται απαραίτητοι για την ύπαρξη, την επιβίωση και την ανάπτυξη του οργανισμού και περιλαμβάνουν βασικά μόρια όπως νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, αμινοξέα και λιπαρά οξέα, που συνιστούν τις δομικές μονάδες σχηματισμού των μακρομορίων όπως DNA, RNA, πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Στην Εικόνα 1 παρατίθενται οι βασικοί πρωτογενείς μεταβολίτες.



Εικόνα 1: Βασικοί πρωτογενείς μεταβολίτες (Χαμηλάκης, 2022)

### 1.1.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις, που παράγονται από έναν οργανισμό και δεν εμπλέκονται άμεσα στην πρωτογενή ανάπτυξη του, αλλά η έλλειψή τους έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του (Χαμηλάκης, 2022). Εντοπίζονται συνήθως σε μικρότερες ποσότητες συγκριτικά με τους πρωτογενείς μεταβολίτες. Υπάρχουν τρεις μεγάλες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών (Bartwal et al., 2013):

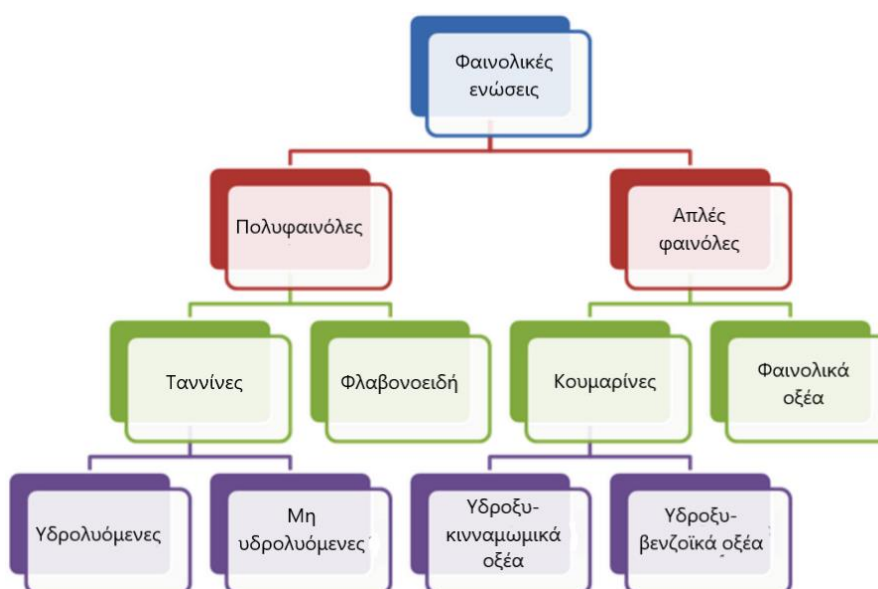
1. Τερπένια (ορμόνες, χρωστικές ουσίες, αιθέρια έλαια, στεροειδή)
2. Φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή, τανίνες, λιγνίνες, κουμαρίνες)
3. Δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν άζωτο (αλκαλοειδή, γλυκοζίτες και γλυκοσινολικά)

### 1.1.2.1 Τερπένια

Τα τερπένια πρόκειται για τη τη μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, με περισσότερες από 25.000 ενώσεις (Bhatla & Lal, 2023). Η δομή τους περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου ( $C_5H_8$ ) και αποτελούν τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων και της ρητίνης των φυτών. Επίσης εντάσσονται στην κατηγορία των λιπιδίων (Χαμηλάκης, 2022). Τα τερπένια έχουν πολλές βιολογικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων ο ρόλος τους στη συλλογή φωτός, στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στη φωτοπροστασία κατά τις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής, στη διατήρηση της δομής και της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ως φυτοορμόνες. Οποιαδήποτε τροποποίηση στα τερπένια, όπως οξείδωση ή αναδιάταξη των ατόμων άνθρακα, οδηγεί στο σχηματισμό ενώσεων που ονομάζονται τερπενοειδή (Bhatla & Lal, 2023).

### 1.1.2.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινόλες πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται στα φυτά. Η δομή τους αποτελείται από μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες, δηλαδή έναν αρωματικό δακτύλιο με έξι άτομα άνθρακα και μία ή περισσότερες λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου. Η φαινολική υδροξυλομάδα είναι ελαφρώς πιο όξινη από άλλες υδροξυλομάδες, επειδή βρίσκεται σε μια πιο σταθερή δομή του δακτυλίου (Bhatla & Lal, 2023). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται οι κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 2: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Khatri et al., 2019)

#### Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος, με επτά και εννέα άτομα άνθρακα κατά

αντιστοιχία. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι υδροξυλιωμένες. Τα φαινολικά οξέα, που είναι πιο κοινά στους φυτικούς ιστούς, είναι τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, με χαρακτηριστικότερα το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, το φερούλικό και τα σιναπικό οξύ. Επίσης στους φυτικούς ιστούς, τα φαινολικά οξέα μπορούν να συνδεθούν με διάφορες ενώσεις, όπως φλαβονοειδή, λιπαρά οξέα, στερόλες και πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος (Khatri et al., 2019).

### Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή πρόκειται για πολυφαινολικές ενώσεις με αλυσίδα δεκαπέντε ατόμων άνθρακα, τοποθετημένη σε δύο αρωματικούς δακτυλίους (Bhatla & Lal, 2023). Θεωρούνται ως η μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα φαινολικών ενώσεων στα φυτά, με τουλάχιστον 2000 φυσικές ενώσεις να έχουν εντοπιστεί (Khatri et al., 2019). Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν πολλές ομάδες, με κυριότερες τις ανθοκυανίνες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες και τις φλαβονόλες και εμφανίζονται στη φύση ως γλυκοζίτες, δηλαδή σύμπλοκα με ένα τμήμα σακχάρου. Πρόκειται για υδατοδιαλυτές ενώσεις, των οποίων η διαλυτότητα καθορίζεται από τον τύπο του υποκαταστάτη που συνδέεται σε αυτά. Επίσης τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι έγχρωμα και συσσωρεύονται σε κενά ή μερικές φορές σε χλωροπλάστες, εκτελώντας διάφορες λειτουργίες, όπως παροχή χρωματισμού και αμυντικού ρόλου (Bhatla & Lal, 2023).

#### 1.1.2.3 Ενώσεις που περιέχουν άζωτο

Πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης έχουν άζωτο στη δομή τους και συντίθενται κυρίως από κοινά αμινοξέα όπως η λυσίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη. Αρκετοί από αυτούς τους μεταβολίτες είναι σημαντικοί λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους. Γνωστές υποκατηγορίες τους αποτελούν τα αλκαλοειδή, οι γλυκοζίτες και οι σαπωνίνες (Bhatla & Lal, 2023).

## 1.2 *Rosa Canina L.*

Το άγριο τριαντάφυλλο *Rosa Canina L.* υπάγεται στο ευρύτερο γένος *Rosa* της οικογένειας *Rosaceae* και εντοπίζεται στην Ευρώπη, στη βορειοδυτική Αφρική και στη δυτικοκεντρική Ασία. Ολόκληρο το γένος *Rosa* παρουσιάζει μεγάλη εξάπλωση και περιλαμβάνει περίπου 100 έως 250 είδη (Jürgens et al., 2007).

Το άγριο τριαντάφυλλο διαθέτει πλούσια ιστορία λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα η χρήση των πετάλων, των καρπών και των σπόρων του έχει καταγραφεί σε ιστορικά κείμενα και παραδοσιακές πρακτικές, αναδεικνύοντας το ρόλο του στην ανακούφιση των παθήσεων και την προαγωγή της ευεξίας. Με αφορμή την ιστορική του σημασία, το *Rosa Canina L.* έχει μελετηθεί εκτενώς από τους επιστήμονες, αποκαλύπτοντας μια πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης C, των πολυφαινολών, των φλαβονοειδών και των αιθέριων ελαίων. Το πλούσιο φυτοχημικό αυτό προφίλ έχει προκαλέσει έρευνες για τις πιθανές εφαρμογές του σε φαρμακευτικά, διατροφικά και καλλυντικά προϊόντα.

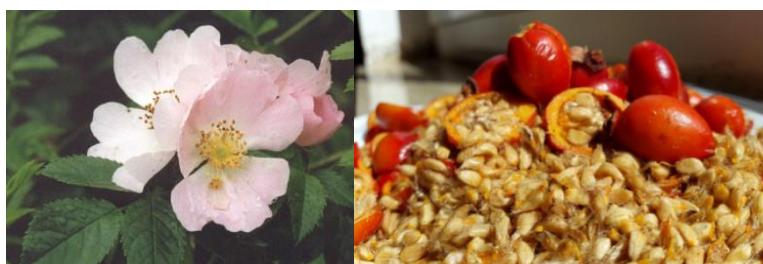


### 1.2.1 Ιστορική Σημασία

Το άγριο τριαντάφυλλο πρόκειται για έναν πολυετή θάμνο, του οποίου οι φαρμακευτικές ιδιότητες εντοπίστηκαν πρωτίστως από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23-79 μ.Χ.). Συγκεκριμένα παρατήρησε ότι οι γαλλικές εθνοτικές ομάδες το χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία των δαγκωμάτων σκύλων, δίνοντάς του έτσι το όνομα «ρόδου του σκύλου». Το *Rosa Canina* χρησιμοποιήθηκε επίσης από μια Γερμανίδα για την παρασκευή ενός τσαγιού με σκοπό τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου οργανώθηκε από τη κυβέρνηση της Βρετανίας η συγκομιδή του, καθώς αυτό έχει υψηλή συγκέντρωση σε βιταμίνη C. Επιπλέον σπουδαία αναφορά στην δυνατότητα του άγριου τριαντάφυλλου να επουλώνει τα έλκη έχει κάνει ο Ιρανός γιατρός Αβικέννα (980-1037 μ.Χ.). Σημειώνεται ότι τα διάφορα μέρη του φυτού (καρπός, φύλλα, ρίζα) χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την θεραπεία πολλών ασθενειών. Μέχρι και σήμερα το άγριο τριαντάφυλλο βρίσκεται εφαρμογές στην μαγειρική σε χώρες της Σκανδιναβίας και χρησιμοποιείται και ως τσάι σε πολλά ευρωπαϊκά κράτη (Selahvarzian et al., 2018)

### 1.2.2 Χαρακτηριστικά και Μορφολογία

Το τριαντάφυλλο *Rosa Canina* L. είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος, που διαθέτει λεπτούς βλαστούς και αγκάθια και έχει ύψος δύο με τρία μέτρα. Το φυτό αυτό πολλαπλασιάζεται μέσω των σπόρων ή των βασικών βλαστών του, καθώς και μέσω της διαστρωμάτωσης, της κοπής και της καλλιέργειας των ιστών και φυτρώνει στα δάση, σε θαμνότοπους και σε λακκούβες νερού. Τα άνθη του είναι συνήθως λευκά, ροζ ή σκούρα ροζ, έχουν διάμετρο τέσσερα με έξι εκατοστά και διαθέτουν πέντε πέταλα, τα οποία ωριμάζουν σε καρπούς. Οι καρποί αυτοί έχουν χρώμα το οποίο κυμαίνεται από πορτοκαλί έως κόκκινο και αποτελούνται περίπου από 71% περικάρπιο και 29% σπόρους. Ζυγίζουν από 1,25 έως 3,25 g (Selahvarzian et al., 2018). Το άνθος και ο καρπός του *Rosa Canina* L. φαίνονται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Το άνθος (αριστερά) και ο καρπός (δεξιά) του *Rosa Canina* (Selahvarzian et al., 2018; Cutler, 2003)

### 1.2.3 Φυτοχημικό προφίλ

Το φυτοχημικό προφίλ του *Rosa Canina* L. αποτελεί αντικείμενο σημαντικού ενδιαφέροντος λόγω της ποικιλίας βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν σε διάφορα μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένων των καρπών, των σπόρων, των πετάλων, ακόμη και των φύλλων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των βιοδραστικών αυτών ενώσεων αποτελούν οι βιταμίνες, το φαινολικό οξύ, τα βιοφλαβονοειδή, τα καροτενοειδή και τα αιθέρια έλαια.

- Βιταμίνες: Το τριαντάφυλλο είναι γνωστό για το υψηλό του περιεχόμενο σε βιταμίνη C, με τιμές να κυμαίνονται ανάμεσα στα 30-1300 mg/ 100 g. Συγκεκριμένα φαίνεται να προσδιορίζεται μεγαλύτερη ποσότητα της βιταμίνης C στη φλούδα. Επίσης έχει εντοπιστεί σημαντικό περιεχόμενο και σε βιταμίνη E, η οποία φαίνεται να υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα στα τριαντάφυλλα χωρίς σπόρους (Selahvarzian et al., 2018).
- Φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή: Το φυτό είναι άφθονο σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, τα οποία φαίνεται να έχουν και αναλογική σχέση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα με την υψηλότερη συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών είχαν επίσης υψηλότερες συγκεντρώσεις με τις διάφορες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων ( $R^2= 0,972$ ) (Montazeri et al., 2011).
- Καροτενοειδή και λιπαρά οξέα: Το *Rosa Canina* L. χρησιμοποιείται επίσης ως εναλλακτική πηγή λυκοπενίου, μιας και περιέχει 2,9-35,2 mg λυκοπενίου ανά 100. Επίσης παρουσιάζει μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα (FAs) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), τα οποία στα τριαντάφυλλα με σπόρους είναι τέσσερις και επτά φορές περισσότερα κατά αντιστοιχία συγκριτικά με τα τριαντάφυλλα χωρίς σπόρους (Selahvarzian et al., 2018).
- Αιθέρια έλαια: Το *Rosa Canina* L. περιέχει επίσης και αιθέρια έλαια στα φύλλα του, οι συγκεντρώσεις των οποίων εξαρτώνται έντονα από τη συγκομιδή. Το παλμιτικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα μεταξύ των ελαίων, που έχουν ταυτοποιηθεί (Ghazghazi et al., 2011).

## 1.2.4 Φαρμακευτικές Ιδιότητες-Εφαρμογές

Το *Rosa Canina* L. έχει ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες, που αποδίδονται στις βιοδραστικές ενώσεις που αυτό περιέχει. Η αντιοξειδωτική, η αντιγηραντική και η αντιδιαβητική του δράση είναι από τις σημαντικότερες που έχουν μελετηθεί για το άγριο τριαντάφυλλο, ωστόσο χαρακτηρίζεται και από άλλες θεραπευτικές ιδιότητες.

### Αντιοξειδωτική δράση

Το *Rosa Canina* L. είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες λόγω των βιταμινών, των φαινολικών και των φλαβονοειδών ουσιών που αυτό περιέχει. Η αντιοξειδωτική του δράση έχει μετρηθεί με τη μέθοδο DPPH, η οποία φαίνεται να εξαρτάται από τη γεωγραφική θέση, την ανάπτυξη, τις καιρικές συνθήκες, τη συγκομιδή, την αποθήκευση και την εκχύλιση του τριαντάφυλλου. Αντίστοιχη εξάρτηση φαίνεται να υπάρχει και για την περιεκτικότητα των ενώσεων που αναφέρθηκαν. Βάσει μελέτης, που διεξήχθη το 2010, το *Rosa Canina* φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για τα συνθετικά αντιοξειδωτικά (Selahvarzian et al., 2018).

### Αντιγηραντική δράση

Οι σπόροι που περιέχονται στους καρπούς του άγριου τριαντάφυλλου περιέχουν υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), τα οποία είναι απαραίτητα για το δέρμα. Συγκεκριμένα έρευνες έχουν δείξει ότι η σκόνη από το *Rosa Canina* συμβάλλει στην μακροζωία των κυτταρικών μεμβρανών και στην γενικότερη υγεία του δέρματος, βελτιώνοντας τις ρυτίδες, την υγρασία και την ελαστικότητά του (Phetcharat et al., 2015).

Η αντιγηραντική δράση μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αναστολής του ενζύμου τυροσινάση από τα εκχυλίσματα του *Rosa Canina*. Η τυροσινάση ή οξειδάση των

πολυφαινολών είναι μια οξειδοοξειδοουκτάση και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της μελανίνης. Αντιδρά με το υπόστρωμα L-DOPA, παράγοντας πορτοκαλί χρώμα. Η μείωση του πορτοκαλί χρώματος ή ένα διαυγέστερο αποτέλεσμα αντίδρασης συνεπάγεται την αναστολή της δράσης της τυροσινάσης. Βάσει μελέτης που πραγματοποιήθηκε τα εκχυλίσματα του *Rosa Canina* είναι σε θέση να αναστείλουν τη δράση της τυροσινάσης, επιβεβαιώνοντας την αντιγηραντική ιδιότητα (Nadeak et al. 2020).

#### Αντιδιαβητική δράση

Το τριαντάφυλλο *Rosa Canina* είναι γνωστό επίσης και για τις αντιδιαβητικές του ικανότητες. Χρησιμοποιείται παραδοσιακά για αυτόν το σκοπό στο Ιράν, αλλά και πολλές κλινικές δοκιμές έχουν εξάγει αντίστοιχα αποτελέσματα (Selahvarzian et al., 2018). Πιο πρόσφατες μελέτες εξέτασαν την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος καρπών *Rosa Canina* σε *in vitro* μοντέλα αντιδιαβητικού μηχανισμού δράσης, υποδεικνύοντας ότι αυτό το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική θεραπεία για τη διαχείριση του σακχαρώδη διαβήτη (Fattahi et al., 2017).

Έχει μελετηθεί επίσης η αναστολή των ενζύμων α-αμυλάση και α-γλυκοζιδάση από το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου. Τα δύο αυτά πεπτικά ένζυμα επηρεάζουν την αποικοδόμηση του αμύλου και το μεταβολισμό της γλυκόζης, με το πρώτο να ξεκινά την υδρόλυση του αμύλου σε μαλτόζη και στη συνέχεια το δεύτερο να διασπά τη μαλτόζη σε γλυκόζη, η οποία μεταφέρεται αργότερα στην κυκλοφορία του αίματος. Έτσι η μείωση της δράσης των ενζύμων αυτών, συνεπάγεται τη μείωση της μεταγευματικής απόκρισης μετά από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν άμυλο και κατ' επέκταση τη διαχείριση του διαβήτη. Συγκεκριμένα σε μία έρευνα παρατηρήθηκε έως και 100% αναστολή της α-αμυλάσης καθώς επίσης και σε μια ιρανική μελέτη φάνηκε ότι το μεθανολικό και ακετονικό εκχύλισμα του *Rosa Canina* έχουν σημαντική ανασταλτική δράση της α-γλυκοζιδάσης. Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν την αντιδιαβητική δράση του άγριου τριαντάφυλλου, η οποία αποδίδεται κυρίως στα φλαβονοειδή, τα φαινολικά και τη βιταμίνη C που αυτό περιέχει (Jemaa et al., 2017).

#### Αντιβακτηριδιακή δράση

Η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του τριαντάφυλλου είναι επίσης σημαντική και οφείλεται τόσο στις φαινολικές όσο και σε άλλες ενώσεις. Μία έρευνα για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για τα *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis* και *Bacillus cereus* έδειξε ότι το *Rosa Canina* είχε την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με άλλα είδη που εξετάστηκαν. Μία άλλη έρευνα εξέτασε τις αντιμικροβιακές επιδράσεις που είχαν αιθανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα από ξηρά πέταλα του *Rosa Canina* ενάντια στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Escherichia coli* CCM 3988 και *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 καθώς και στους μύκητες *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* και *Alternaria alternata*. Η αντιμικροβιακή δράση φάνηκε μεγαλύτερη στα βακτήρια συγκριτικά με τους μύκητες (Selahvarzian et al., 2018).

#### Αντικαρκινική δράση

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί *in vitro* το εκχύλισμα του *Rosa Canina* έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Επίσης στην διδακτορική διατριβή της Lijie Zhong αναφέρονται οι αντικαρκινικές επιδράσεις των

βιοδραστικών ενώσεων του καρπού του τριαντάφυλλου σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού (Selahvarzian et al., 2018).

#### *Αντιφλεγμονώδης δράση*

Η αντιφλεγμονώδης δράση του *Rosa Canina* έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες μέσω διαφορετικών μεθόδων και αποδίδεται κυρίως στην ύπαρξη της ένωσης του γαλακτολιπιδίου. Το γαλακτολιπίδιο αναστέλλει τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος. Η αντιφλεγμονώδης του δράση φαίνεται να έχει θετικές επιδράσεις στην οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και στον πόνο στην πλάτη (Selahvarzian et al., 2018). Συγκεκριμένα έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες για την οστεοαρθρίτιδα στη Γερμανία το 2001, που έδειξαν ότι με τη χρήση του άγριου τριαντάφυλλου στη θεραπεία, τα συμπτώματα των ασθενών βελτιώθηκαν (Cutler, 2003).

Συμπερασματικά, το *Rosa Canina* L. έχει ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες καθώς και πλούσια φυτοχημική σύνθεση. Συγκεκριμένα διαθέτει ένα φάσμα βιοδραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων βιταμινών (ιδίως βιταμίνης C), πολυφαινολών, φλαβονοειδών και αιθέριων ελαίων με αποτέλεσμα να συγκεντρώνει ένα μεγάλο ενδιαφέρον στον τομέα των εκχυλίσεων. Πολλές μέθοδοι εκχύλισης έχουν εφαρμοστεί προκειμένου να αξιοποιηθούν οι ενώσεις αυτές, μιας και αυτά τα εκχυλίσματα βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε τομείς όπως τα φάρμακα και τα καλλυντικά.

### **1.3 Εκχύλιση**

Η εκχύλιση πρόκειται για μία φυσική διεργασία διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει το διαχωρισμό ενός ή περισσότερων συστατικών από ένα υγρό ή στερεό μίγμα με τη χρήση διαλύτη και αποτελεί το πρώτο βήμα για τον διαχωρισμό των επιθυμητών φυσικών προϊόντων από τις πρώτες ύλες. Προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός αυτός, ο διαλύτης εισέρχεται στη μήτρα, με αποτέλεσμα οι διαλυτές ενώσεις, που βρίσκονται στην πρώτη ύλη, να διαλύονται σε αυτόν. Ακολουθεί διάχυση των διαλυμένων ουσιών έξω από τη μήτρα και στη συνέχεια η συλλογή τους. Παράγοντες, οι οποίοι ενισχύουν τη διαλυτότητα και τη διαχυτικότητα των παραπάνω βημάτων, διευκολύνουν την εκχύλιση. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι ιδιότητες του διαλύτη, το μέγεθος των σωματιδίων των πρώτων υλών, η αναλογία υγρού-στερεού, η θερμοκρασία εκχύλισης και η διάρκεια εκχύλισης (Zhang et al., 2018).

Η επιλογή του διαλύτη είναι αρκετά σημαντική στην εκχύλιση και εξαρτάται από παράγοντες όπως η επιλεκτικότητα και η διαλυτότητά του, το είδος της πρώτης ύλης καθώς και η φύση των ενώσεων, που επρόκειτο να απομονωθούν. Συνήθως, επιλέγονται διαλύτες με τιμή πολικότητας κοντά στην πολικότητα των ενώσεων, που πρόκειται να εκχυλιστούν. Το κόστος, η αντιδραστικότητα και η ασφάλεια του διαλύτη είναι επίσης εξίσου βασικές παράμετροι. Το μέγεθος των σωματιδίων της πρώτης ύλης επηρεάζει αρκετά την απόδοση της εκχύλισης. Γενικά, ένα λεπτότερο μέγεθος σωματιδίων συνεπάγεται τη μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής με το διαλύτη, γεγονός που επιτρέπει τη μεγαλύτερη διείσδυση αυτού στη μήτρα της πρώτης ύλης. Έτσι, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διάχυση των διαλυμένων ενώσεων. Ωστόσο ένα πολύ λεπτό μέγεθος σωματιδίων μπορεί να οδηγήσει στην υπερβολική απορρόφηση των ενώσεων αυτών, με αποτέλεσμα έπειτα να υπάρχει δυσκολία στην εκχύλιση

τους. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, οι υψηλές τιμές αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη διάχυση. Ωστόσο η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει απώλεια διαλυτών, οδηγώντας σε εκχυλίσματα ανεπιθύμητων ακαθαρσιών και στην αποσύνθεση θερμοευαίσθητων συστατικών. Για ένα συγκεκριμένο χρονικό εύρος, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης συνεπάγεται και την αύξηση της απόδοσής της. Ωστόσο, αφού επιτευχθεί η ισορροπία των διαλυμένων ενώσεων εντός και εκτός του υλικού, η αύξηση του χρόνου δεν θα επηρεάσει την εκχύλιση. Η απόδοση της εκχύλισης επίσης αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας στερεού-υγρού. Ωστόσο, μια πολύ υψηλή αναλογία μειώνει την επαφή μεταξύ της πρώτης ύλης και του διαλύτη, οδηγώντας σε χαμηλότερες αποδόσεις εκχύλισης (Zhang et al., 2018).

Οι παραπάνω παράγοντες επηρεάζουν αρκετά την απόδοση τα εκχύλισης, συνεπώς πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κατά τον σχεδιασμό της διαδικασίας αυτής. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι εκχύλισης, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση ενώσεων από τα φυσικά προϊόντα. Κατηγοριοποιούνται στις συμβατικές και στις μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης.

### 1.3.1 Συμβατικές εκχυλίσεις

Οι συμβατικές ή αλλιώς παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης περιλαμβάνουν την εκχύλιση υγρού-υγρού, την εκχύλιση στερεάς φάσης και τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.

- Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid Extraction – LLE): Είναι γνωστή επίσης ως εκχύλιση με διαλύτη και αποτελείται από δύο μη αναμιγνύμενες υγρές φάσεις, με τη μία να είναι συνήθως υδατική ενώ την άλλη οργανική. Η εκχύλιση είναι επιτυχής εάν η προς προσδιορισμό ένωση-αναλυτής διαλύεται στην οργανική φάση. Ουσιαστικά πραγματοποιείται ανακίνηση των δύο φάσεων μαζί με την πρώτη ύλη, σε ένα διαχωριστικό χωνί μέχρι το σχηματισμό δύο στρωμάτων υγρού, τα οποία απομακρύνονται χωριστά. Έτσι, απομονώνεται ο αναλυτής. Η τεχνική αυτή ενδείκνυται για την εξαγωγή αζεοτροπικών μειγμάτων και ευαίσθητων στη θερμοκρασία συστατικών, επειδή δεν απαιτεί διαδικασία απόσταξης (Yahya et al., 2018).
- Εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid-liquid Extraction – SPE): Η εκχύλιση αυτή περιλαμβάνει την απομάκρυνση των χημικών ενώσεων από ένα υγρό, ρεούμενο δείγμα. Ουσιαστικά πραγματοποιείται μέσω της κατακράτησης των ενώσεων αυτών σε ένα στερεό απορροφητικό υλικό, από το οποίο στη συνέχεια η ένωση προς προσδιορισμό-αναλυτής ανακτάται μέσω έκλουσης. Τα στάδια, που ακολουθούνται, είναι τα εξής: α) μια πρόπλυση για την προετοιμασία της στατικής φάσης, β) την κατακράτηση ή απορρόφηση, προκειμένου να συγκρατηθεί ο αναλυτής και να απομακρυνθούν οι παρεμβολές, γ) μια επανάληψη της πλύσης της στήλης για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων προσμίξεων και δ) την έκλυση για την ανάκτηση του αναλυτή. Η απόδοση της εκχύλισης αυτής εξαρτάται από τη δυνατότητα του στερεού υλικού να προσλάβει ένα υψηλό ποσοστό ενώσεων και την ικανότητα των αυτών να εκλούνται πλήρως από τα στερεά σωματίδια. Η SPE πλεονεκτεί σε σχέση με την LLE, καθώς είναι απλούστερη, πιο γρήγορη, πιο οικονομική και χρησιμοποιεί λιγότερη ποσότητα οργανικού διαλύτη (Yahya et al., 2018).
- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Micro-Extraction –SPME): Η εκχύλιση αυτή βασίζεται στην ύπαρξη ενός στερεού υλικού, που αποτελείται είτε από

εξωτερικά επικαλυμμένες ίνες ή είναι ένας εσωτερικά επικαλυμμένος σωλήνας. Το στερεό αυτό έρχεται σε επαφή με το υγρό δείγμα για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι προς προσδιορισμό ενώσεις-αναλυτές απορροφώνται από το υλικό, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται σε συσκευή που συνδέεται με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography-GC) ή με υγρή χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography-HPLC). Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα, η SPME είναι ευαίσθητη, γρήγορη και απλή (Yahya et al., 2018).

Πολύ διαδεσμένη μέθοδος είναι η εκχύλιση Soxhlet, που αποτελεί υποκατηγορία της εκχύλισης στερεού-υγρού και πρόκειται για μια τυπική τεχνική για πάνω από έναν αιώνα. Εφευρέθηκε το 1879 από τον Franz von Soxhlet και σχεδιάστηκε αρχικά με σκοπό την ανάκτηση ενός λιπιδίου. Η κλασική εφαρμογή της εκχύλισης Soxhlet αποτελεί μία λειτουργία συνεχούς-διακεκριμένης φύσεως και επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η εξαγωγή. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν προταθεί διάφορες τροποποιήσεις της μεθόδου αυτής, οι οποίες καθιστούν την εκχύλιση ταχύτερη, λόγω της χρήσης βοηθητικών πηγών ενέργειας. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η εκχύλιση Soxhlet υπό πίεση, η αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet, η εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη από υπερήχους και η εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Castro & Capote, 2010).

### 1.3.2 Μη συμβατικές εκχυλίσεις

Οι μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης βασίζονται στον σεβασμό των ιδανικών της Πράσινης Χημείας, η οποία πρόκειται για την αντίληψη της χημείας που ενεργεί με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος με την ανάπτυξη διαδικασιών που περιορίζουν τη χρήση και την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Παραδείγματα αποτελούν η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση (Enzyme-Assisted Extraction, EAE), η Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE), η Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE) η Εκχύλιση με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE), η Εκχύλιση με Παλμικό Ηλεκτρικό Πεδίο (Pulsed-Electric Field extraction, PEF), η Εκχύλιση με Ρευστό Υπό Πίεση (Pressurized fluid extraction, PFE), η Εκχύλιση με Νερό σε Υποκρίσιμες Συνθήκες (Subcritical Water Extraction, SWE), η Εκχύλιση με Πράσινους Διαλύτες (Green Solvents), με Φυσικούς Βαθώς Ευτηκτικούς Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES), με Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids, IL's). Από τις ανωτέρω μεθόδους, η Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση θα αποτελέσει στη συνέχεια αντικείμενο διεξοδικότερης μελέτης. Αναλύονται ορισμένες από τις μεθόδους αυτές.

- Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (Supercritical Fluid Extraction – SFE): Η εκχύλιση αυτή χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ενώσεων-στόχων ή βιοδραστικών ενώσεων μεγάλης κλίμακας. Βασίζεται στο γεγονός ότι το υπερκρίσιμο ρευστό διαθέτει ιδιότητες τόσο υγρών όσο και αερίων, οι οποίες μπορούν να διαμορφωθούν με μικρές μεταβολές της πίεσης και της θερμοκρασίας. Επιπλέον μπορεί να εξαπλωθεί εύκολα λόγω του χαμηλού ιξώδους και να διεισδύσει ταχύτατα εντός της στερεάς μήτρας λόγω της χαμηλής επιφανειακής τάσης, καθιστώντας την εκχύλιση αρκετά αποτελεσματική (Pagano et al., 2021).

- Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction – PLE): Η εκχύλιση αυτή επιτρέπει τη μεταφορά διαλυμένων ουσιών από μια στερεή μήτρα, επιτυγχάνοντας γρήγορο ρυθμό εκχύλισης λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υγρού διαλύτη και των μορίων της μήτρας και των υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων που αυξάνουν την αποτελεσματικότητά της. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε στατική λειτουργία, σε δυναμική λειτουργία ή σε συνδυασμό (Pagano et al., 2021).
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction – UAE): Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ενέργεια υπερήχων, με τη μορφή κυμάτων τα οποία διαχέονται μέσα στα μόρια του μέσου στο οποίο υπόκεινται. Σε υψηλή ένταση σχηματίζονται φυσαλίδες σπηλαίωσης, οι οποίες καταρρέουν και δημιουργούν πίδακες υψηλής ταχύτητας που προκαλούν διάσπαση των κυτταρικών δομών και διευκολύνουν τη διείσδυση του διαλύτη. Είναι σχετικά απλή στην εφαρμογή και οι χρόνοι εκχύλισης δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλοι (Pagano et al., 2021).
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction – MAE): Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με την βοήθεια μικροκυμάτων ξεκινούν την ιοντική αγωγή, δημιουργώντας έτσι ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η διηλεκτρική θέρμανση με χρονικά μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο, δημιουργεί ενέργεια που απελευθερώνεται με τη μορφή θερμότητας. Η εξάτμιση της υγρασίας δημιουργεί πίεση στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου, διογκώνοντας και στη συνέχεια διαρρηγνύοντάς το. Έτσι το κύτταρο εκτίθεται στον περιβάλλοντα διαλύτη, ο οποίος διεισδύει ευκολότερα σε αυτό. Είναι δυνατή και η εφαρμογή της τεχνικής αυτής απουσία διαλύτη, που καλείται ως ξηρή ή εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων χωρίς διαλύτη (Pagano et al., 2021).
- Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme-Assisted Extraction – EAE): Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση χρησιμοποιεί την καταλυτική ιδιότητα των ενζύμων, να συνδέονται με την κυτταρική μήτρα και να υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα, απελευθερώνοντας έτσι τις βιοδραστικές ενώσεις στο εξωτερικό περιβάλλον. Απαιτείται η ύπαρξη ενός διαλύτη, είτε οργανικής φύσης είτε υδατικής φύσεως, ο οποίος διεισδύει στο κύτταρο και βοηθάει στην ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης της κυτταρικής διάσπασης, της εκλεκτικής εκχύλισης ενώσεων, των ήπιων συνθηκών επεξεργασίας, της βελτιωμένης απόδοσης και του βελτιωμένου ρυθμού εκχύλισης (Das et al., 2021).

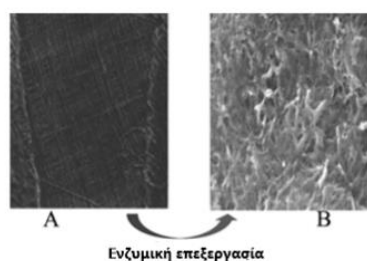
Οι μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης επιλέγονται αρκετά συχνά για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, καθώς συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους παρουσιάζουν μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα και χαμηλότερο ενεργειακό κόστος. Σημαντική καινοτομία των τελευταίων χρόνων αποτελεί η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (EYE), καθώς χαρακτηρίζεται από ήπιες συνθήκες εκχύλισης, εξειδικευμένο χαρακτήρα, ενισχυμένη απόδοση εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων και αρκετά φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα. Η EYE χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά κύτταρα. Η μέθοδος, τα πλεονεκτήματα και οι εφαρμογές της αναλύονται διεξοδικά στην επόμενη ενότητα.

## 1.4 Ενζυμικά Υποβοηθούμενη Εκχύλιση

### 1.4.1 Βασική αρχή της EYE

Τα ένζυμα αποτελούν βιοκαταλύτες, οι οποίοι είναι σε θέση να διαταράσσουν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και να υδρολύουν τα συστατικά του. Ο μηχανισμός, που ακολουθεί η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, είναι το μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς, το οποίο περιγράφει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου σύνδεσης ανάμεσα στο ένζυμο και το υπόστρωμα. Τα ένζυμα διαθέτουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, το οποίο συνδέεται σε αυτά με ένα συμπληρωματικό τρόπο σε ένα εξειδικευμένο ενεργό κέντρο. Στο ενεργό κέντρο καταλύεται από τα ένζυμα η χημική αντίδραση, η οποία στην περίπτωση των φυτικών κυττάρων είναι η υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος. Οι υδρολυτικές αντιδράσεις οδηγούν στην απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων στο διαλύτη, που χρησιμοποιείται, με αποτέλεσμα αυτές να μπορούν να ανακτηθούν και να μελετηθούν (Marathe et al., 2017; Das et al., 2021).

Η Εικόνα 4 απεικονίζει το κυτταρικό τοίχωμα πριν και μετά από ενζυμική επεξεργασία, όπως φάνηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).



Εικόνα 4: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

A-κυτταρικό τοίχωμα χωρίς επεξεργασία B-κυτταρικό τοίχωμα μετά από ενζυμική επεξεργασία  
(Cheng et al., 2015)

Τα ένζυμα, που χρησιμοποιούνται στην EYE, ενδείκνυται να έχουν υψηλή βιοδραστικότητα, να μπορούν να επιδεικνύουν εναντιο-εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, να είναι σταθερά κάτω από εξωτερικές συνθήκες, όπως οι υψηλές τιμές pH, η υψηλή θερμοκρασία, οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος/προϊόντος και η ανοχή σε διαλύτη. Καθοριστικός, όμως, παράγοντας στην επιλογή του ενζύμου αποτελεί το υπόστρωμα. Στην περίπτωση της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά κύτταρα, η κατανόηση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος και του τρόπου δράσης των υδρολυτικών ενζύμων είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ορθή εφαρμογή της μεθόδου της EYE και περιγράφονται αναλυτικά σε επόμενη υποενότητα (Das et al., 2021).

### 1.4.2 Στάδια της EYE

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ορθά η διαδικασία της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης, είναι απαραίτητη η γνώση των ενζυμικών αντιδράσεων και των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία. Αρχικά πρέπει να επιλεγεί η κατάλληλη πρώτη ύλη, της οποίας



είναι γνωστή η βιοχημική και μορφολογική σύνθεση, η οποία θα υποβληθεί σε προεπεξεργασία. Η προεπεξεργασία περιλαμβάνει συχνά τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του υποστρώματος και πραγματοποιείται μέσω ξήρανσης, αλέσματος και ομογενοποίησης. Ουσιαστικά βελτιώνει τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος για τη δέσμευση του ενζύμου σε αυτό. Απαραίτητη κρίνεται η ρύθμιση παραμέτρων όπως η θερμοκρασία και το pH, τα οποία επιλέγονται συνήθως σε κοντινές τιμές των βέλτιστων τιμών για το εκάστοτε ένζυμο, προκειμένου να αποφευχθεί η μετουσίωση του τελευταίου. Όσον αφορά τη ρύθμιση του pH, η υδατική ενζυμική επεξεργασία περιλαμβάνει συνήθως ρυθμιστικά άλατα ως διαλύτες, τα οποία επιτρέπουν τη διατήρηση της ακεραιότητας του ενζύμου και της σταθερότητας του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του κατάλληλου ενζυμικού φορτίου και η επώαση, ενώ μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου εκχύλισης ακολουθεί η αδρανοποίηση του ενζύμου. Προκειμένου να συλληχθεί η υδατική φάση του εκχυλίσματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση ή/και διήθηση. Στο τέλος της διεργασίας, αξιολογείται το φυτοχημικό προφίλ και η βιολογική δράση του εκχυλίσματος και επιλέγονται οι εφαρμογές που αυτό μπορεί να έχει σε βιομηχανική κλίμακα (Costa et al., 2020).

### 1.4.3 Πλεονεκτήματα

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, με το κυριότερο να είναι ο «πράσινος» χαρακτήρας της. Αποτελεί μία απλοποιημένη διεργασία, η οποία έχει δυνατότητα εφαρμογής της τόσο σε μικρή όσο και σε μεγάλη κλίμακα (Gligor et al., 2019).

Συγκεκριμένα η EYE υπερτερεί των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, καθώς κατά την εφαρμογή της δεν χρησιμοποιούνται τοξικοί και πτητικοί διαλύτες, οι οποίοι είναι αρκετά επιβλαβείς για το περιβάλλον. Επίσης συγκριτικά με αυτές τις μεθόδους, παρουσιάζει μειωμένο ενεργειακό κόστος καθώς και μειωμένο κόστος κεφαλαίου, αφού εξαλείφεται η ανάγκη για χρήση ακριβών, κλασικών εγκαταστάσεων.

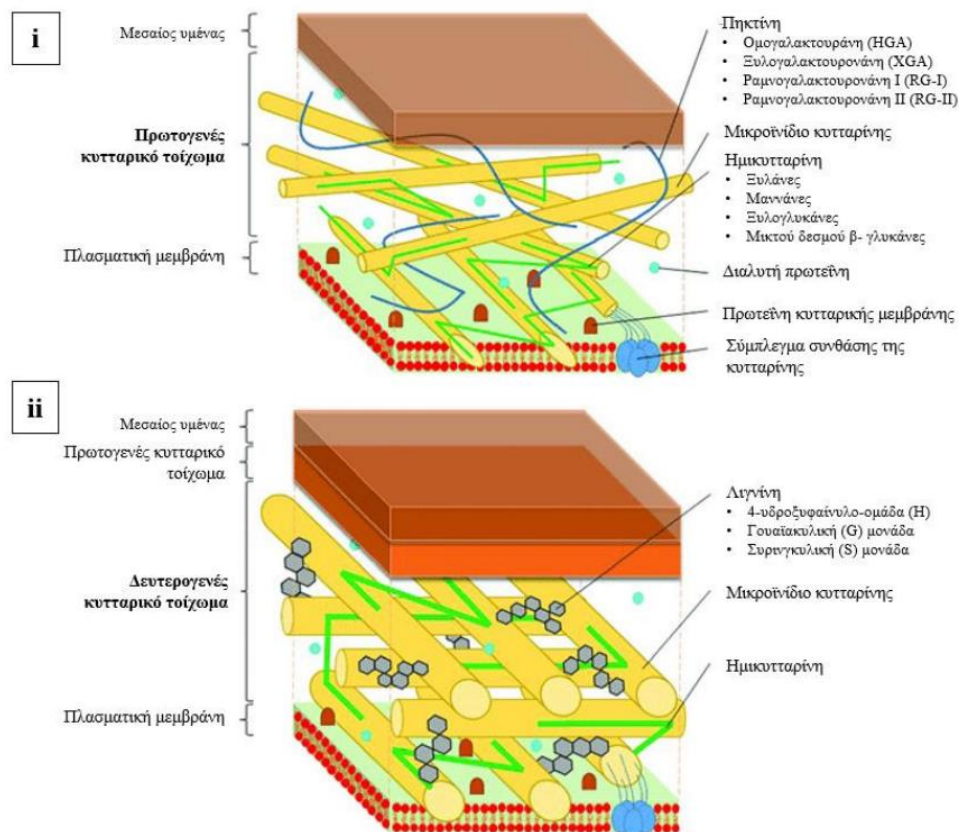
Σε άλλα πλεονεκτήματα, ξεχωρίζει η αυξημένη απόδοση της EYE, η οποία αποδίδεται στην δυνατότητα των ενζύμων να διασπών την πολύπλοκη δομή των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και να ενισχύσουν την απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων. Λόγω της αυξημένη εκλεκτικότητας των ενζύμων και της εξειδίκευσής τους ως προς το υπόστρωμα, δίνεται η δυνατότητα για εκχύλιση πληθώρας βιοδραστικών ενώσεων, οι οποίες διαφορετικά δεν θα ήταν προσβάσιμες. Οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης κατά την εφαρμογή της EYE, όπως οι χαμηλές τιμές θερμοκρασίας, η δυνατότητα πλήρους εκμετάλλευσης του φυτικού υλικού και ο μειωμένος αριθμός σταδίων είναι επίσης σημαντικά προτερήματά της (Gligor et al., 2019). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μειωμένο χρόνο εκχύλισης και μειωμένο όγκο διαλύτη, ο οποίος χρησιμοποιείται και αφαιρεί επιλεκτικά τα ανεπιθύμητα συστατικά της πρώτης ύλης. Έτσι οδηγεί με ταχύτητα σε ένα εκχύλισμα βελτιωμένης ποιότητας και βιοδιαθεσιμότητας. (Marathe et al., 2017; Gligor et al., 2019).

### 1.4.4 Κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα πρόκειται για μια μορφή εξωκυτταρικής μήτρας που περιβάλλει κάθε κύτταρο ενός φυτικού κυττάρου. Επιτελεί πολλές μηχανικές και δομικές λειτουργίες, παρέχει σχήμα στον κάθε τύπο κυττάρου και συμβάλλει στη διακυτταρική επικοινωνία. Έχει επίσης

σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων των αμυντικών αποκρίσεων έναντι πιθανών παθογόνων (Keegstra, 2010).

Όσον αφορά τη δομή του, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μια σειρά σύνθετων δομικών πολυσακχαριτών, όπως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη και λιγνίνη, η οποία είναι ένα αρωματικό πολυμερές, καθώς και από πρωτεΐνες. Η δομή αυτή είναι που προσδίδει στα κύτταρα τη σταθερότητα και την αντοχή στην εξαγωγή των ενδοκυτταρικών συστατικών.<sup>[15]</sup> Όσον αφορά τη σύνθεση και την αρχιτεκτονική των κυτταρικών τοιχωμάτων, παρουσιάζουν ποικιλία ανάλογα με το είδος, τον κυτταρικό τύπο, τον ιστό, το στάδιο ανάπτυξης και το στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος. Κατά τη διάρκεια της φυτικής ανάπτυξης και επιμήκυνσης των κυττάρων, τα φυτικά κύτταρα παράγουν το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα. Αφού έχει επιμηκυνθεί το κύτταρο, ορισμένοι ιστοί παράγουν ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο εναποτίθεται στο εσωτερικό του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, μετατοπίζοντάς το προς τα έξω. Το δευτερογενές αυτό κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη (Mota et al., 2018). Στην Εικόνα 5 παρατίθεται η δομή και η σύνθεση του πρωτοταγούς και δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος.



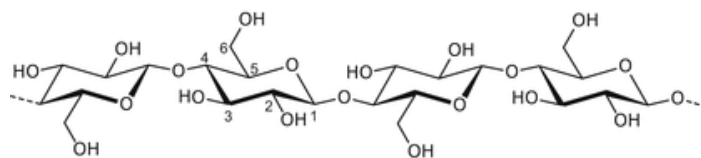
Εικόνα 5: Δομή και σύνθεση (i) πρωτοταγούς και (ii) δευτεροταγούς κυτταρικού τοιχώματος (Loix et al., 2017)

#### 1.4.4.1 Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο άφθονο βιοπολυμερές. Το μόριό της είναι γραμμικό και αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Η κελλοβιόζη θεωρείται η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα της και έχει μήκος 1,3 nm. Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 1.000 και 30.000, που

αντιστοιχεί σε μήκη αλυσίδων από 500 έως 15.000 nm. Τα μόρια κυτταρίνης συνδέονται παράλληλα μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας μικροϊνίδια που αποτελούνται από 30 έως 36 γραμμικές αλυσίδες, τα οποία έχουν υψηλό βαθμό μηχανικής αντοχής και ανθεκτικότητας έναντι ενζυμικής προσβολής (Ioelovich, 2008 & Heinze, 2015).

Η αναπαράσταση του μορίου της κυτταρίνης φαίνεται στην Εικόνα 6.

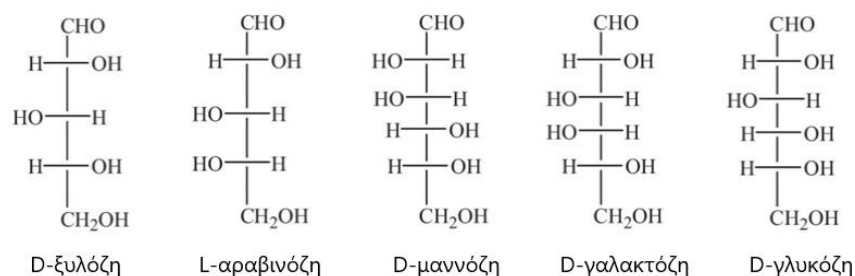


Εικόνα 6: Αναπαράσταση του μορίου της (Heinze, 2015)

#### 1.4.4.2 Ημικυτταρίνη

Η ημικυτταρίνη ανήκει σε μια ομάδα ετερογενών πολυσακχαριτών, αποτελώντας το δεύτερο σημαντικότερο πολυσακχαρίτη μετά την κυτταρίνη. Αποτελεί συνήθως το 15%-35% της ξηρής μάζας των ετήσιων και πολυετών φυτών. Η βιοσύνθεσή της διαφέρει συνήθως από αυτήν της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα πολλές ημικυτταρίνες να είναι διακλαδισμένες, να αποτελούνται από ένα μείγμα διαφορετικών σακχάρων και να έχουν διαφορετικούς υποκαταστάτες. Έτσι πολλές από αυτές δεν είναι κρυσταλλικές αλλά είναι υδατοδιαλυτές. Έχουν επίσης χαμηλότερο μοριακό βάρος από την κυτταρίνη καθώς και μικρότερο βαθμό πολυμερισμού, με τιμές να κυμαίνονται από 80 έως 200 (Rao et al., 2023; Gabriellii & Gatenholm, 1998). Όσον αφορά τα σάκχαρα που περιέχουν οι ημικυτταρίνες, τα κυριότερα είναι οι πεντόζες (όπως D-ξυλόζη και L-αραβινόζη), οι εξόζες (όπως D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη και D-μαννόζη) και τα ουρονικά οξέα (όπως γλυκουρονικό οξύ). Η περιεκτικότητα και η δομή της ημικυτταρίνης, το μήκος και ο τύπος της κύριας αλυσίδα, καθώς και η κατανομή και ο τύπος των πλευρικών αλυσίδων ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του κυττάρου (Pora & Spiridon, 1998; Lu et al., 2021).

Υπάρχουν τρεις κύριες υποκατηγορίες των ημικυτταρινασών, οι ξυλάνες, οι μαννάνες και οι ξυλογλυκάνες. Η ξυλάνη πρόκειται για την πιο άφθονη ημικυτταρίνη και αποτελείται από μια υποκατεστημένη κεντρική αλυσίδα μορίων D-ξυλοπυρανόζης που ενώνονται μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η μαννάνη αποτελείται από μονάδες μαννόζης, ενώ η ξυλογλυκάνη περιέχει υπολείμματα γλυκόζης (Naidu et al., 2018). Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται διάφορες δομές της ημικυτταρίνης με βάση τα σάκχαρα.



Εικόνα 7: Η ημικυτταρίνη και οι διάφορες κοινές δομές της με βάση τα σάκχαρα (Lu et al., 2021)

### 1.4.4.3 Πηκτίνη

Η πηκτίνη είναι ένας ομοιοπολικά συνδεδεμένος πολυσακχαρίτης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και αντιπροσωπεύει έως και το 35% των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων σε ορισμένα είδη. Θεωρούνται ως ο πιο πολύπλοκοι δομικά πολυσακχαρίτες στη φύση και αποτελούνται από μια γραμμική αλυσίδα μονάδων α-(1,4)-συνδεδεμένων D-γαλακτουρονικού οξέος (GalA). Οι τρεις κυρίαρχοι πηκτικοί πολυσακχαρίτες είναι η ομογαλακτουρονάνη (HG), η ραμνογαλακτουρονάνη (RG-I) και η ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II). Η HG είναι μεγαλύτερη σε αφθονία, περιλαμβάνοντας περίπου το 65% της πηκτίνης. Ακολουθεί η RG-I, έχοντας περιεκτικότητα 20-35% στην πηκτίνη και έπειτα η RG-II, αποτελώντας περίπου το 10% της πηκτίνης (Ropartz & Ralet, 2020; Wusigale, 2020).

Οι πηκτίνες αποτελούνται από “ομαλές” (smooth) και “τριχωτές” (hairy) περιοχές. Οι πρώτες περιοχές αποτελούνται από μερικώς μεθοξυλιωμένες γραμμικές αλυσίδες μονάδων α-(1,4)-συνδεδεμένων D-γαλακτουρονικού οξέος, ενώ τα ουδέτερα σάκχαρα είναι είτε μικρά σε ποσότητα είτε απουσιάζουν. Οι δεύτερες περιοχές αποτελούνται από ραμνογαλακτουρονάνες I και II (Gulfi et al., 2007).

### 1.4.4.4 Λιγνίνη

Το δεύτερο κύριο συστατικό της λιγνοκυτταρικής βιομάζας είναι η λιγνίνη, η οποία βρίσκεται στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, παρέχοντας δομική στήριξη σε αυτά. Αποτελεί ένα σύνθετο τρισδιάστατο άμορφο πολυμερές, έχει βασική δομική μονάδα το φαινυλοπροπάνιο και δομείται από τις τρεις μονολιγνόλες, π-κουμαρυλική αλκοόλη, κωνιφερυλική αλκοόλη και σιναπυλική αλκοόλη. Οι αλκοόλες αυτές κατά αντιστοιχία παράγουν π-υδροξυφαινύλιο, μονάδες γουαϊακυλίου και συριγγυλίου, όταν ενσωματώνονται στο πολυμερές λιγνίνης (Withers et al., 2012; Karimov et al., 2020). Η ετερογενής της δομή περιέχει κυρίως αιθερικούς δεσμούς και δεσμούς άνθρακα-άνθρακα μεταξύ μονομερών μονάδων (Rashidi et al., 2018).

### 1.4.4.5 Πρωτεΐνες

Τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα περιέχουν δομικές πρωτεΐνες, με τις περισσότερες να εντοπίζονται στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα και λιγότερες στο δευτερογενές. Η κυριότερη κατηγορία πρωτεϊνών αποτελούν οι πρωτεΐνες HRGP (Hydroxyproline-Rich GlycoProtein), οι οποίες περιέχουν τα αμινοξέα σερίνη και υδροξυπρολίνη σε μία επαναλαμβανόμενη πεπτιδική ακολουθία (ser-(hyp)<sub>4</sub>). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι, επίσης, πλούσιες σε λυσίνη (lys) και σε τυροσίνη (tyr) (Keller, 1993).

## 1.4.5 Υδρολυτικά ένζυμα

Τα ένζυμα, ως βιοκαταλύτες που παράγονται από ζωντανά κύτταρα, καθιστούν πολλές χημικές αντιδράσεις στους οργανισμούς αποτελεσματικότερες. Σύμφωνα με το σύστημα αριθμών “Enzyme Commission” (EC), τα ένζυμα χωρίζονται σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με την ιδιότητα των αντιδράσεων που αυτά καταλύουν. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι ακόλουθες (Tao et al., 2020):

- οξειδοαναγωγάσες (EC1)
- τρανσφεράσες (EC2)

- υδρολάσες (EC3)
- λυάσες (EC4)
- ισομεράσες (EC5)
- λιγάσες (EC6)

Προκειμένου να διασπαστεί το κυτταρικό τοίχωμα, πρέπει να υδρολυθούν οι αντίστοιχοι πολυσακχαρίτες. Αυτό συμβαίνει με την βοήθεια των υδρολυτικών ενζύμων και συγκεκριμένα των κυτταρινασών, των ημικυτταρινασών, των πηκτινινασών και των πρωτεασών.

#### 1.4.5.1 Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες πρόκειται για μία σύνθετη ομάδα ενζύμων, τα οποία παράγονται από μύκητες, ακτινομύκητες, βακτήρια, πρωτόζωα, φυτά και ζώα και είναι υπεύθυνα για την κατάλυση της βιομετατροπής της κυτταρίνης σε διαλυτά σάκχαρα και γλυκόζη. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας αυτής καθορίζεται από τη συνεργιστική δράση τριών κύριων ενζύμων (Bhat & Bhat, 1997):

- τις ένδο-1,4-β-γλουκανάσες (EC 3.2.1.4)
- τις έξω-1,4-β-D-γλουκανάσες (EC 3.2.1.74) ή (EC 3.2.1.91)
- τις β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21)

Η ένδο-γλουκανάση συνήθως προσβάλλει τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης και συγκεκριμένα σε χαλαρά συνδεδεμένους εσωτερικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να δημιουργεί νέα ελεύθερα άκρα. Η έξω-γλουκανάση δρα στα αναγωγικά ή μη αναγωγικά άκρα, απελευθερώνοντας μόρια γλυκόζης ή κελλοβιόζης. Όσον αφορά τη β-γλυκοζιδάση, υδρολύει την κελλοβιόζη σε γλυκόζη από τα μη αναγωγικά άκρα (Jayasekara & Ratnayake, 2019).

Συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες δρα και μία νέα κατηγορία ενζύμων, που ονομάζονται λυτικές μονοοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic Polysaccharide Monooxygenases, LPMOs), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απόδοση της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ουσιαστικά οι LPMOs αποικοδομούν την κυτταρίνη μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει μοριακούς δότες οξυγόνου και ηλεκτρονίων (Houfani et al., 2020).

#### 1.4.5.2 Ημικυτταρινάσες

Οι ημικυτταρινάσες πρόκειται για μια ομάδα ενζύμων που υδρολύουν την ημικυτταρίνη. Λόγω της πολύπλοκης και ετερογενούς δομής της τελευταίας, απαιτείται η συνεργιστική δράση πολλών ημικυτταρινασών προκειμένου να αποικοδομηθεί πλήρως. Καθώς η ξυλάνη είναι το μεγαλύτερο συστατικό της κυτταρίνης, η ξυλανάση θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα ημικυτταρινολυτικά ένζυμα και υδρολύει τον δεσμό β-1,4, απελευθερώνοντας ξυλόζη. Σημαντική ημικυτταρίνη θεωρείται επίσης και η β-μαννανάση, η οποία υδρολύει ημικυτταρίνες με βάση τη μαννάνη και απελευθερώνει β-1,4-μαννο-ολιγομερή (Shallom & Shoham, 2003; Souza & Kawaguti, 2021).

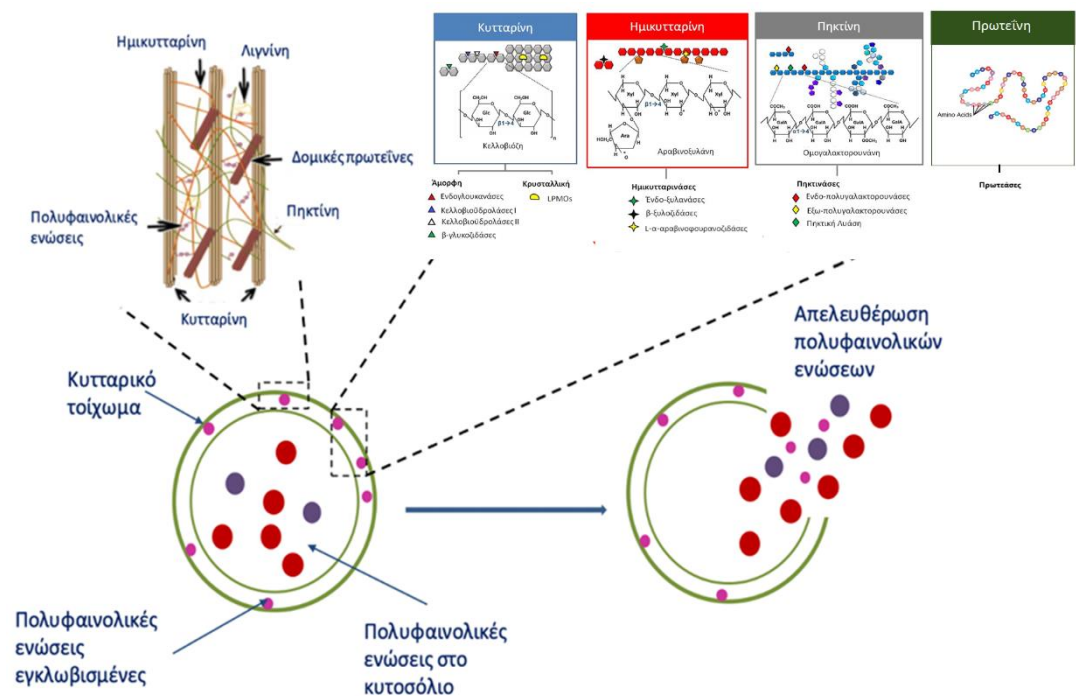
### 1.4.5.3 Πηκτινάσες

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα παράγονται από βακτήρια, ζύμες, μύκητες και φυτά και καταλύουν τη διάσπαση υποστρωμάτων που περιέχουν πηκτίνη. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και παράγονται από βακτήρια, ζύμες, μύκητες και φυτά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πηκτινασών αποτελούν η πολυμεθυλογαλακτουρονάση (PMG), η πολυγαλακτουρονάση (PG), η πηκτική λύαση (PL) και πηκτινοεστεράση (PE) (Sharma et al., 2013). Η πολυγαλακτουρονάση (PG) είναι ένα από τα κυριότερα πηκτινολυτικά ένζυμα και υδρολύει τον α-(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ μονάδων γαλακτουρονικού οξέος. Διακρίνεται σε ένδο-πολυγαλακτορουνάση και έξω-πολυγαλακτορουνάση (Burns, 1991).

### 1.4.5.4 Πρωτεάσες

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, γνωστά ως πρωτεάσες ή πεπτιδάσες, καταλύουν την ενζυμική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα οι τελευταίες να διασπώνται σε πεπτίδια και στη συνέχεια σε αμινοξέα. Παράγονται από θηλαστικά, ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, ζώα και ορισμένα φυτά. Η ομαδοποίησή τους μπορεί να γίνει με διάφορα κριτήρια, όπως την πηγή παραγωγής, τις λεπτομέρειες της καταλυόμενης αντίδρασης, τον μηχανισμό δράσης, την ομολογία και τη μοριακή δομή (Lubek-Nguyen et al., 2022). Δύο κύριες ομάδες, στις οποίες διακρίνονται, είναι οι εξωπεπτιδάσες και οι ενδοπεπτιδάσες. Οι πρώτες στοχεύουν στα άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, ενώ οι δεύτερες στις εσωτερικές περιοχές αυτών (Barrett, 1994).

Η υδρόλυση των συστατικών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος από τα προαναφερθέντα ένζυμα, οδηγεί στη διάρρηξη της μήτρας του κυττάρου και κατ' επέκταση στην πρόσβαση στις βιοδραστικές ενώσεις, που βρίσκονται μέσα στους κυτταροπλασματικούς χώρους-κυτοσόλιο και σε αυτές, που συνδέονται με τα κυτταρικά τοιχώματα (Gligor et al., 2019). Στην Εικόνα 8 απεικονίζεται η θέση των κύριων πολυσακχαριτών, της λιγνίνης και των πρωτεϊνών στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και η δράση των κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, πηκτινασών και πρωτεασών για την υδρόλυση των συστατικών αυτών, με σκοπό την απελευθέρωση πολυφαινολικών ουσιών.



Εικόνα 8: Η δράση των κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, πηκτινασών και των πρωτεασών για την υδρόλυση της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης, πηκτίνης και πρωτεΐνης αντίστοιχα, με στόχο την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών και την απελευθέρωση πολυφαινολικών ενώσεων (Gligor et al., 2019; Nadal et al., 2018; Giovannoni et al., 2020)

### 1.4.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την ΕΥΕ

Η απόδοση της ΕΥΕ επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, με βασικότερους το είδος του ενζύμου, το pH, τη θερμοκρασία, το ενζυμικό φορτίο, το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία στερεού-υγρού και το μέγεθος των σωματιδίων. Ο κάθε παράγοντας έχει διαφορετική επίδραση στην απόδοση της ΕΥΕ και στόχος αποτελεί η βελτιστοποίηση του καθενός, συνδυαστικά πάντα με τους υπόλοιπους παράγοντες.

#### Είδος ενζυμικού σκευάσματος

Όπως εξηγείται και στην προηγούμενη υποενότητα, τα υδρολυτικά ένζυμα, με κυριότερα τις κυτταρινάσες, τις ημικυτταρινάσες, τις πηκτινάσες και τις πρωτεάσες, παρουσιάζουν αυστηρή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να είναι σε θέση να υδρολύσουν συγκεκριμένα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο, προκειμένου να επέλθει ο πλήρης κατακερματισμός του κυτταρικού τοιχώματος, απαιτείται τα επιλεγμένα ένζυμα να παρουσιάζουν συμπληρωματικές δραστηριότητες (Gligor et al., 2019). Συγκεκριμένα η συνεργιστική δράση ενζύμων, διαφορετικών ενεργοτήτων και μηχανισμών δράσεων, στις περισσότερες περιπτώσεις αποικοδομεί το κυτταρικό τοίχωμα, επιτρέποντες σε περισσότερες βιοδραστικές ενώσεις να απελευθερωθούν στο εκχύλισμα. Έτσι η ΕΥΕ καθίσταται αποτελεσματικότερη (de Queirós et al., 2021). Ωστόσο δεν είναι σίγουρο, ότι κάθε ενζυμικό μείγμα θα επιφέρει αυξημένη ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων, καθώς έχουν υπάρξει και περιπτώσεις όπου τα ένζυμα προσροφήθηκαν ανταγωνιστικά στους

πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, μειώνοντας έτσι την απόδοση της εκχύλισης (Gligor et al., 2019).

Άρα η επιλογή του ενζυμικού σκευάσματος πρέπει να γίνεται αναφορικά με την φυτική πρώτη ύλη, έτσι ώστε να μπορέσει να δράσει με τέτοιο τρόπο, με το οποίο θα επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων.

### *pH*

Τα ένζυμα είναι ενεργά σε ένα περιορισμένο εύρος pH, εντός του οποίου υπάρχει το βέλτιστο pH ( $pH_{\text{optimum}}$ ), όπου συνήθως παρατηρείται η μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα. Η απομάκρυνση από το εύρος του βέλτιστου pH οδηγεί σε απώλειες στην ενζυμική ενεργότητα, καθώς επηρεάζεται ο ιονισμός ομάδων του ενζύμου, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δέσμευση του υποστρώματος με αυτό. Ουσιαστικά επηρεάζεται η χωρική δομή του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της καταλυτικής δυνατότητας αυτού.<sup>[43]</sup> Σε περιπτώσεις ακραίων τιμών pH μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετουσίωση του ενζύμου, δηλαδή η πλήρης αδρανοποίησή του (Jahromi et al., 2011). Το βέλτιστο pH για κάθε ένζυμο είναι διαφορετικό, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται στο εύρος του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικής φύσεως και οι πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά αδιάλυτες σε αυτό το εύρος του pH, η απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της EYE μπορεί να παρεμποδιστεί (Frankenberger & Johanson, 1982).

Επιπλέον βάσει μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι οι πολυσακχαρίτες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος αλλάζουν δομή και δυναμική σε πιο όξινα pH.<sup>[46]</sup> Ουσιαστικά ένα όξινο μέσο εκχύλισης αποσταθεροποιεί τους δεσμούς, με αποτέλεσμα να την αυξημένη πλαστικότητα του κυτταρικού τοιχώματος (Gligor et al., 2019). Έτσι ο χωρικός διαχωρισμός των πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα είναι μεγαλύτερος, γεγονός που τους καθιστά υψηλότερα προσβάσιμους στο νερό. Η υψηλότερη προσβασιμότητα στο νερό υποδηλώνει ότι η κυτταρίνη και οι πηκτίνες διαχωρίζονται περισσότερο στο όξινο κυτταρικό τοίχωμα, κάτι που κατά την εκτέλεση της EYE θα αύξανε την απόδοσή της (Phyo et al. 2019).

Το pH λοιπόν αποτελεί μία πολύ σημαντική παράμετρος, που πρέπει να ρυθμιστεί στην EYE, καθώς το ένζυμο πρέπει από τη μία να είναι σταθερό στην τιμή αυτή αλλά και να μπορεί να διαλυθεί. Προτιμώνται επίσης τιμές pH, στις οποίες το κυτταρικό τοίχωμα να υδρολύεται πιο εύκολα. Είναι προφανές ότι στην περίπτωση συνεργιστικής δράσης δύο ή περισσότερων ενζύμων για την EYE, επιλέγεται ένα pH που να ενδείκνυται για όσο ένζυμο χρησιμοποιούνται.

### *Θερμοκρασία*

Η δραστηριότητα των ενζύμων σε χαμηλή θερμοκρασία είναι αργή, καθώς η κινητική ενέργεια των μορίων, τόσο των ενζύμων όσο και των υποστρωμάτων, είναι χαμηλότερη με αποτέλεσμα να υπάρχουν λιγότερες επιτυχείς συγκρούσεις μεταξύ τους. Με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται και αύξηση της κινητικής ενέργειας των μορίων και κατ'επέκταση αύξηση των συγκρούσεων. Αυτό οδηγεί σε μία αποτελεσματικότερη διεργασία, μέχρι τη βέλτιστη θερμοκρασία ( $T_{\text{optimum}}$ ), όπου μεγιστοποιείται η ενζυμική δράση. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες από αυτή εντοπίζεται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, καθώς η δομή του ενζύμου ξεκινάει να αποσταθεροποιείται. Σε ακόμη μεγαλύτερες τιμές



παρατηρείται μετουσίωση του ενζύμου, με αποτέλεσμα αυτό να χάνει τελείως την καταλυτική του ικανότητα (Daniel et al., 2008).

Η θερμοκρασία εκχύλισης συνδέεται επίσης και με τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας στο εκχυλιστικό μέσο. Ουσιαστικά το ιξώδες του μέσου μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα οι πολυσακχαρίτες να διαλυτοποιούνται πιο εύκολα. Κατ' επέκταση η ταχύτητα εξαγωγής και οι ρεολογικές ιδιότητες των διαλυτοποιημένων βιοδραστικών ενώσεων αυξάνονται και συνεπώς αυξάνεται και η απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, οι υπερβολικά αυξημένες τιμές της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσουν στην διακοπή των διεργασιών υδρόλυσης και τη διάσπαση των βιοδραστικών ενώσεων (Gligor et al., 2019; Yin et al., 2011).

Η θερμοκρασία είναι και αυτή μία καταλυτική παράμετρος για την EYE, καθώς απαιτείται αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα στην τιμή αυτή προκειμένου και η απόδοση της εκχύλισης να είναι αυξημένη. Επίσης ενδείκνυται θερμοκρασίες, οι οποίες ενισχύουν τους ρυθμούς μεταφοράς μάζας και τη διαλυτότητα των εκχυλισμένων βιοδραστικών ενώσεων.

#### *Ενζυμικό φορτίο*

Το ενζυμικό φορτίο αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα, που επηρεάζει την EYE. Γενικά φαίνεται ότι η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου επιφέρει αύξηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων και κατ' επέκταση αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Ωστόσο από μία τιμή ενζυμικού φορτίου και πάνω, η ποσότητα των ουσιών που εκχυλίζονται είναι περίπου σταθερή (Yin et al., 2011).

Μελέτες για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος δείχνουν ότι σε περίπτωση χρήσης παραπάνω από ενός ενζύμου, το φορτίο του κάθε ενός εξαρτάται έντονα από τον πολυσακχαρίτη που εκχυλίζεται. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η συνεργιστική δράση επέφερε καλύτερα αποτέλεσμα, οπότε το ενζυμικό φορτίο για κάθε ένζυμο θα είναι μικρότερο από το αντίστοιχο σε περίπτωση μη συνεργιστικής δράσης (Hu et al., 2011).

#### *Χρόνος εκχύλισης*

Ο χρόνος εκχύλισης φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την απόδοση της EYE, καθώς όσο μεγαλύτερος είναι τόσο περισσότερες βιοδραστικές ουσίες εκχυλίζονται και κατ' επέκταση τόσο μεγαλύτερη απόδοση έχει η διεργασία. Ωστόσο μελέτες αποδεικνύουν ότι από ένα χρονικό σημείο και έπειτα, η απόδοση της EYE διατηρεί μία δυναμική ισορροπία καθιστώντας το χρονικό σημείο αυτό ως βέλτιστη τιμή για τον χρόνο εκχύλισης. <sup>[43,49]</sup> Σημειώνεται πως κάποιες φορές η λειτουργία σε μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να αλλοιώσει τους πολυσακχαρίτες και κατ' επέκταση την βιολογική τους δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της απόδοσης της εκχύλισης (Nadar et al., 2018)

Συμπληρωματικά σε αυτά, έχει παρατηρηθεί έντονη συσχέτιση ανάμεσα στο χρόνο εκχύλισης και στην ενζυμική συγκέντρωση. Συγκεκριμένα ο χρόνος μπορεί να μειωθεί μέχρι το μισό της αρχικής τιμής εάν η συγκέντρωση αυξηθεί δύο φορές (Gligor et al., 2019)

#### *Αναλογία στερεού-υγρού*

Η αναλογία στερεού-υγρού έχει σημαντικό ρόλο στην EYE, καθώς επηρεάζεται η απόδοση λόγω της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Για μικρή αναλογία και κατά συνέπεια και

μειωμένη ποσότητα υποστρώματος, προκύπτει μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Ωστόσο και για μία μεγάλη αναλογία, η οποία συνεπάγεται την υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος, εντοπίζονται δυσκολίες ανάδευσης και μείωση της υδατικής κινητής φάσης. Έτσι εμποδίζεται η πλήρης απελευθέρωση του προϊόντος από το υπόστρωμα (Wang et al., 2020).

Συνεπώς η αναλογία στερεού-υγρού επιλέγεται σε μία ενδιάμεση τιμή, προκειμένου να υπάρχει αρκετή ποσότητα για να δράσει το ένζυμο αλλά και να εξασφαλίζεται μία ικανοποιητική ανάδευση.

#### *Μέγεθος σωματιδίων-κοκκομετρία*

Το μέγεθος των σωματιδίων της πρώτης ύλης έχει αρκετή επίδραση στην EYE, καθώς η μείωσή του φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τις βιοδραστικές ενώσεις που εκχυλίζονται. Αυτό συμβαίνει διότι το μήκος διαδρομής μεταξύ των ενζύμων και των κυτταρικών συστατικών ελαττώνεται με τη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη μείωση του μεγέθους (Liu et al., 2016). Επίσης έτσι δημιουργείται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής με το διαλύτη (Ranveer et al., 2013). Ωστόσο, για πολύ χαμηλό μέγεθος των σωματιδίων δημιουργούνται προβλήματα κατά τη διαδικασία της διήθησης ή και ακόμα προσκόλληση των σωματιδίων κατά την διάρκεια της άλεσης (Liu et al., 2016).

Συνεπώς υπάρχει μία βέλτιστη τιμή για την κοκκομετρία της πρώτης ύλης που ενδείκνυται για την EYE, συμπεριλαμβανομένων προφανώς και των υπολοίπων παραγόντων (Liu et al., 2016).

### **1.4.7 Εφαρμογές EYE**

Η EYE διαθέτει φημίζεται για τον «πράσινο» χαρακτήρα και διαθέτει ακόμα και ποικίλα άλλα πλεονεκτήματα, με αποτέλεσμα να αποτελεί ολοένα και περισσότερο αναδυόμενη τεχνολογία. Είναι γνωστή για διάφορες εφαρμογές τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα (Gligor et al., 2019).

#### **1.4.7.1 Εργαστηριακή κλίμακα**

##### *Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων*

Η EYE εφαρμόζεται για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων και παρουσιάζει αυξημένες αποδόσεις. Συγκεκριμένα έχει εφαρμοστεί στην επεξεργασία οινοποιητικών παραπροϊόντων, όπου φάνηκε να αυξάνεται η ποσότητα των διαλυτών φαινολικών ενώσεων, ενώ μειώθηκε η περιεκτικότητα σε αδιάλυτα δεσμευμένα φαινολικά, με ταυτόχρονη αύξηση της αναλογίας διαλυτών προς αδιάλυτα δεσμευμένα φαινολικά (Camargo et al., 2016). Σε μία άλλη μελέτη η EYE εφαρμόστηκε με σκοπό την ανάκτηση φαινολικών από εκχύλισμα φρούτου *Capparis spinosa*, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα, τα οποία παρουσίασαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), συγκριτικά με την εκχύλιση χωρίς ένζυμο (Qadir et al., 2022).

##### *Εκχύλιση φλαβονοειδών*

Η EYE εφαρμόζεται επίσης για την εκχύλιση φλαβονοειδών. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη στο εκχύλισμα του φρούτου *Capparis spinosa*, όπου με τη χρήση ενζυμικών σκευασμάτων το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TPC) παρουσίασε αρκετή αύξηση συγκριτικά με την

εκχύλιση απουσία ενζύμου (Qadir et al., 2022). Σε μία άλλη έρευνα για την εκχύλιση φλαβονοειδών από τα φύλλα του φυτού *Ginkgo biloba*, η EYE παρουσίασε αρκετά υψηλή απόδοση, με τα φλαβονοειδή που εκχυλίστηκαν από τρία διαφορετικά ενζυμικά σκευάσματα να υπερβαίνουν αρκετά αυτά της εκχύλισης χωρίς ένζυμο (Chen et al., 2011)

#### *Εκχύλιση πρωτεϊνών και ελαίων*

Σε έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι η EYE μπορεί να εφαρμοστεί για την εκχύλιση πρωτεϊνών και ελαίων από ελαιούχους σπόρους. Το 2004 η εφαρμογή της παρουσίασε αρκετά υψηλή απόδοση για την εκχύλιση αραβοσιτέλαιου και με τη χρήση ενζυμικών σκευασμάτων, οι αποδόσεις ήταν ακόμα υψηλότερες. Σε μία άλλη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων ενζύμων στην υδατική εκχύλιση του ελαίου και της πρωτεΐνης από σπόρους canola (*Brassica napus* L.). Συγκεκριμένα φάνηκε ότι η απόδοση της εκχύλισης του ελαίου με τη χρήση των ενζύμων ήταν υψηλότερη, συγκριτικά με την εκχύλιση χωρίς ένζυμο. Η περισσότερη πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη χρήση πρωτεολυτικού ενζύμου, ενώ τα υπόλοιπα ενζυμικά σκευάσματα δεν φάνηκε να είχαν τόσο θετική επίδραση στην εκχύλιση πρωτεϊνών (Latif et al., 2008).

#### *Εκχύλιση πολυσακχαριτών*

Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκε η EYE του πολυσακχαρίτη APS από τη ρίζα του *Astragalus mongholicus*, χρησιμοποιώντας διάφορα ένζυμα. Χρησιμοποιήθηκε μία ποικιλία ενζύμων, με ένα από αυτά να έχει την καλύτερη απόδοση εκχύλισης, ενώ τα υπόλοιπα να έχουν από μηδαμινή έως και ισχυρή επίδραση. Έχουν πραγματοποιηθεί κι άλλες αντίστοιχες μελέτες, όπως η εκχύλιση πολυσακχαριτών από τους καρπούς του *Hericium erinaceus* το 2014, η οποία παρουσίασε σημαντική αύξηση της απόδοσης όταν χρησιμοποιήθηκε ένζυμο σε σύγκριση με την εκχύλιση με ζεστό νερό (Chen et al., 2014).

### **1.4.7.2 Βιομηχανική κλίμακα**

Σε βιομηχανικό επίπεδο, η EYE είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο, ωστόσο έχει αρχίσει να βρίσκει εφαρμογές στην επεξεργασία τροφίμων, την παρασκευή θρεπτικών και καλλυντικών, καθώς και την παραγωγή βιοντίζελ (Gligor et al., 2019). Όσον αφορά τη βιομηχανία τροφίμων, ένας σημαντικός τομέας έρευνας είναι η διερεύνηση της σταθερότητας των ενζύμων και της αλληλεπίδρασής τους με άλλα τρόφιμα και φυτικά συστατικά κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση (Streimikyte et al., 2022). Ο τομέας, που προβλέπεται η EYE να χρησιμοποιηθεί αρκετά, είναι αυτός των καλλυντικών, καθώς απαιτούνται ολοένα και περισσότερα φυσικά εκχυλίσματα που παράγονται με πιο οικολογικό τρόπο (Liu et al., 2016).

Στα πλαίσια της Πράσινης Χημείας προωθείται η ανάπτυξη πράσινων διαλυτών, με σκοπό την βιωσιμότητα, την μείωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος, την εξοικονόμηση ενέργειας και την εξασφάλιση της υγείας και της ασφάλειας. Συγκεκριμένα τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids), οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents) και, πρόσφατα, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents) έρχονται να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς και τοξικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται.

Τα ιοντικά υγρά (IL) πρόκειται για άλατα που σχηματίζονται με ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν και παρουσιάζουν σημεία τήξης χαμηλότερα από τα πρώτα συστατικά τους (περίπου 100 °C). Χαρακτηρίζονται επίσης από χαμηλή πίεση ατμών, θερμική σταθερότητα, ρυθμιζόμενο ιξώδες, αναμιξιμότητα, διαλυτότητα και ικανότητα

εκχύλισης για πολλές οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) πρόκειται για μία εναλλακτική των ιοντικών υγρών (IL), καθώς έχουν παρόμοιες θερμοδυναμικές ιδιότητες με αυτούς, συντίθενται εύκολα, είναι λιγότερο επιβλαβείς για το περιβάλλον και λιγότερο τοξικοί. Αυτοί οι διαλύτες σχηματίζονται με τη συμπλοκοποίηση ενός αποδέκτη δεσμών υδρογόνου (HBA) με έναν δότη δεσμών υδρογόνου (HBD).

## 1.5 NaDES

Οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) αποτελούν εξέλιξη των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (Deep Eutectic Solvents, DES), καθώς έχουν συντεθεί από φυσικά συστατικά, συνήθως πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών. Αποτελούν καινοτομία των τελευταίων χρόνων και, σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, παρουσιάζουν πλεονεκτήματα έναντι άλλων διαλυτών, όπως οι IL και οι DES, καθώς είναι λιγότερο τοξικοί και πιο φιλικό προς το περιβάλλον (Vanda et al., 2018).

### 1.5.1 Ιστορική αναδρομή

Η ορολογία «NaDES» παρουσιάστηκε πρώτη φορά το 2011 από τους Choi et al., προσπαθώντας να ερμηνεύσουν την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις από τα φυτά. Συγκεκριμένα υπέθεσαν ότι οι μεταβολίτες αυτοί σχηματίζουν ένα τρίτο τύπου υγρού, διαφορετικό από το νερό και τα λιπίδια.<sup>[58]</sup> Περισσότεροι από 100 συνδυασμοί NaDES έχουν συντεθεί από τους Dai, Van Spronzen, Witkamp, Verpoorte και Choi το 2013, οι οποίοι φάνηκαν να είναι αρκετά αποτελεσματικότεροι στη διαλυτοποίηση των βιομορίων συγκριτικά με το νερό. Σημειώνεται ότι από το έτος 2016 παρατηρείται μία εντονότερη στροφή της επιστημονικής κοινότητας προς τους NaDES (Benvenuti et al., 2019). Μέχρι και σήμερα υπάρχουν πάνω από 150 συνδυασμοί NaDES, με κάποιους από αυτούς να εφαρμόζονται ενεργά σε διάφορες χημικές διεργασίες, όπως η εκχύλιση φυσικών συστατικών, οι ενζυματικές ή χημικές αντιδράσεις, η διαλυτοποίηση μακρομορίων για φαρμακευτικούς σκοπούς, η ανάπτυξη καλλυντικών συστατικών και για αγροχημικές χρήσεις. Γενικά η καταλληλότητα και η αποτελεσματικότητα των NaDES στις εφαρμογές αυτές καθώς και το ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προς σε αυτούς τους καθιστά από τους πλέον υποσχόμενους τύπους πράσινων διαλυτών.

### 1.5.2 Δομή και κατηγορίες

Όπως αναφέρθηκε οι NaDES, αποτελούν υποκατηγορία των DES οπότε αποτελούνται και αυτοί από έναν αποδέκτη δεσμών υδρογόνου (HBA) και έναν δότη δεσμών υδρογόνου (HBD), οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οδηγούν σε ένα νέο ευτηκτικό σύστημα, με χαμηλότερο σημείο τήξης από αυτό των επιμέρους συστατικών. Το μείγμα που προκύπτει είναι ομογενές και τα συστατικά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις, κυρίως με δεσμούς υδρογόνου, αλλά όχι μέσω ομοιοπολικών ή ιοντικών δεσμών. (Liu et al., 2018).

Για τη σύνθεση των NaDES χρησιμοποιούνται φυσικές ενώσεις, δηλαδή οργανικά οξέα και βάσεις, αμινοξέα, σάκχαρα, αλκοόλες και πολυαλκοόλες (Vanda et al., 2018). Γενικά οι NaDES μπορούν να είναι παράγωγα από  $\text{CHCl}_3$ , από οργανικά οξέα, μίγματα σακχάρων

καθώς και άλλοι συνδυασμοί, ωστόσο με βάση τα συστατικά τους χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες (Usmani et al., 2023):

1. Ιοντικοί NaDES, που συντίθενται από ένα οξύ και μια βάση
2. Ουδέτεροι NaDES μαζί με τα οξέα, που αποτελούνται από σάκχαρα ή πολυαλκοόλες και οργανικό οξύ
3. Ουδέτεροι NaDES μαζί με τις βάσεις, που αποτελούνται από σάκχαρα, πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις
4. Ουδέτεροι NaDES, που αποτελούνται μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και άλλες πολυαλκοόλες.
5. NaDES, που συντίθενται από αμινοξέα μαζί με σάκχαρα ή οργανικά οξέα

### 1.5.3 Ιδιότητες

Η παρατήρηση, η κατανόηση και η ερμηνεία των ιδιοτήτων των NaDES αφορά τους τομείς της φυσικής χημείας και της θερμοδυναμικής και προσφέρουν αρκετή καθοδήγηση για τις διάφορες διεργασίες, στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνολογία αυτή. Χαρακτηριστικές ιδιότητες των NaDES αποτελούν η ανανεωσιμότητα και η βιοαποδομησιμότητα, η αγωγιμότητα και το ιξώδες, η πολικότητα, η υδροφιλία και η υδροφοβία καθώς και οι διαλυτοποιητικές και σταθεροποιητικές ικανότητες.

#### *Ανανεωσιμότητα και βιοαποδομησιμότητα*

Βασικό προτέρημα της σύνθεσης των NaDES αποτελεί η χρήση φυσικών προϊόντων ως πρώτη ύλη, με αποτέλεσμα να μπορούν αυτοί να βιοσυντεθούν και να μεταβολιστούν από όλους τους οργανισμούς. Έτσι καθίστανται βιοσυμβατοί και ακίνδυνοι για το περιβάλλον. Επίσης οι NaDES ως λειτουργικοί διαλύτες μπορούν να ανακυκλωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν, χωρίς να επηρεάζονται χαρακτηριστικά του όπως η χρωματογραφική συμπεριφορά. Γνωστές στρατηγικές ανάκτησης των διαλυτών αυτών, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής, αποτελούν το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, οι αντιδιαλύτες, η εκχύλιση προς τα πίσω και η χρωματογραφία. Μερικές φορές η σύνθεση του NaDES απαιτεί προσθήκη μεμονωμένων συστατικών, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος της διεργασίας (Liu et al., 2018).

#### *Αγωγιμότητα και ιξώδες*

Η αγωγιμότητα και το ιξώδες του NaDES επηρεάζονται από παρόμοιους φυσικοχημικούς παράγοντες, με βασικότερο τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα σε ένα δυαδικό σύστημα NaDES η αύξηση της κινητικής ενέργειας συνεπάγεται την αύξηση της αγωγιμότητάς τους και την μείωση του ιξώδους. Αυτό συμβαίνει διότι η υψηλή κινητική ενέργεια υπερνικά την ισχύ των διαμοριακών δυνάμεων, καθιστώντας την αγωγιμότητα αντιστρόφως ανάλογη με το ιξώδες. Όσον αφορά τα τριμερή υδατικά συστήματα NaDES, η περιεκτικότητα σε νερό επηρεάζει επίσης την αγωγιμότητα και το ιξώδες. Ουσιαστικά όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε νερό αυξάνεται και η αγωγιμότητα και η ειδική αντίσταση, ενώ συνδυαστικά και με την επίδραση της θερμοκρασίας το ιξώδες μειώνεται (Liu et al., 2018).

#### *Πολικότητα*

Η πολικότητα πρόκειται για μία ιδιότητα διαλυτοποίησης, η οποία αυξάνεται με την αύξηση των διαμοριακών δυνάμεων. Για να μπορέσουν να προσδιοριστούν τα διαστήματα

πολικότητας του NaDES, γίνεται συνήθως αναφορά σε ένα πρότυπο. Όπως και στην περίπτωση της αγωγιμότητας και του ιξώδους, η περιεκτικότητα σε νερό επηρεάζει και την πολικότητα του NaDES. Συγκεκριμένα σε τριμερή συστήματα NaDES, η λιγότερη περιεκτικότητα σε νερό συνεπάγεται τον σχηματισμό διάταξης υψηλότερης τάξης στη μήτρα, γεγονός που αντιστοιχεί σε υψηλότερη πολικότητα (Liu et al., 2018).

#### *Υδροφιλία και υδροφοβία*

Οι NaDES περιλαμβάνουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα συστατικά. Από τη μία τα υδρόφιλα συστατικά με άκρως ηλεκτραρνητικές ομάδες μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου μέσω ειδικών περιπτώσεων αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου και κατ' επέκταση να αναμιγνύονται με πολικούς διαλύτες. Αντίθετα οι λιπόφιλες ενώσεις δεν συμμετέχουν ενεργά στο φαινόμενο της ισορροπίας υδροφιλίας/λιποφιλίας, λόγω των διαφορών στην ικανότητά τους να δεσμεύουν υδρογόνο μέσω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Συνεπώς η ισορροπία υδροφιλίας/λιποφιλικότητας των ευτηκτικών μειγμάτων πρέπει να μετράται μεμονωμένα (Liu et al., 2018).

#### *Διαλυτοποιητικές και σταθεροποιητικές ικανότητες*

Οι NaDES επιδρούν στη διαλυτότητα και τη σταθερότητα μιας διαλυμένης ουσίας επάγοντας ή αποτρέποντας ορισμένες μοριακές ενώσεις, μέσω των μοναδικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων ή διατάξεων της μήτρας. Τα χαρακτηριστικά αυτά εξηγούνται βάσει δύο θεωριών: τη θεωρία των οπών ή υγρών κρυστάλλων και τη θεωρία δέσμευσης. Σύμφωνα με την πρώτη σχηματίζεται μία μήτρα εντός του NaDES, η οποία έχει τη μορφή ενός πολυμερούς, με αποτέλεσμα η διαλυμένη ουσία να μπορεί να διαλυθεί στο χώρο αυτού του μοριακού δικτύου. Έτσι η εσωτερική διάταξη, όπως το μέγεθος και το σχήμα της μήτρας, υφίστανται σημαντική τροποποίηση. Σύμφωνα με τη θεωρία δέσμευσης, οι διαλυμένες ουσίες-στόχοι γίνονται στην πραγματικότητα τμήματα της μήτρας του διαλύτη μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί αλλαγή σε ορισμένες ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας-στόχου, λόγω της αλληλεπίδρασης του διαμοριακού δεσμού (Liu et al., 2018).

### **1.5.4 Εφαρμογές**

Οι NaDES παρουσιάζουν αρκετές ιδιότητες, οι οποίες τους καθιστούν ικανούς σε πολλές εφαρμογές.

#### *Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων*

Οι NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές για την εκχύλιση διάφορων βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά κύτταρα και αγροτικά παραπροϊόντα. Στις βιοδραστικές αυτές ενώσεις συγκαταλέγονται τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα τερπενοειδή, το καφεϊκό οξύ, αρωματικές ενώσεις καθώς και διάφορα λιπαρά οξέα και παράγωγά τους. Τα αποτελέσματα εμφάνισαν αρκετά ικανοποιητική απόδοση για όλες τις εκχυλίσεις και σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα η απόδοση ήταν υψηλότερη απ' ό,τι στην εκχύλιση με άλλους διαλύτες, όπως MeOH, νερό και διοξάνιο (Freitas et al., 2022 & Ünlü, 2021).

### *Φαρμακευτικές εφαρμογές*

Η ανάπτυξη των φαρμάκων στον φαρμακευτικό τομέα απαιτεί τη διαλυτοποίηση αυτών σε κατάλληλες δόσεις σε ασφαλή, μη τοξικά, συμβατά μέσα. Καθώς οι NaDES μπορούν να διαλυτοποιούν ελάχιστα υδατοδιαλυτές ενώσεις στα φυτά, προτάθηκε η χρήση αυτών ως έκδοχα που ενισχύουν την διαλυτότητα. Έτσι πραγματοποιήθηκε μελέτη για τη χρήση ενός NaDES για τη διαλυτοποίηση λιπόφιλων μορίων και τη φόρτωσή τους σε μια υδρογέλη. Ο αυθόρμητος διαχωρισμός της υδρογέλης και του διαλύτη επέτρεψε στις φορτωμένες υδρογέλες να χορηγηθούν επιτυχώς, με αποτέλεσμα οι λιπόφιλοι μεταβολίτες, που απελευθερώθηκαν στον γαστρεντερικό σωλήνα, να απορροφηθούν εύκολα. Ο μηχανισμός παροχής που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να υπάρξει ως ένας τρόπος δυνητικής βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας λιπόφιλων μεταβολιτών. Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη από τους έδειξε ότι τα ίδια τα βιοδραστικά ή φαρμακευτικά συστατικά μπορούν να σχηματίσουν ένα NaDES. (Vanda et al., 2019).

### *Βιοϊατρικές εφαρμογές*

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι οι NaDES μπορούν να αντικαταστήσουν οργανικούς διαλύτες ως διαλυτικά μέσα σε βιολογικούς προσδιορισμούς. Στις εφαρμογές που έχουν αναφερθεί, έχει πραγματοποιηθεί αραιώση των διαλυμάτων NaDES μέχρι το σημείο στο οποίο διαταράσσεται η μήτρα αυτών. Στο σημείο αυτό χάνεται η διαλυτοποιητική και σταθεροποιητική ικανότητα των NaDES, με αποτέλεσμα η πραγματική βιοδραστικότητα της αναλύμενης ουσίας-στόχου να μην μπορεί να προσδιοριστεί. Ωστόσο η ευκολία στη διάσπαση της μήτρας υποδηλώνει ότι οι NaDES μπορούν να έχουν εφαρμογή σε σκευάσματα μικρών μορίων (Liu et al., 2018).

### *Χρήση ως χρωματογραφικά μέσα*

Ορισμένοι NaDES μπορούν να λειτουργήσουν ως χρωματογραφικά μέσα, διαχωρίζοντας τις αναλύμενες ουσίες-στόχους σε χωριστές συγκεντρωμένες ζώνες σε κατάλληλη απόσταση. Σε διάφορες χρωματογραφικές στρατηγικές μπορούν να αποτελέσουν την κινητή φάση, επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό των φυσικών προϊόντων (Liu et al., 2018). Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά είδη NaDES ως κύριο συστατικό στην HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι NaDES είχαν αρκετά καλή απόδοση, μεταξύ αυτής των οργανικών διαλυτών ACN και MeOH, που είναι οι δύο πιο χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες στην HPLC (Sutton et al., 2018).

Σύμφωνα με τα παραπάνω παραδείγματα, φαίνεται ότι οι NaDES αναδεικνύονται ολοένα και περισσότερο ως φιλικές προς το περιβάλλον λύσεις και γι' αυτό το λόγο δοκιμάζονται σε διάφορες διεργασίες. Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στην χρήση των NaDES στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (EYE).

## 1.6 EYE και NaDES

Η ενσωμάτωση των NaDES στην διαδικασία της EYE αποτελεί μία καινοτομία των τελευταίων χρόνων και παρουσιάζει μία συνεργιστική προσέγγιση στην απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος. Η καινοτομία αυτή βασίζεται πρωτίστως στα πολλαπλά πλεονεκτήματα των NaDES, με χαρακτηριστικότερα την απλότητα, το χαμηλό κόστος και τη χαμηλή ενεργειακή σύνθεση, την ικανότητα αποικοδόμησης χωρίς επιβλαβή προϊόντα. Είναι επίσης μη τοξικοί και μη πτητικοί διαλύτες και μπορούν να ανακυκλωθούν. Η EYE χαρακτηρίζεται από ήπιες συνθήκες αντίδρασης και βασίζεται στη χρήση ενζύμων, συνεπώς η σύζευξη της μεθόδου αυτής με έναν διαλύτη, όπως ο NaDES, φαίνεται να αποτελεί μία φιλική προς το περιβάλλον διεργασία.

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί η δυνατότητα του NaDES να μπορεί να ανακτά βιοδραστικές ενώσεις, όπου έχει αποδειχθεί ότι χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά για τον σκοπό αυτόν. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ανάκτηση φλαβονοειδών από το *Flos sophorae*, ανθοκυανίνης από το *Catharanthus roseus*, φαινολικών και φλαβονοειδών από τα *Moringaleaves* καθώς και φλαβονοειδή και οργανικό οξύ από το λουλούδι *Hibiscus manihot* L. Στα πλαίσια της παρατήρησης αυτής πραγματοποιήθηκε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση για τη βελτίωση της ανάκτησης τανινών, φλαβονοειδών και τερπενοειδών από χρησιμοποιημένα φύλλα τσαγιού σε μορφή πούδρας (UTPL). Ως ενζυμικό σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε το Cellulast και ως διαλύτες τριμερή συστήματα NaDES. Ο χρόνος εκχύλισης, το ενζυμικό φορτίο και η αναλογία υγρού προς στερεό ήταν μεταβλητά, ενώ η θερμοκρασία σταθερή στους 50°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση εκχύλισης τανινών, φλαβονοειδών και τερπενοειδών έφτασε στο υψηλότερο επίπεδο καθώς η αναλογία υγρού προς στερεό αυξήθηκε από 10 σε 40 mL/g, καθώς έτσι ενισχύεται η επαφή μεταξύ του Cellulast και του UTPL. Κατ' επέκταση αυξάνεται η υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος και προάγεται ο ρυθμός υδρόλυσης της κυτταρίνης. Για αναλογία υγρού προς στερεό 50 mL/g τα TTAC (ολικό περιεχόμενο σε τανίνες) και TFC (ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών) μειώθηκαν, ενώ το TTC (ολικό περιεχόμενο σε τερπενοειδή) παρέμεινε σταθερό. Η μείωση της απόδοσης εκχύλισης τανινών και φλαβονοειδών αποδόθηκε στον χαμηλό ρυθμό μεταφοράς μάζας και στην καθίζηση του UTPL. Καθώς η συγκέντρωση του ενζύμου αυξήθηκε από 0 σε 25 U/g, τα TTAC, TFC και TTC παρουσίασαν αύξηση, διότι αυξάνεται ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου στα μέσα εκχύλισης, προάγοντας την ταχύτητα υδρόλυσης της κυτταρίνης. Ουσιαστικά φθείρονται ευκολότερα τα κυτταρικά τοιχώματα, αυξάνεται η διαπερατότητα διαλύτη και έτσι εκχυλίζονται περισσότερες ενώσεις. Όσον αφορά τον χρόνο εκχύλισης, φάνηκε ότι τα 90 λεπτά ήταν το σημείο ισορροπίας (Vo et al., 2023).

Μία άλλη έρευνα είχε σκοπό την ανάπτυξη μιας βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας EYE για την εκχύλιση καροτενοειδών και φαινολικών ενώσεων από απόβλητα ηλίανθου *Helianthus annuus* L. (πέταλα και άνθη) χρησιμοποιώντας διάφορους υδρόφοβους NaDES. Ως ενζυμικό σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε το Viscozyme®, προκειμένου να διασπαστεί το κυτταρικό τοίχωμα των πετάλων και των ανθέων. Η εκχύλιση έλαβε χώρα για δύο ώρες στους 40 °C. Διερευνήθηκε η επίδραση του λόγου του διαλύτη προς το νερό, του λόγου της πρώτης ύλης προς το υγρό και του ενζυμικού φορτίου. Για την εκχύλιση των καροτενοειδών, ο ευτηκτικός διαλύτης D,L-μενθόλη:D,L-γαλακτικό οξύ (M:HLac) (1:2) φάνηκε να είναι ο καλύτερος, καθώς εκχυλίστηκαν 147 ppm καροτενοειδών, ενώ με πρότυπο διαλύτη το n-εξάνιο εκχυλίστηκαν 115 ppm. Παρουσία του ενζύμου Viscozyme®, τα καροτενοειδή που εκχυλίστηκαν με τον διαλύτη M:HLac είχαν συγκέντρωση 335 ppm. Όσον αφορά τις



φαινολικές ενώσεις που εκχυλίστηκαν σε NaDES παρουσία ενζύμου, παρουσίασαν μεν αύξηση συγκριτικά με την εκχύλιση χωρίς ένζυμο (από 27% έως 45%), ωστόσο μικρότερη από αυτήν που παρουσίασαν στην εκχύλιση καροτενοειδών. Αντίθετα στην περίπτωση των υπόλοιπων διαλυτών η αύξηση ήταν σαφώς μεγαλύτερη (από 72% έως 127%). Ωστόσο και πάλι το M:HLac είχε εξαιρετική απόδοση στην εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων στην υδατική φάση (Ricarte et al., 2020).

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, προκύπτει ότι η χρήση NaDES είναι πολλά υποσχόμενη στην εφαρμογή της EYE, καθώς μπορούν να ανακτηθούν περισσότερες βιοδραστικές ενώσεις και να προκύψει ένα εκχύλισμα αυξημένης ποιότητας και ποσότητας. Βασικός παράγοντας αποτελεί η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του διαλύτη, προκειμένου το ένζυμο να παραμένει ενεργό σε αυτόν και κατ' επέκταση να μπορεί να υδρολύσει αποτελεσματικότερα το κυτταρικό τοίχωμα. Συμπερασματικά, η χρήση NaDES στην EYE δεν κρίνεται μόνο ως μία φιλικότερη προς το περιβάλλον διεργασία, αλλά και ως μία επιλογή ικανότερου μέσου εκχύλισης και καταλληλότερου περιβάλλοντος για τη διατήρηση του ενζύμου (Vo et al., 2023; Ricarte et al., 2020).

## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Ενζυμικό σκεύασμα, πρώτη ύλη, αντιδραστήρια και όργανα/συσκευές

#### Ένζυμο

Το ενζυμικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι το πρωτεολυτικό ενζυμικό σκεύασμα Neutrase® της εταιρίας Novozymes. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται η σύσταση, η ενεργότητα και οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζυμικού σκευάσματος.

Πίνακας 1: Σύσταση, ενεργότητα και βέλτιστες συνθήκες χρήσης του ενζυμικού σκευάσματος Neutrase®

Εμπορική ονομασία	EC	Είδος ενζύμου Κύρια δράση	Βέλτιστες συνθήκες (T, pH)	Ενεργότητα
Neutrase®	3.4.22	Πρωτεάση	40-50°C 7	0.8 AU/g

#### Πρώτη ύλη

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν το αποξηραμένο περικάρπιο του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, το οποίο προμηθεύτηκε από τον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό-Δήμητρα (ΕΛΓΟ-Δήμητρα). Η προεπεξεργασία του αποξηραμένου περικάρπιου του καρπού περιλαμβάνει το άλεσμα και το κοσκίνισμά του, έτσι ώστε το μέγεθος των κόκκων να είναι μικρότερο των 500 μm. Η πούδρα, που προέκυψε, αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκιερό μέρος.

#### Αντιδραστήρια

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ονομασίες των αντιδραστηρίων, που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι εταιρείες, από τις οποίες παρέχεται το κάθε ένα από αυτά.

Πίνακας 2: Κατάλογος αντιδραστηρίων

Ονομασία αντιδραστηρίου	Εταιρεία
DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο)	Sigma-Aldrich
L-DOPA	Sigma-Aldrich
pNPG	Sigma-Aldrich
A-γλυκοζιδάση	Sigma-Aldrich
Αζοκαζεΐνη (Azocasein)	Sigma-Aldrich
Ανθρακικό Νάτριο (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Acros Organics (Thermo Scientific)
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	CARLO ERBA Reagents GmbH
Βεταΐνη ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> )	Sigma-Aldrich
Γλυκερόλη (HOCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH)	Sigma-Aldrich
Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Κιτρικό οξύ (HOC(COOH)(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Μεθανόλη (MeOH)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
Νιτρώδες Νάτριο (NaNO <sub>2</sub> )	Merck KGaA

Προλίνη (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Πυκνό Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	Fisher Chemical (Fischer Scientific)
Τριγλωροοξικό οξύ/TCA (Cl <sub>3</sub> CCOOH)	Sigma-Aldrich
Τυροσινάση	Sigma-Aldrich
Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)	Sigma-Aldrich
Υδροχλωρικό Trizma® (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Φρουκτόζη (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma-Aldrich
Χλωριούχο Αργίλιο (AlCl <sub>3</sub> )	Acros Organics (Thermo Scientific)

### Όργανα/συσκευές

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ονομασίες των οργάνων, που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι εταιρίες, από τις οποίες παρέχεται το κάθε ένα από αυτά.

Πίνακας 3: Κατάλογος οργάνων και συσκευών

Όνομασία οργάνου/συσκευής	Εταιρία
Vortex σωληναρίων ρυθμιζόμενο	RSLAB-6PRO, RS Lab
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	ABS 80-4N, KERN & SOHN GmbH
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	M6202, Bel Engineering®
Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο	(-)
Θερμοστατούμενος ηλεκτρικός αναδευτήρας	Thermomixer comfort with 2ml Block, Eppendorf®
Μαγνητικός αναδευτήρας –Θερμαντική πλάκα (1600 rpm, 180 °C)	Nahita-Blue 692, Auxilab S.L.
Συσκευή μέτρησης pH	pH 537, WTW
Φυγόκεντρος	TJ-6, Beckman Coulter
Φωτόμετρο microplate reader	SpectraMax® ABS Plus, MOLECULAR DEVICES
Φωτόμετρο UV-Vis	S-22 UV-Vis Spectrophotometer, BOECO

## 2.2 Πειραματική διαδικασία

### 2.2.1 Μελέτη σταθερότητας ενζύμου σε NaDES

Το πρώτο κομμάτι της παρούσας εργασίας αφορά στη μελέτη της σταθερότητας ενός πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε τρεις φυσικούς βαθέως ευθηκτικούς διαλύτες (NaDES):

A) φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό με γραμμομοριακή αναλογία συστατικών 1:1:5 αντίστοιχα με τελική τιμή pH 8,0,

B) προλίνη:γλυκερόλη με γραμμομοριακή αναλογία συστατικών 1:2 με 20% w/w συν-διαλύτη νερό με τελική τιμή pH 7,5 και

Γ) βεταΐνη:γλυκερόλη με γραμμομοριακή αναλογία συστατικών 1:3 με 20% w/w συν-διαλύτη νερό με τελική τιμή pH 7,0

Οι NaDES παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ.

### 2.2.1.1 Μελέτη θερμικής σταθερότητας

Για την μελέτη της θερμικής σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις NaDES, που παρασκευάστηκαν, και τρία ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού φωσφορικού οξέος 50 mM. Για την παρασκευή του κάθε ενός ρυθμιστικού διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος 50 mM και υδατικό διάλυμα όξινου φωσφορικού δινατρίου 50mM. Τα τρία ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν, έτσι ώστε να έχουν pH 8, 7,5 και 7, δηλαδή αντίστοιχα με τους NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό.

Η μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε πέντε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70°C. Το ένζυμο αραιώθηκε καταλλήλως στο εκάστοτε μέσο (NaDES ή ρυθμιστικό διάλυμα), τοποθετήθηκε σε κλειστές γυάλινες φιάλες και επώαστηκε σε θερμοστατούμενα υδατόλουτρα. Σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της επώασης, τα δείγματα αποσύρονταν, ψύχονταν άμεσα σε λουτρό πάγου και μετρούνταν η πρωτεολυτική τους δράση. Η εναπομείνουσα ενεργότητα σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε ως η αναλογία μεταξύ της αρχικής ενεργότητας και της ενεργότητας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απενεργοποίησης σε διαφορετικούς χρόνους. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν εις διπλούν.

### 2.2.1.2 Μέτρηση ενεργότητας πρωτεάσης

Το πρωτόκολλο μέτρησης ενεργότητας πρωτεάσης βασίζεται στη μέθοδο υδρόλυσης της αζοκαζεΐνης. Σε 2 mL διαλύματος αζοκαζεΐνης (0,2% w/v σε Tris-HCl 8) προστίθεται 50 μL αραιωμένο ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 8 ή 50 μL ρυθμιστικό διάλυμα για τη μέτρηση του τυφλού δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση του διαλύματος στους 40 °C για 10 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, προστίθεται 2 mL διαλύματος TCA 0,1 M και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια λαμβάνονται 2 mL από το υπερκείμενο και σε αυτά προστίθεται 2 mL διαλύματος NaOH 0,5 M. Το διάλυμα αναδεύεται και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στο τέλος πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 440 nm. Η αύξηση 0,1 μονάδας απορρόφησης αντιστοιχίστηκε σε 1 Unit (Navone & Spreight, 2018). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και παρουσιάστηκαν ως μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση.

### 2.2.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε NaDES

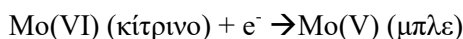
Το επόμενο κομμάτι της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις. Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων του περικαρπίου του καρπού της *Rosa Canina L.* πραγματοποιήθηκε στους τρεις προαναφερθέντες NaDES. Η συγκέντρωση του στερεού διατηρήθηκε σταθερή σε όλες τις περιπτώσεις (7% w/v). Τα ενζυμικά φορτία, που επιλέχθηκαν, ήταν 0,1, 0,5, 0,75 και 1,0 % v/v. Οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα σε thermomixer, με σταθερό ρυθμό ανάδευσης (1300 rpm) και σταθερή θερμοκρασία (40 °C). Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υπό τις ίδιες συνθήκες απουσία ενζύμου. Πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα (1, 2, 3 και 4 h). Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν (10000 rpm για 10 min) και παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο υγρό, στο οποίο μετρήθηκε το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolics Content, TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content, TFC) και η αντιοξειδωτική δράση. Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση.

### 2.2.2.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content)

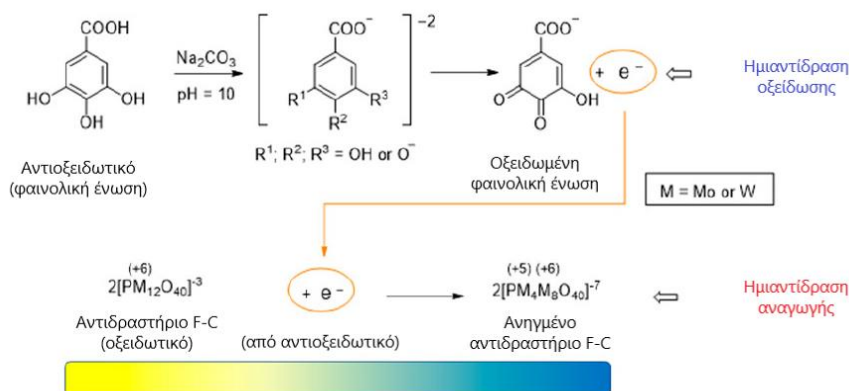
Ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του *Rosa Canina L.* πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε αλκαλικό περιβάλλον.

Η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε για πρώτη φορά το 1912 από τους Folin και Denis, προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί το φαινολικό αμινοξύ τυροσίνη. Το 1927 οι Folin και Ciocalteu έκαναν την ανάλυση πιο ευαίσθητη και λιγότερο επιρρεπή στον σχηματισμό ιζημάτων, καθιερώνοντας τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων μέχρι και σήμερα (Bärlocher & Graça 2020).

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι ένα μείγμα φωσφομολυβδαινικού και φωσφοβολφραμικού οξέος, το οποίο αντιδρά με τις φαινόλες καθώς και με οποιαδήποτε αναγωγική ουσία. Η μέθοδος, που ακολουθείται, πρόκειται για μια οξειδοαναγωγική αντίδραση, όπου μεταφέρονται ηλεκτρόνια από τις φαινολικές ενώσεις στα σύμπλοκα φωσφομολυβδαινικών/φωσφοβολφραμικών οξέων σε αλκαλικές συνθήκες. Η αντίδραση αυτή δημιουργεί μπλε σύμπλοκα στο διάλυμα, τα οποία ανιχνεύονται φασματοσκοπικά περίπου στα 760 nm. Η χημική φύση του αντιδραστηρίου F-C δεν είναι πλήρως γνωστή, ωστόσο πιστεύεται ότι το μπλε χρώμα που εμφανίζεται, οφείλεται στην αναγωγή του μολυβδαινίου (V) σε σύμπλοκο βάσει της παρακάτω αντίδρασης (Pérez et al., 2023).



Η αντίδραση οξειδοαναγωγής παρουσιάζεται και στην Εικόνα 8.



Εικόνα 9: Γενική αντίδραση οξειδοαναγωγής στη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Pérez et al., 2023)

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο F-C, χρησιμοποιείται ο νόμος Lambert-Beer και στη συνέχεια η απορρόφηση στα 760 nm βαθμονομείται βάσει της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος. Ως καμπύλες βαθμονόμησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης τα ισοδύναμα κατεχίνης, το ταννικό και το φερουλικό οξύ.

Αρχικά λαμβάνονται 50 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, στα οποία προστίθενται 3 mL απιονισμένο νερό. Έπειτα προστίθενται 250 μL αντιδραστηρίου F-C, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και αναμονή για τρία λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 750 μL κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22%) και 950 μL απιονισμένου νερού. Τέλος ακολουθεί

ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για μία ώρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκιερό μέρος. Για κάθε εκχύλισμα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται επίσης και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 50  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 50  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού. Στο τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 755 nm (Bärlocher & Graça 2020).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις, χρησιμοποιείται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι:  $y = 0,9377 * x + 0,0515$  με  $R^2 = 0,995$ , όπου  $y$  η συγκέντρωση γαλλικού οξέος σε  $\text{mg/mL}$  και  $x$  οι τιμές απορρόφησης στα 755 nm (Διάγραμμα 1 του Παραρτήματος). Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) του εκχυλίσματος υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 1:

$$TPC \left( \frac{\text{mg γαλλικού οξέος}}{\text{g}} \right) = \frac{c_{gal} \left( \frac{\text{mg γαλλικού οξέος}}{\text{mL}} \right) \cdot V_{εκχ} (\text{mL}) \cdot D}{m_{π.υ.} (\text{g})} \quad (1)$$

όπου,

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

$V_{εκχ}$ : ο όγκος εκχυλίσματος σε  $\text{mL}$

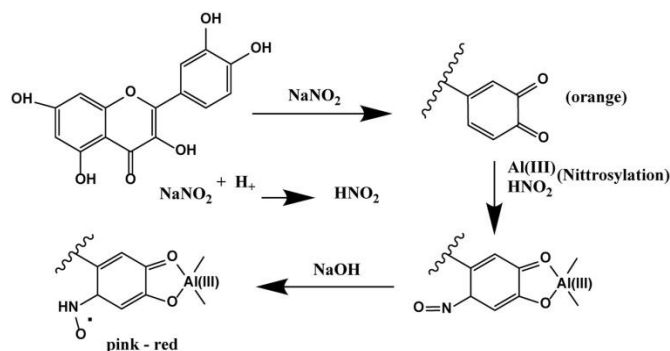
$m_{π.υ.}$ : η μάζα πρώτης ύλης (*Rosa canina L.*) σε  $\text{g}$

$D$ : ο παράγοντας αραίωσης (Dilution factor)

### 2.2.2.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών (Total Flavonoid Content)

Ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα του *Rosa Canina L.* πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της χρωματομετρικής μεθόδου του χλωριούχου αργιλίου  $\text{AlCl}_3$ . Πρόκειται για μία αρκετά γνωστή μέθοδο, που χρησιμοποιείται αρκετά στα φυτικά εκχυλίσματα.

Η μέθοδος αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Christ and Muller το 1960 για τον προσδιορισμό των παραγώνων φλαβονόλης στα φάρμακα και βασίζεται στον σχηματισμό χηλικών ενώσεων  $\text{Al(III)}$ -φλαβονοειδών. Με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιήθηκαν αρκετές μετατροπές, όπως η εισαγωγή νιτρόδους νατρίου ( $\text{NaNO}_2$ ) πριν από την προσθήκη του  $\text{AlCl}_3$ . Το  $\text{NaNO}_2$  χρησιμεύει ως παράγοντας νιτροποίησης, που εκλεκτικός για τους αρωματικούς δακτυλίους για την παραγωγή ενός παραγώγου φλαβονοειδούς-νιτροξυλίου, που εμφανίζει μία νέα ζώνη απορρόφησης στα 500 nm περίπου. Το σύμπλοκο, που σχηματίζεται μεταξύ των φλαβονοειδών και του τρισθενούς ιόντος αργιλίου, είναι αρχικά κίτρινου χρώματος, το οποίο με την προσθήκη αλκαλικού διαλύματος καυστικού νατρίου ( $\text{NaOH}$ ) μετατρέπεται σε ροζ-ερυθρό (Shraim et al., 2021). Η πορεία της αντίδρασης παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 10: Συμπλοκοποίηση Al(III)-φλαβονοειδών παρουσία NaNO<sub>2</sub> (Shraim et al., 2021)

Η βασική αρχή της χρωματομετρικής αυτής μεθόδου είναι ότι το AlCl<sub>3</sub> σχηματίζει σε όξινο pH σταθερά σύμπλοκα με την καρβονυλομάδα στο άτομο C-4 και με την ομάδα υδροξυλίου στα άτομα C-3 ή C-5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επίσης σχηματίζει ασταθή συμπλέγματα σε όξινες συνθήκες, με τις ορθο-διϋδροξυλομάδες στον δακτύλιο A ή B των φλαβονοειδών (Ahmed & Iqbal, 2018).

Αρχικά λαμβάνονται 100 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, στα οποία προστίθενται 60 μL διαλύματος NaNO<sub>2</sub> (5%). Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και στη συνέχεια αναμονή για έξι λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 120 μL διαλύματος AlCl<sub>3</sub> (10%). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για πέντε λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 600 μL διαλύματος NaOH (1M) και 1200 μL απιονισμένου νερού. Τέλος, πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για δεκαπέντε λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκιερό μέρος. Για κάθε εκχύλισμα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται επίσης και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 100 μL εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 100 μL απιονισμένου νερού. Στο τέλος, μετρίεται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 510 nm (Ahmed & Iqbal, 2018).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις, χρησιμοποιείται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προέκυψε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι:  $y = 0,8726 * x - 0,0212$  με  $R^2 = 0,9977$ , όπου y η συγκέντρωση κατεχίνης σε mg/mL και x οι τιμές απορρόφησης στα 510 nm (Διάγραμμα 2 του Παραρτήματος). Το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) του εκχυλίσματος υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 2:

$$TFC \left( \frac{mg \text{ κατεχίνης}}{g} \right) = \frac{c_{cat} \left( \frac{mg \text{ κατεχίνης}}{mL} \right) \cdot V_{εκχ} (mL) \cdot D}{m_{π.υ.} (g)} \quad (2)$$

όπου,

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

$V_{εκχ}$ : ο όγκος εκχυλίσματος σε mL

$m_{π.υ.}$ : η μάζα πρώτης ύλης (*Rosa Canina L.*) σε g

D: ο παράγοντας αραιώσεως (Dilution factor)

### 2.2.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

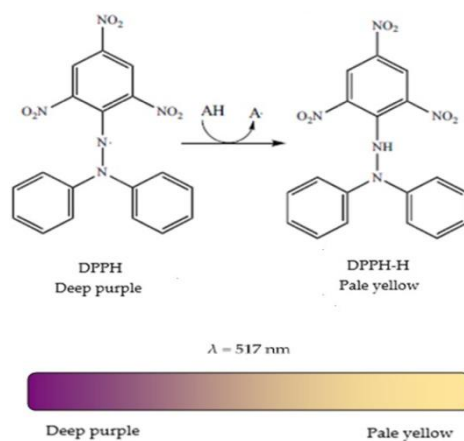
Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του *Rosa Canina L.* πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας

DPPH. Πρόκειται μία από τις γνωστότερες φασματομετρικές μεθόδους, μεταξύ των μεθόδων ABTS, ORAC και TRAP, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

Η ρίζα του DPPH ανακαλύφθηκε πριν από 100 χρόνια από τους Goldschmidt και Renn το 1922, ενώ η μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης αναπτύχθηκε το 1958 από τον Blois, χρησιμοποιώντας μια σταθερή ελεύθερη ρίζα. Χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές μετρήσεις, τις οποίες επανέλαβε και το 1995 ο Brand-Williams και η ομάδα του, καθιερώνοντας μία μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε ευρέως (Gulcin & Alwaseel, 2023).

Η ρίζα του DPPH χαρακτηρίζεται από ένα βαθύ ιώδες χρώμα, είναι σταθερή και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm στο φάσμα UV-Vis. Όταν αλληλεπιδράσει με ένα διάλυμα που περιέχει αντιοξειδωτικές ενώσεις, μεταφέρεται ένα άτομο υδρογόνου από τις τελευταίες, με αποτέλεσμα την αναγωγή της ρίζας. Έτσι δημιουργείται μία μειωμένη μορφή της ρίζας DPPH (DPPH-H), που ονομάζεται υδραζίνη, η οποία διαθέτει κίτρινο χρώμα και απορροφά λιγότερο στο ορατό φάσμα. Συνεπώς, το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο και η μείωση της χρωματικής έντασης αυτής της αντίδρασης μπορεί εύκολα να καταγραφεί με φασματοσκοπία UV-Vis (Gulcin & Alwaseel, 2023).

Η αντίδραση παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 10.



Εικόνα 11: Μεταβολή της χημικής δομής και του χρώματος του DPPH παρουσία αντιοξειδωτικού (Munteanu & Apetrei, 2021)

Η ρίζα DPPH είναι διαλυτή μόνο σε οργανικούς διαλύτες, με την μεθανόλη να είναι ένας από το διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα. Επίσης το διάλυμα DPPH παρουσιάζει φωτοευαισθησία, με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης υπό το φως (Sharma & Bhat, 2009).

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα με 2,5 mg DPPH σε 100 mL μεθανόλης. Τα δείγματα των εκχυλισμάτων αραιώνονται με απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση  $c_0$  και πραγματοποιούνται εκ νέου αραιώσεις  $0,8c_0$ ,  $0,6c_0$ ,  $0,4c_0$  και  $0,2c_0$ , προσθέτοντας δηλαδή 40, 30, 20 και 10  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα συγκέντρωσης  $c_0$  και 10, 20, 30 και 40  $\mu\text{L}$  απιονισμένο νερό αντίστοιχα. Στη συνέχεια, προστίθενται 1,950 mL διαλύματος DPPH σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για μισή ώρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκιερό μέρος. Για κάθε εκχύλισμα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται



επίσης και για την παρασκευή τυφλού δείγματος, στο οποίο αντί για 50  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος, χρησιμοποιούνται 50  $\mu\text{L}$  απιονισμένου νερού. Στο τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 515 nm (Gulcin & Alwasel, 2023).

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, σχεδιάστηκε το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων ( $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος/ mL διαλύματος). Η % αναστολή υπολογίζεται με την Εξίσωση (3):

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100\% \quad (3)$$

όπου

$A_{\text{sample}}$ : η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων με εκχύλισμα στα 515 nm

$A_{\text{blank}}$ : η τιμή της απορρόφησης του τυφλού δείγματος στα 515 nm

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτική δράσης υπολογίζεται ο δείκτης  $IC_{50}$ , ο οποίος ορίζεται ως η απαιτούμενη ποσότητα αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για να δεσμευτεί το 50% της ρίζας DPPH. Ο δείκτης  $IC_{50}$  προκύπτει από την Εξίσωση 4:

$$IC_{50} \left( \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \right) = \frac{50-b}{a} \quad (4)$$

όπου

a: η κλίση του διαγράμματος βάσει της Εξίσωσης (3)

b: η αποτέμνουσα

#### 2.2.2.4 Αναστολή της δράσης του ενζύμου τυροσινάση

Αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού οξέος 50 mM με pH 6,8. Σε ένα πλακίδιο 96 θέσεων προστίθενται 25  $\mu\text{L}$  από το εκχύλισμα, 40  $\mu\text{L}$  τυροσινάσης συγκέντρωσης 200 Units/mL, 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,8 και 40  $\mu\text{L}$  διαλύματος L-DOPA συγκέντρωσης 10 mM. Ακολουθεί επώαση για δέκα λεπτά στους 25°C. Για κάθε εκχύλισμα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Επίσης πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη διαδικασία, όπου αντί για 25  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος προστίθεται 25  $\mu\text{L}$  kojic acid, το οποίο λειτουργεί ως πρότυπο. Επιπλέον πραγματοποιείται και μία μέτρηση *sample control*, όπου προστίθενται όλες οι ουσίες εκτός του διαλύματος L-DOPA 10 mM, μία μέτρηση *negative control*, όπου προστίθενται όλες οι ουσίες χωρίς το δείγμα και μία μέτρηση *blank control*, όπου προστίθενται μόνο η τυροσινάση και το ρυθμιστικό διάλυμα. Στο τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος στα 492 nm (Orhan et al., 2012).

Για την εύρεση της % αναστολής της δράσης του ενζύμου τυροσινάση από τα εκχυλίσματα του *Rosa Canina L.*, χρησιμοποιείται η Εξίσωση (5) (Orhan et al., 2012):

$$\text{Inhibition}(\%) = \left( 1 - \frac{\Delta S_{\text{sample}}}{\Delta S_{\text{control}}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

όπου

$\Delta S_{\text{sample}} = \text{sample} - \text{sample control}$

$\Delta S_{\text{control}} = \text{negative control} - \text{blank control}$

Όπως αναφέρθηκε το *sample* αντιστοιχεί στο δείγμα, το οποίο περιέχει εκχύλισμα, τυροσινάση Units/mL, ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 και υπόστρωμα L-DOPA 10 mM, το *sample control* στο δείγμα, το οποίο δεν περιέχει υπόστρωμα L-DOPA 10 mM, το *negative control* στο δείγμα, το οποίο δεν περιέχει εκχύλισμα και το *blank control* στο δείγμα, το οποίο δεν περιέχει εκχύλισμα και υπόστρωμα L-DOPA 10 mM.

#### 2.2.2.5 Αναστολή της δράσης της α-γλυκοζιδάσης

Αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού φωσφορικού οξέος 50 mM με pH 6,8. Εξετάζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, συγκεκριμένα 1, 5, 10, 20, 30, 40 και 50 mg εκχυλίσματος ανά 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 6,8. Σε ένα πλακίδιο 96 θέσεων, προστίθεται 100  $\mu$ L από κάθε δείγμα και 50  $\mu$ L α-γλυκοζιδάσης συγκέντρωσης 0,25 Units/mL. Το διάλυμα επώαζεται για δέκα λεπτά στους 37 °C στο και έπειτα προστίθεται 50  $\mu$ L διάλυμα pNPG συγκέντρωσης 1 mM. Ακολουθεί επώαση για πέντε λεπτά στους 37 °C. Για κάθε δείγμα η διαδικασία επαναλήφθηκε εις τριπλούν. Επίσης, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη διαδικασία για την μέτρηση τυφλού δείγματος, όπου αντί για 100  $\mu$ L δείγματος χρησιμοποιούνταν 100  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος με pH 6,8. Στο τέλος, μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος στα 405 nm (Tiwari et al, 2011).

Για την εύρεση της % αναστολής της δράσης του ενζύμου α-γλυκοζιδάση από τα εκχυλίσματα του *Rosa Canina L.*, χρησιμοποιείται η Εξίσωση (6) (Tiwari et al, 2011):

$$Inhibition(\%) = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \cdot 100 \quad (6)$$

όπου

$A_{control}$ : η απορρόφηση του τυφλού δείγματος

$A_{sample}$ : η απορρόφηση του κάθε δείγματος

### 3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1 Θερμική σταθερότητα του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) και θερμοδυναμική ανάλυση

Βάσει των πειραμάτων για την μελέτη σταθερότητας του ενζύμου στους NaDES και στα ρυθμιστικά διαλύματα με αντίστοιχα pH, πραγματοποιήθηκε θερμοδυναμική ανάλυση προκειμένου να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα και να διεξαχθούν συμπεράσματα για τη σύζευξη της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης με τους NaDES.

Θεωρείται ότι η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου ακολουθεί κινητική 1<sup>ης</sup> τάξης, η οποία έχει τη γενική μορφή της Εξίσωσης (7) (Deylami et al., 2014):

$$\ln\left(\frac{[A_t]}{[A_0]}\right) = -k_d \cdot t \quad (7)$$

όπου

$A_t$ : η ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος στη χρονική στιγμή  $t$  (FPU/mL)

$A_0$ : η αρχική ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος (FPU/mL)

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

$t$ : ο χρόνος

Δημιουργώντας την αντίστοιχη γραφική παράσταση βάσει της Εξίσωσης 5, υπολογίζεται η σταθερά απενεργοποίησης  $k_d$  για το ένζυμο για κάθε θερμοκρασία. Εφόσον είναι γνωστή η  $k_d$ , μπορεί να υπολογιστεί και ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2}$  για το ένζυμο σε κάθε θερμοκρασία βάσει της Εξίσωσης (8):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (8)$$

Ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2}$  (h) αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για 50% μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.

Αντίστοιχα υπολογίζεται και ο δεκαδικός χρόνος μείωσης βάσει της Εξίσωσης (9):

$$D = \frac{\ln(10)}{k_d} \quad (9)$$

Ο χρόνος  $D$  (h) αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για 90% μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.

Μέσω του χρόνου  $D$  μπορεί να υπολογιστεί και η τιμή  $Z$ , η οποία αντιστοιχεί στη θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση της τιμής  $D$  κατά μία log-μονάδα και λαμβάνεται με τη γραφική παράσταση της τιμής  $\log(D)$  συναρτήσει της αντίστοιχης θερμοκρασίας. Η κλίση της γραμμής είναι ίση με αρνητική αντίστροφη τιμή  $Z$ , άρα έχει τη μορφή της Εξίσωσης (10) (Bindu & Mohanan, 2020; Deylami et al., 2014):

$$\text{Κλίση} = \frac{1}{Z} \quad (10)$$

Όσο μικρότερη η τιμή  $Z$ , τόσο μεγαλύτερη ευαισθησία στις θερμοκρασιακές αλλαγές έχει το σύστημα (Bustamante-Vargas et al., 2019).

Η εξάρτηση της απενεργοποίησης των ενζύμων από τη θερμοκρασία μπορεί να περιγραφεί μέσω της Εξίσωσης Arrhenius (11), η οποία έχει τη μορφή (Bustamante-Vargas et al., 2019):

$$k_d = A \cdot e^{-\frac{E_d}{R \cdot T}} \quad (11)$$

όπου,

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

$A$ : ο προεκθετικός παράγοντας ή ο συντελεστής συχνότητας ( $\text{h}^{-1}$ )

$E_d$ : η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης ( $\text{J/mol}$ )

$R$ : η παγκόσμια σταθερά αερίου ( $8,314 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$ )

$T$ : η απόλυτη θερμοκρασία ( $\text{K}$ )

Λογαριθμώντας την Εξίσωση (11), προκύπτει η γραμμικοποιημένη μορφή της Εξίσωσης Arrhenius (12), η οποία έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\ln(k_d) = -\frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (12)$$

Βάσει της Εξίσωσης (12) και έχοντας υπολογίσει τις σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου για κάθε θερμοκρασία  $T$ , υπολογίζεται η ενέργεια απενεργοποίησης  $E_d$  (Bindu & Mohanan, 2020).

Εφόσον είναι γνωστή η ενέργεια απενεργοποίησης  $E_d$ , μπορούν να υπολογιστούν η διαφορά ενθαλπίας ( $\Delta H^*$ ), η διαφορά ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G^*$ ) και η διαφορά εντροπίας ( $\Delta S^*$ ). Ο υπολογισμός γίνεται βάσει των Εξισώσεων (13), (14) και (15) (Deylami et al., 2014):

$$\Delta H^* = E_d - R \cdot T \quad (13)$$

$$\Delta G^* = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{k_d \cdot h}{k_b \cdot T}\right) \quad (14)$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \quad (15)$$

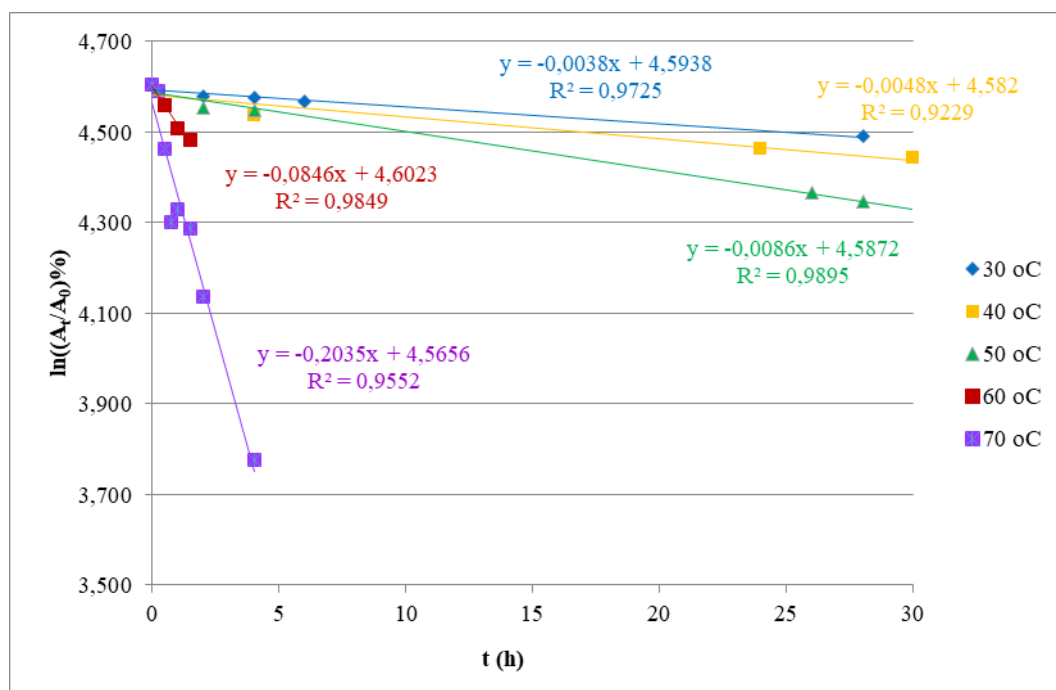
όπου

$k_b$ : η σταθερά του Boltzmann ( $1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ )

$h$ : η σταθερά του Planck ( $6,6260 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ )

### 3.1.1 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 1, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5). Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C.



Διάγραμμα 1: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5). Το  $\blacklozenge$  αντιστοιχεί στους 30 °C, το  $\blacksquare$  στους 40 °C, το  $\blacktriangle$  στους 50 °C, το  $\blacksquare$  στους 60 °C και το  $\blacksquare$  στους 70 °C.

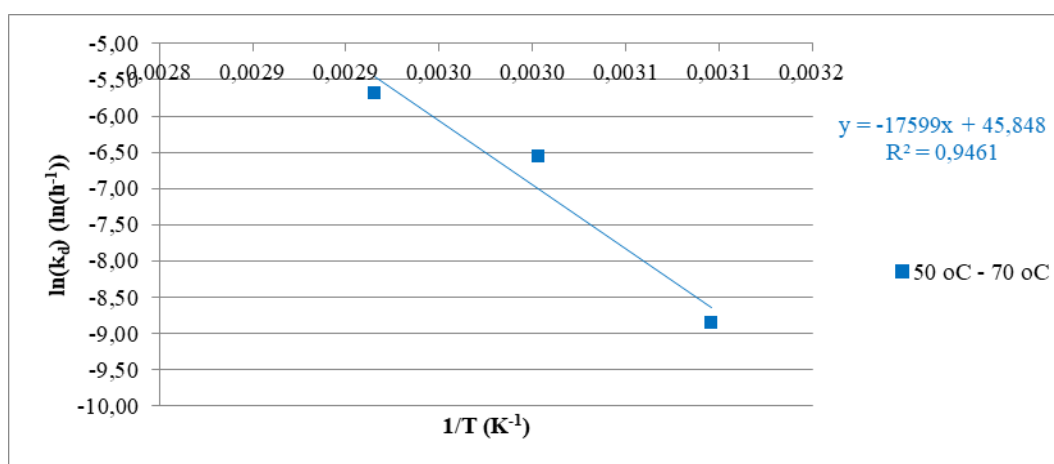
Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών στο Διάγραμμα 1, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία οι τιμές των  $t_{1/2}$  και  $D$ . Παρατίθεται ο Πίνακας 4, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5).

Πίνακας 4: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)
30	0,0038±0,0006	0,9725	182,4	606,1
40	0,0048±0,0013	0,9229	144,4	479,8
50	0,0086±0,0002	0,9895	80,6	267,8
60	0,0846±0,0100	0,9849	8,2	27,2
70	0,2035±0,0169	0,9552	3,4	11,3

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4, η μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς θερμοκικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του, καταγράφηκε όταν το ένζυμο επώαστηκε στους 70 °C σε NaDES, ενώ μικρότερη σταθερά κατά μία τάξη μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επώαστηκε στους 60 °C. Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, η τάξη μεγέθους ήταν κατά μία τάξη χαμηλότερη από ότι στους 60 °C. Προκύπτει, λοιπόν, ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30 °C και με αύξηση κατά 10 °C παρατηρείται 20% μείωσή του. Περαιτέρω αύξηση κατά 10°C οδηγεί σε 66% μείωση του χρόνου ημιζωής συγκριτικά με τους 30 °C .

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμοκικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 2, το οποίο απεικονίζει τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμοκικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5). Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C.



Διάγραμμα 2: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμοκικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) για το θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (12) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό(1:1:5) για το θερμοκρασιακό εύρος 50-70 °C

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
<b>50-70</b>	146,32±5,15	0,9461

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (13), (14) και (15), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 50 °C, 60 °C και 70 °C. Η τιμή Z υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 3 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

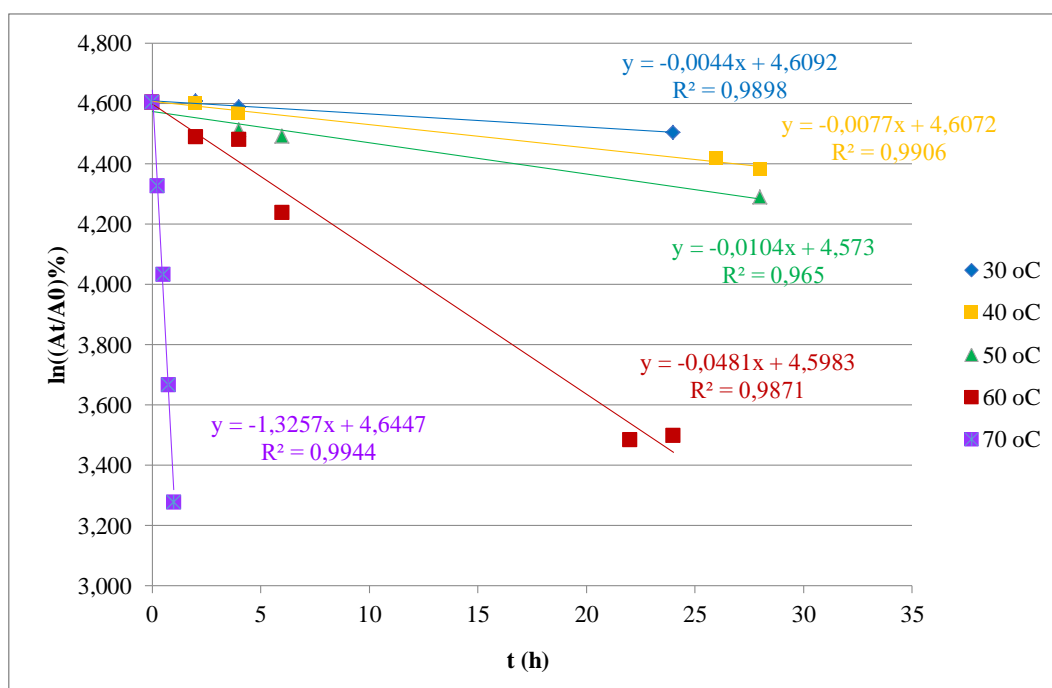
Πίνακας 6: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) για 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
50	143,63	114,08	91,49	14,6
60	143,55	111,37	96,64	
70	143,47	112,30	90,88	

Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 27 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.2 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) και 20% συν-διαλύτη νερό

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 3, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C.



Διάγραμμα 3: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το  $\blacklozenge$  αντιστοιχεί στους 30 °C, το  $\blacksquare$  στους 40 °C, το  $\blacktriangle$  στους 50 °C, το  $\blacksquare$  στους 60 °C και το  $\blacksquare$  στους 70 °C.

Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών στο Διάγραμμα 3, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία και οι τιμές των  $t_{1/2}$  και  $D$ . Παρατίθεται ο Πίνακας 7, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό.

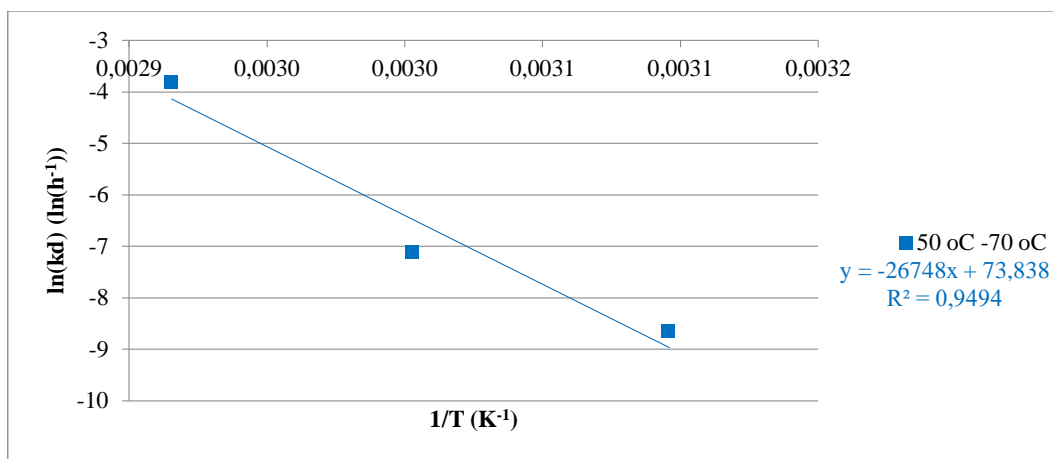
Πίνακας 7: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2}$ (h)	D (h)
30	0,0044±0,0009	0,9898	157,5	523,4
40	0,0077±0,0009	0,9906	90,0	299,1
50	0,0104±0,0012	0,9650	66,6	221,4
60	0,0481±0,0028	0,9871	14,4	47,9
70	1,3257±0,1097	0,9944	0,5	1,7

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7, η υψηλότερη τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου, που συνεπάγεται την ταχύτερη απενεργοποίησή του, καταγράφηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε στους 70 °C σε NaDES, ενώ μικρότερη σταθερά κατά δύο τάξεις μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε στους 50 °C και στους 60 °C. Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, η τάξη μεγέθους ήταν κατά μία τάξη μεγέθους χαμηλότερη από ότι στους 50 °C και στους 60 °C. Προκύπτει, λοιπόν, ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30 °C και με αύξηση κατά 10 °C παρατηρείται 43% μείωσή του. Περαιτέρω αύξηση κατά 10 °C οδηγεί σε 58% μείωση του χρόνου ημιζωής συγκριτικά με τους 30 °C.

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 4, το οποίο απεικονίζει τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C.





Διάγραμμα 4: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου για το NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό για το θερμοκρασιακό εύρος 50 °C έως 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (12) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
50-70	222,38±2,29	0,9494

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (13), (14) και (15), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 50 °C, 60 °C και 70 °C. Η τιμή Z υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 4 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

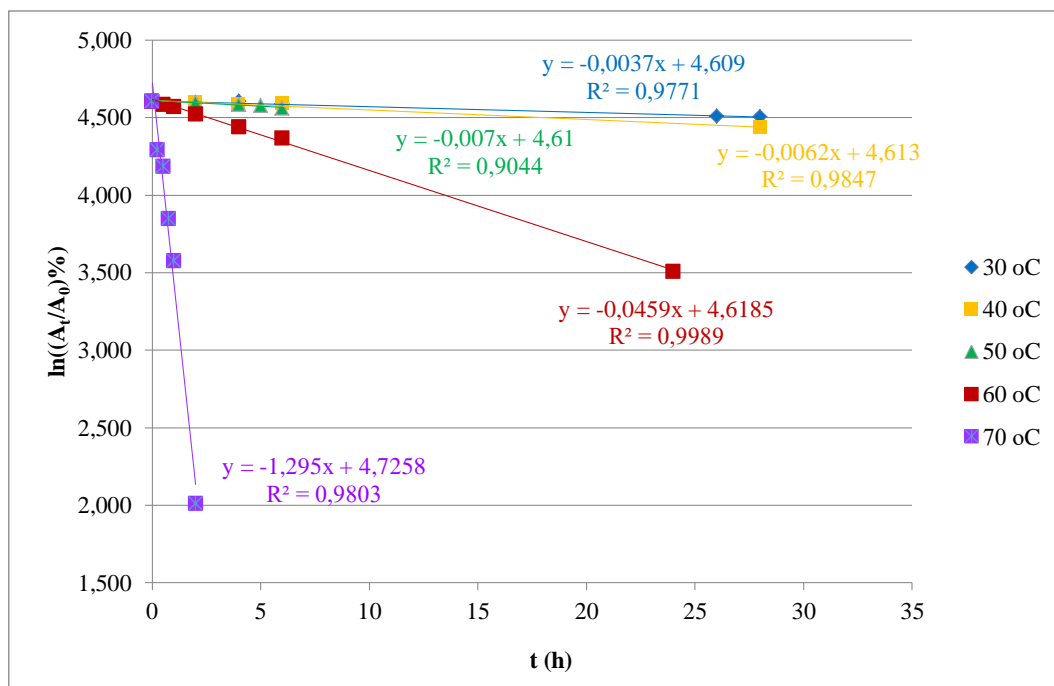
Πίνακας 9: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό για 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
50	219,70	113,57	328,56	9,5
60	219,61	112,93	320,37	
70	219,53	106,95	328,22	

Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 41 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.3 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 5, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C.



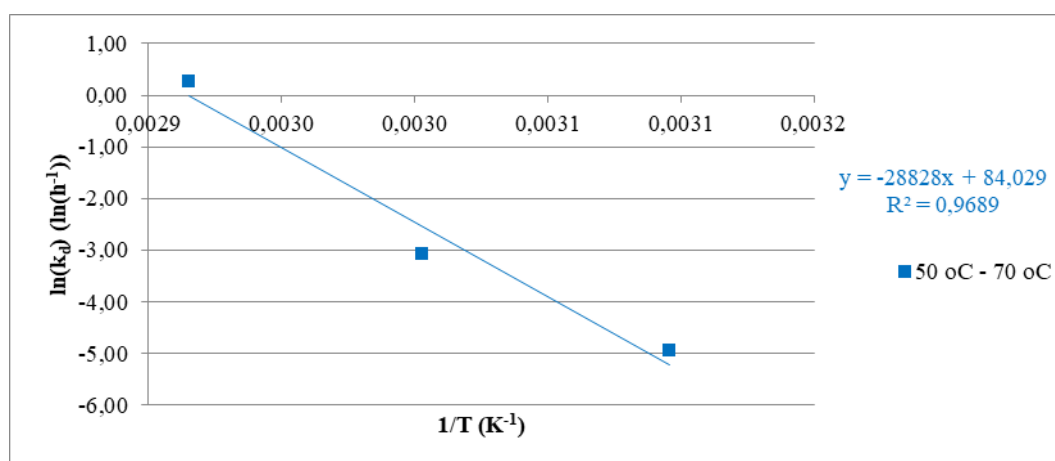
Διάγραμμα 5: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το ♦ αντιστοιχεί στους 30 °C, το ■ στους 40 °C, το ▲ στους 50 °C, το ■ στους 60 °C και το ■ στους 70 °C.

Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών στο Διάγραμμα 5, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία και οι τιμές των  $t_{1/2}$  και  $D$ . Παρατίθεται ο Πίνακας 10, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Σύμφωνα με τον Πίνακα 10, η μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου, δηλαδή η ταχύτερη απενεργοποίησή του, καταγράφηκε στην επώαση του ενζύμου στους 70 °C σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, ενώ μικρότερη σταθερά κατά δύο τάξεις μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επώαστηκε στους 60 °C. Στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, η τάξη μεγέθους ήταν κατά μία τάξη μεγέθους χαμηλότερη από ότι στους 50 °C και στους 60 °C. Προκύπτει, λοιπόν, ότι ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30 °C και με αύξηση κατά 10 °C παρατηρείται 40% μείωσή του. Περαιτέρω αύξηση κατά 10°C οδηγεί σε 47% μείωση του χρόνου ημιζωής συγκριτικά με τους 30 °C .

Πίνακας 10: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)
30	0,0037±0,0003	0,9771	187,3	622,4
40	0,0062±0,0001	0,9847	111,8	371,5
50	0,0070±0,0052	0,9044	99,0	329,0
60	0,0459±0,0015	0,9989	15,1	50,2
70	1,295±0,025	0,9803	0,5	1,8

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 6, το οποίο απεικονίζει τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 50 °C με 70 °C.



Διάγραμμα 6: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό για το θερμοκρασιακό εύρος από 50 °C έως 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (12) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
50-70	239,68±22,3	0,9689

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (12), (13) και (14), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 50 °C, 60 °C και 70 °C. Η τιμή  $Z$  υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 5 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

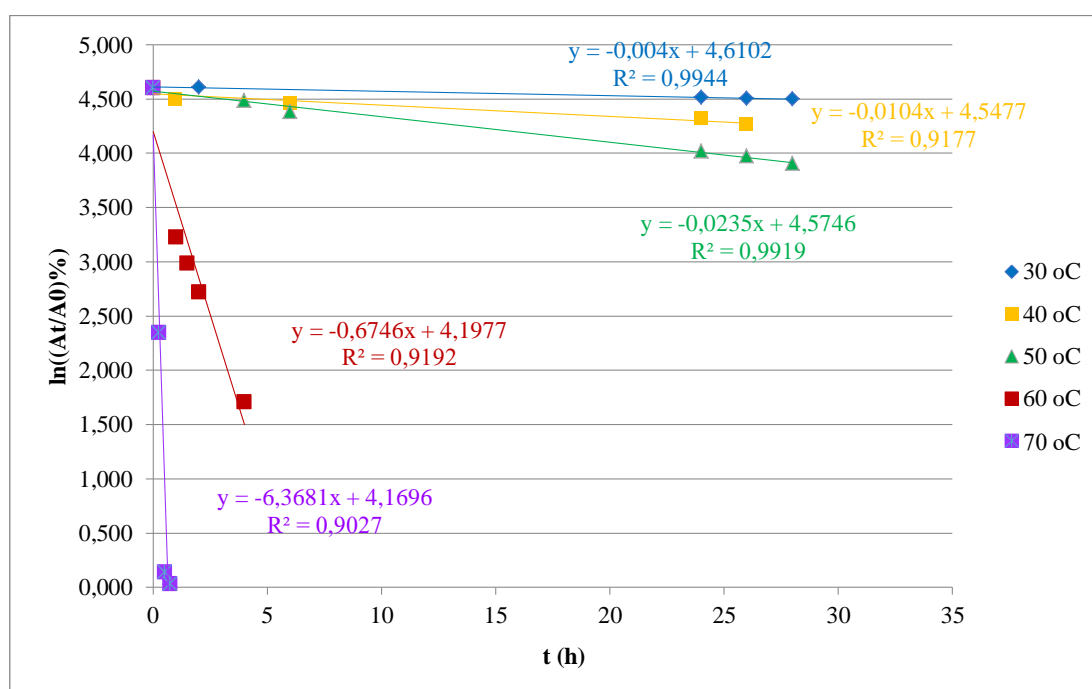
Πίνακας 12: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό για 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
50	237,00	114,6	378,82	8,8
60	236,91	113,1	371,92	
70	236,83	107,0	378,46	

Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 44 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.4 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 7, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C.



Διάγραμμα 7: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Το  $\blacklozenge$  αντιστοιχεί στους 30 °C, το  $\blacksquare$  στους 40 °C, το  $\blacktriangle$  στους 50 °C, το  $\blacksquare$  στους 60 °C και το  $\blacksquare$  στους 70 °C.

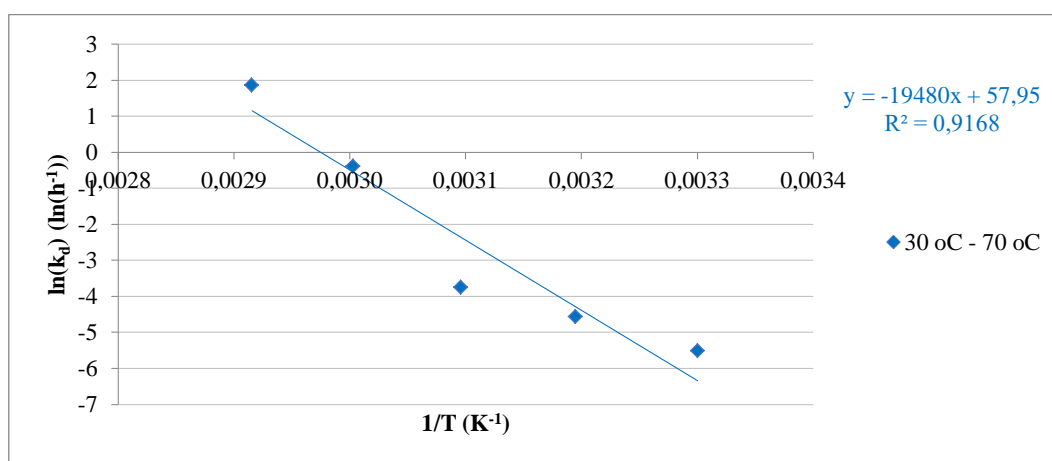
Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών στο Διάγραμμα 7, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία και οι τιμές των  $t_{1/2}$  και  $D$ . Παρατίθεται ο Πίνακας 13, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.

Πίνακας 13: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$t_{1/2}$ (h)	D (h)
30	0,0040±0,0006	0,9944	173,3	575,8
40	0,0104±0,0020	0,9177	66,6	221,4
50	0,0235±0,0020	0,9919	29,5	98,0
60	0,6746±0,0020	0,9192	1,0	3,4
70	6,368±0,002	0,9027	0,1	0,4

Από τον Πίνακα 13 φαίνεται ότι το ένζυμο απενεργοποιείται πιο γρήγορα, όταν επωάζεται στους 70 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς εκεί καταγράφεται η πιο υψηλή τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ . Μικρότερη σταθερά κατά μία τάξη μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε στους 60 °C, ενώ στους 40 και 50 °C το  $k_d$  είναι ακόμα μίας τάξης μεγέθους χαμηλότερο και στους 30 °C δύο τάξης μεγέθους χαμηλότερο από ότι στους 60 °C. Άρα ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30°C, παρατηρείται 62% μείωση του χρόνου ημιζωής με αύξηση 10°C, ενώ περαιτέρω αύξηση κατά 10°C οδηγεί σε 93% μείωση του χρόνου ημιζωής.

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 8, το οποίο απεικονίζει τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 30 °C με 70 °C.



Διάγραμμα 8: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8, για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (11) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
30-70	161,96±3,39	0,9168

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (13), (14) και (15), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 30-70 °C. Η τιμή Z υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 6 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

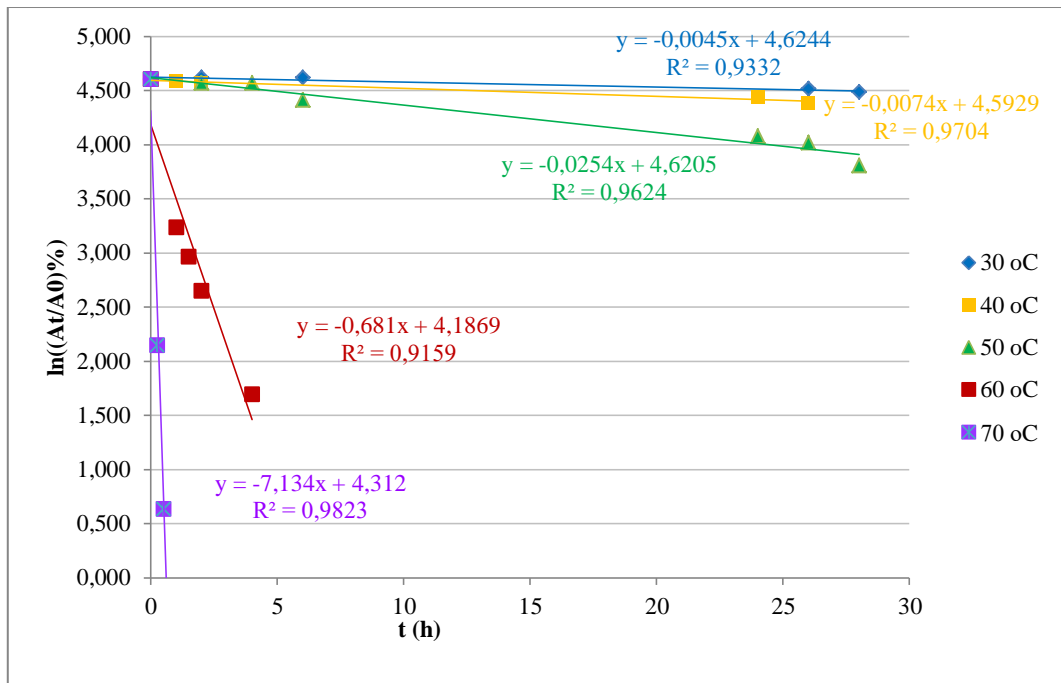
Πίνακας 15: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8 για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
30	159,44	108,79	167,17	12,2
40	159,35	109,97	157,76	
50	159,27	111,38	148,26	
60	159,19	105,62	160,86	
70	159,11	102,48	165,10	

Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 30 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.5 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 9, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C.



Διάγραμμα 9: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5. Το  $\blacklozenge$  αντιστοιχεί στους 30 °C, το  $\blacksquare$  στους 40 °C, το  $\blacktriangle$  στους 50 °C, το  $\blacksquare$  στους 60 °C και το  $\blacksquare$  στους 70 °C.

Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών στο Διάγραμμα 9, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία και οι τιμές των  $t_{1/2}$  και  $D$ . Παρατίθεται ο Πίνακας 16, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5.

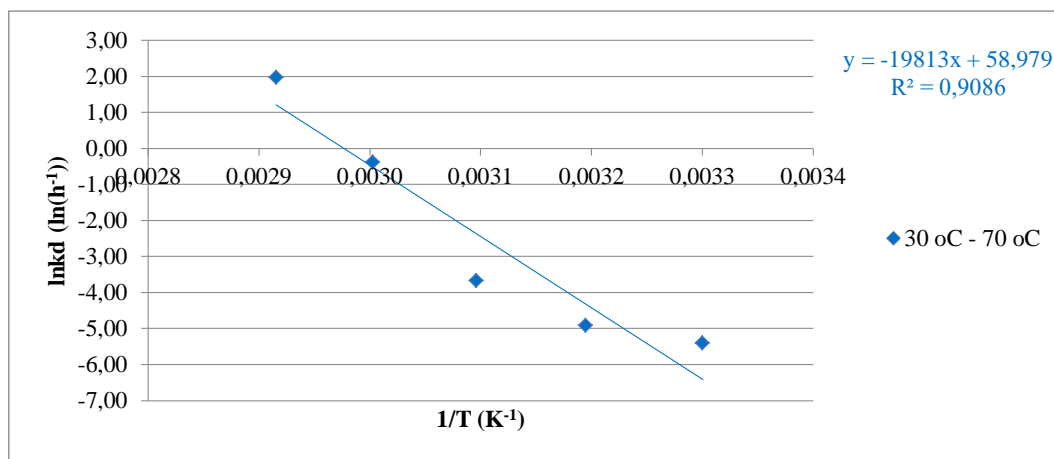
Πίνακας 16: Σταθερές θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)
30	0,0045±0,0007	0,9332	154,0	511,8
40	0,0074±0,0006	0,9740	93,7	311,2
50	0,0254±0,0014	0,9624	27,3	90,7
60	0,681±0,013	0,9159	1,0	3,4
70	7,134±0,086	0,9823	0,1	0,3

Από τον Πίνακα 16 φαίνεται ότι το ένζυμο απενεργοποιείται πιο γρήγορα, όταν επωάζεται στους 70 °C στο ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς εκεί καταγράφεται η πιο υψηλή τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ . Μικρότερη σταθερά κατά μία τάξη μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε στους 60 °C, ενώ στους 50 °C το  $k_d$  είναι ακόμα μίας τάξης μεγέθους χαμηλότερο και στους 30 °C και 40 °C δύο τάξης μεγέθους χαμηλότερο από ότι στους 60 °C. Άρα ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30°C, παρατηρείται 41% μείωση του χρόνου ημιζωής με αύξηση 10°C, ενώ περαιτέρω αύξηση κατά 10°C οδηγεί σε 82% μείωση του χρόνου ημιζωής.

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 10, το οποίο απεικονίζει τη

γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 30 °C με 70 °C.



Διάγραμμα 10: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (12) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
<b>30-70</b>	164,73±3,67	0,9086

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (13), (14) και (15), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 30-70 °C. Η τιμή Z υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 7 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
<b>30</b>	162,21	108,49	177,28	12,0
<b>40</b>	162,12	110,86	163,78	
<b>50</b>	162,04	111,17	157,48	
<b>60</b>	161,96	105,60	169,25	
<b>70</b>	161,87	102,15	174,12	

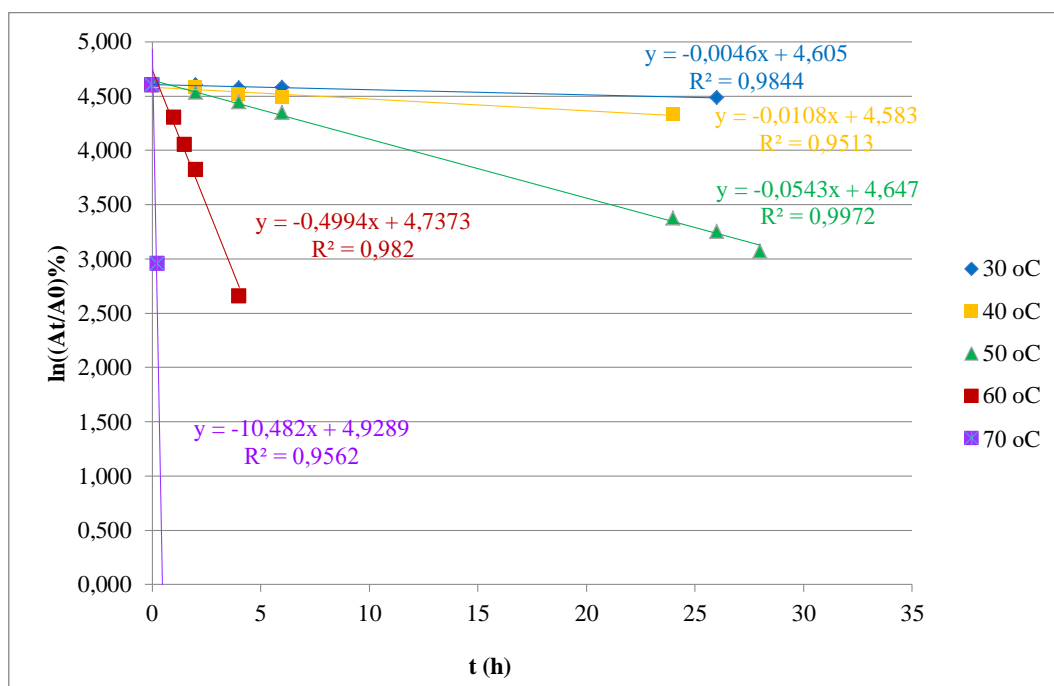
Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol. (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του



μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 30 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.6 Μελέτη σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7

Με την προσαρμογή των δεδομένων για την ενεργότητα του ενζύμου κάθε χρονική στιγμή στην Εξίσωση (7), προκύπτει το Διάγραμμα 11, το οποίο απεικονίζει τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου, στις θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C.



Διάγραμμα 11: Χρονική μεταβολή του λογαρίθμου του ποσοστού της εναπομείνουσας ενεργότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες 30, 40, 50, 60 και 70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Το  $\blacklozenge$  αντιστοιχεί στους 30 °C, το  $\blacksquare$  στους 40 °C, το  $\blacktriangle$  στους 50 °C, το  $\blacksquare$  στους 60 °C και το  $\blacksquare$  στους 70 °C.

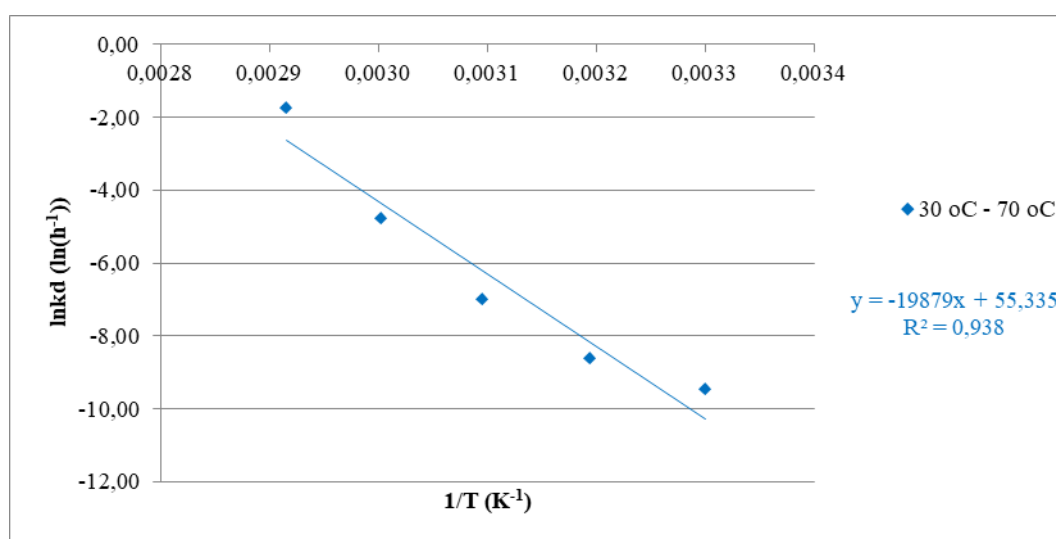
Οι τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  είναι ίσες με την απόλυτη τιμή της κλίσης των ευθειών του Διαγράμματος 11, για κάθε θερμοκρασία. Βάσει του  $k_d$  και μέσω των Εξισώσεων (8) και (9), υπολογίζονται για κάθε θερμοκρασία και οι τιμές των  $t_{1/2}$  και D. Παρατίθεται ο Πίνακας 19, ο οποίος περιλαμβάνει τις παραπάνω σταθερές θερμικής απενεργοποίησης για το ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.

Από τον Πίνακα 19 φαίνεται ότι το ένζυμο απενεργοποιείται ταχύτερα, όταν επωάζεται στους 70 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7, καθώς εκεί καταγράφεται η μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$ . Μικρότερη σταθερά κατά δύο τάξεις μεγέθους υπολογίστηκε όταν το ένζυμο επωάστηκε στους 60 °C, ενώ στις υπόλοιπες θερμοκρασίες το  $k_d$  είναι ακόμα μίας τάξης μεγέθους χαμηλότερο από ότι στους 60 °C. Άρα ο χρόνος ημιζώης του ενζύμου είναι μεγαλύτερος στους 30 °C, παρατηρείται 57% μείωση του χρόνου ημιζώης με αύξηση 10 °C, ενώ περαιτέρω αύξηση κατά 10 °C οδηγεί σε 92% μείωση του χρόνου ημιζώης.

Πίνακας 19: Σταθερές θερμοκικής απενεργοποίησης  $k_d$ , χρόνοι ημιζωής  $t_{1/2}$  και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού  $D$  του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7

Θερμοκρασία (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)	$D$ (h)
30	0,0046±0,0003	0,9844	150,7	500,7
40	0,0108±0,0009	0,9513	64,2	213,2
50	0,0543±0,0004	0,9972	12,8	42,4
60	0,4994±0,0099	0,9820	1,4	4,6
70	10,482±0,056	0,9562	0,1	0,2

Προσαρμόζοντας τις τιμές των θερμοκρασιών και τις τιμές της σταθεράς θερμοκικής απενεργοποίησης  $k_d$  στην Εξίσωση (12) προκύπτει το Διάγραμμα 12, το οποίο απεικονίζει τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμοκικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Το διάγραμμα αναφέρεται στο θερμοκρασιακό εύρος 30 °C με 70 °C.



Διάγραμμα 12: Αναπαράσταση γραμμικοποιημένης μορφής εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας θερμοκικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 για το θερμοκρασιακό εύρος από 30 °C έως 70 °C

Σύμφωνα με την Εξίσωση (12) και πραγματοποιώντας τους αντίστοιχους υπολογισμούς, προκύπτει η τιμή της  $E_d$ , που παρουσιάζεται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Παράμετροι εξίσωσης Arrhenius του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7

Θερμοκρασιακό εύρος (°C)	$E_d$ (kJ/mol)	$R^2$
30-70	165,27±0,10	0,9380

Βάσει του  $E_d$  που έχει υπολογιστεί και των Εξισώσεων (12), (13) και (14), υπολογίζονται οι τιμές των  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  και  $\Delta S^*$ , αντίστοιχα, για τις θερμοκρασίες 30-70 °C. Η τιμή  $Z$  υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (10) (Διάγραμμα 8 του Παραρτήματος). Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Θερμοδυναμικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 για για 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C και 70 °C

Θερμοκρασία (°C)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol/K)	Z (°C)
30	162,75	108,43	179,28	11,9
40	162,67	109,88	168,68	
50	162,59	109,13	165,49	
60	162,51	106,45	168,32	
70	162,42	101,05	178,91	

Η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol (Collins et al., 2005). Συνεπώς η δημιουργία του μεταβατικού σταδίου που οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη διάσπαση κατά μέσο όρο 30 μη ομοιοπολικών δεσμών.

### 3.1.7 Σύγκριση σταθερότητα του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος (Neutrase®) σε NaDES και ρυθμιστικό διάλυμα

#### 3.1.7.1 NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και ρυθμιστικό διάλυμα pH 8

Η μη αντιστρεπτή θερμική απενεργοποίηση ενός ενζυμικού μορίου αποτελεί τον σημαντικότερο περιορισμό σε ενζυμικές διεργασίες μεγάλου χρόνου. Η απενεργοποίηση του ενζύμου οφείλεται στην μεταβολή της τριτοταγούς δομής του η οποία πραγματοποιείται χωρίς τη διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών (Ortega et al., 2022).

Η σταθερότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στον NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) καθώς επίσης στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Επιλέχθηκε αυτή η τιμή pH καθώς αντιστοιχούσε στο pH του NaDES.

Οι τιμές των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) κυμαίνονται από 0,0038 έως 0,2035  $h^{-1}$ , ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8 από 0,004 έως 6,3681  $h^{-1}$ . Προκύπτει ότι για την ίδια θερμοκρασία το  $k_d$  παρουσιάζει μικρότερη τιμή, όταν το ένζυμο επωάζεται σε NaDES συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Γενικά, μικρές τιμές της σταθεράς  $k_d$  υποδηλώνουν αργό ρυθμό απενεργοποίησης του ενζύμου, ενώ η αύξηση των τιμών υποδηλώνει ταχύτερους ρυθμούς απενεργοποίησης. Οι χρόνοι ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) καθώς και οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D) βρέθηκαν υψηλότεροι στην περίπτωση, που το ένζυμο επωάζεται σε NaDES. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο  $t_{1/2}$  στους 50 °C στην περίπτωση του NaDES (Ενότητα 3.1.1.) είναι 80,6 h, ενώ στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος (Ενότητα 3.1.4.) είναι 63% μικρότερος.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  υποδηλώνει την ελάχιστη ποσότητα ενέργειας που χρειάζεται, προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται μέσω μετάβασης της φυσικής δομής σε ένα ασταθές ενδιάμεσο. Όταν η προσφερόμενη ενέργεια είναι μικρότερη της  $E_d$ , το ασταθές ενδιάμεσο μπορεί να αναδιπλωθεί (να αποκτήσει την αρχική του δομή) με ψύξη. Η μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται όταν η προσφερόμενη ενέργεια είναι

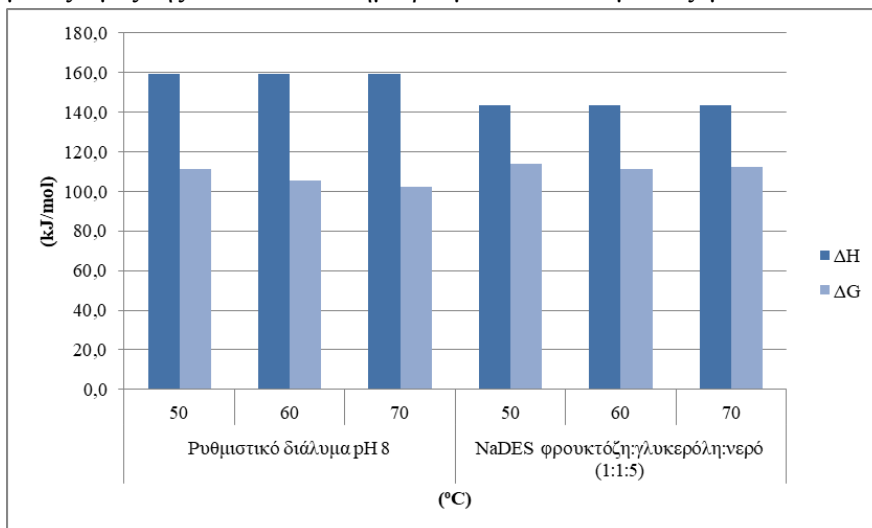
υψηλότερη της  $E_d$ . Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) βρέθηκε ίση με 146,32 kJ/, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8 βρέθηκε ίση με 161,96 kJ/mol. Η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D) κατά μία log-μονάδα (Z) βρέθηκε υψηλότερη κατά την επώαση του ενζύμου σε NaDES, γεγονός που υποδεικνύει ότι το σύστημα NaDES-ένζυμο εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία στις θερμοκρασιακές αλλαγές (de Oliveira et al., 2020).

Η διαφορά ενθαλπίας  $\Delta H^*$  αποτελεί ένα μέτρο του αριθμού των μη ομοιοπολικών δεσμών (συμπεριλαμβανομένων και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων), οι οποίοι διασπώνται κατά τη διάρκεια της θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου. Η τιμή της  $\Delta H^*$  δεν παρουσιάζει μεταβολή με την αύξηση της θερμοκρασίας τόσο για το σύστημα NaDES-ένζυμο όσο και για το σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο (Διάγραμμα 13). Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της τάξης του 9% στην τιμή της  $\Delta H^*$  για το σύστημα NaDES-ένζυμο, γεγονός που υποδηλώνει ότι λιγότεροι μη ομοιοπολικοί δεσμοί μπορούν να διασπαστούν για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης). Σύμφωνα με τους Collins et al., (2005) η ενέργεια που απαιτείται για την απομάκρυνση μίας ομάδας  $-CH_2$  από έναν υδρόφοβο δεσμό είναι περίπου 5,4 kJ/mol. Εκτιμάται λοιπόν ότι για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης) του ενζύμου απαιτείται κατά μέσο όρο η διάσπαση 27 και 30 μη ομοιοπολικών δεσμών για το σύστημα NaDES-ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο, αντίστοιχα.

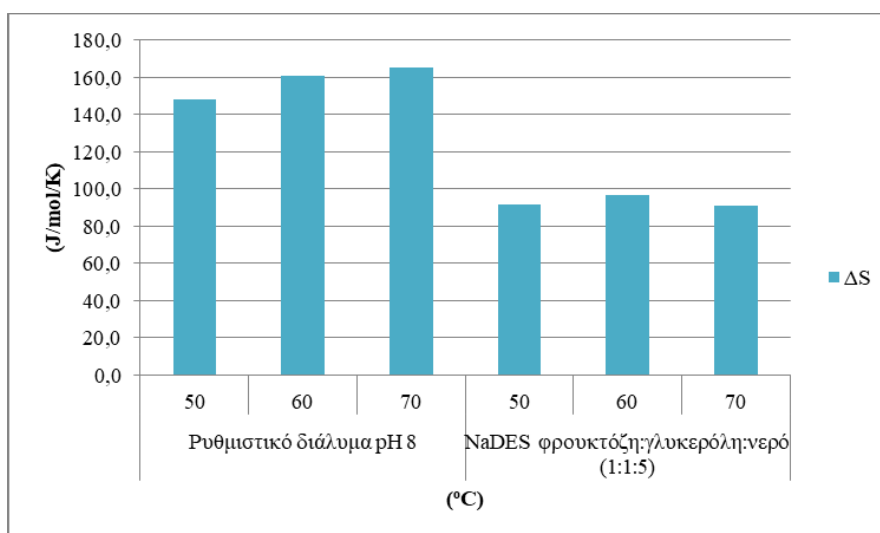
Η διαφορά εντροπίας  $\Delta S^*$  υποδηλώνει τον βαθμό αταξίας στη δομή του ενζύμου, που σχετίζεται με το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου κατά τη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου. Οι θετικές τιμές της παραμέτρου αυτής υποδηλώνουν αύξηση του βαθμού αταξίας και στα δύο συστήματα (Διάγραμμα 14). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν αναφερθεί και αρνητικές τιμές της  $\Delta S^*$  σε ποικίλες περιπτώσεις μελετών θερμικής απενεργοποίησης διαφόρων ενζύμων. Αποδίδεται σε δύο φαινόμενα (α) στην επίδραση του διαλύτη που οφείλεται στα μόρια διαλύτη που περιβάλλουν το πρωτεϊνικό μόριο ως αποτέλεσμα της έκθεσης/μη έκθεσης υδρόφοβων ομάδων των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου και (β) στις δομικές αλλαγές (αλλαγές διαμόρφωσης) του πρωτεϊνικού μορίου (αναδίπλωση/ξεδίπλωμα) (Bustamante-Vargas et al., 2019). Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο σύστημα NaDES-ένζυμο παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τιμής της  $\Delta S^*$  που υποδηλώνει μείωση του βαθμού αταξίας στο συγκεκριμένο σύστημα (Διάγραμμα 14). Η εξέταση μεμονωμένα των τιμών  $\Delta H^*$  και  $\Delta S^*$  δεν αποτελούν ικανοποιητικό δείκτη αναφορικά με τη θερμική σταθερότητα του ενζύμου.

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G^*$ ) είναι αποτέλεσμα των ασθενέστερων διαμοριακών δυνάμεων (δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals) που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της ενζυμικού μορίου και οι οποίες συνεισφέρουν στη συνολική του σταθερότητα. Η  $\Delta G^*$  περιλαμβάνει την συνεισφορά της  $\Delta H^*$  και της  $\Delta S^*$  και αποτελεί τον πιο αξιόπιστο δείκτη για την εκτίμηση της σταθερότητας του ενζύμου. Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις οι τιμές της  $\Delta G^*$  είναι θετικές και υψηλές (Διάγραμμα 13). Υψηλές, θετικές τιμές της  $\Delta G^*$  υποδεικνύουν ότι η μετουσίωση της πρωτεΐνης δεν είναι αυθόρμητη και ότι το πρωτεϊνικό μόριο εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη θερμική απενεργοποίηση (Amin et al., 2020; Bustamante-Vargas et al., 2019). Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της  $\Delta G^*$  κατά 10% στην περίπτωση του ενζύμου που επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της  $\Delta G^*$

στην περίπτωση του συστήματος NaDES-ένζυμο (Διάγραμμα 13). Επιπλέον, οι τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα NaDES-ένζυμο είναι υψηλότερες σε όλες τις εξετασθείσες θερμοκρασίες σε σχέση με τις τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο.



Διάγραμμα 13: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta H^*$  και  $\Delta G^*$  του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8



Διάγραμμα 14: Γραφική απεικόνιση της θερμοδυναμικής παραμέτρου  $\Delta S^*$  του ενζύμου στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8

Συμπερασματικά, το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα στο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα.

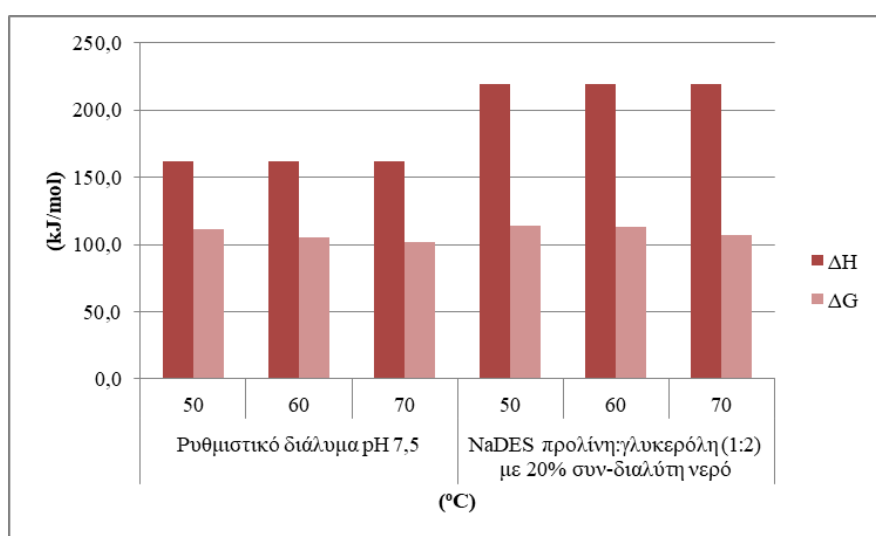
### 3.1.7.2 NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Η σταθερότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στον NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό καθώς επίσης στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5. Επιλέχθηκε αυτή η τιμή pH καθώς αντιστοιχούσε στο pH του NaDES.

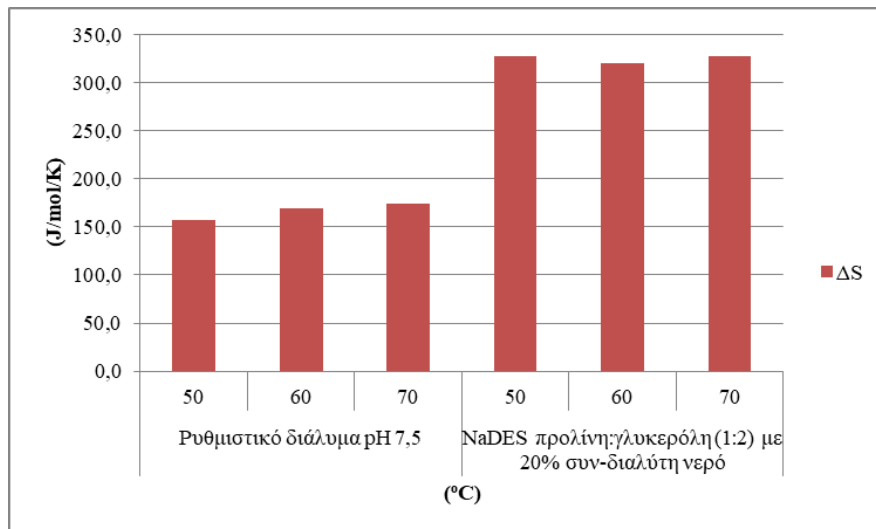
Οι τιμές των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό κυμαίνονται ανάμεσα 0,0044 έως 1,3257  $h^{-1}$ , ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 από 0,0045 έως 7,1340  $h^{-1}$ . Προκύπτει ότι για την ίδια θερμοκρασία το  $k_d$  παρουσιάζει μικρότερη τιμή όταν το ένζυμο επωάζεται σε NaDES συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι χρόνοι ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) καθώς και οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D) βρέθηκαν υψηλότεροι στην περίπτωση, που το ένζυμο επωάζεται σε NaDES. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο  $t_{1/2}$  στους 50 °C στην περίπτωση του NaDES (Ενότητα 3.1.2.) είναι 66,6 h, ενώ στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος (Ενότητα 3.1.5.) είναι 59% μικρότερος.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό βρέθηκε ίση με 222,38 kJ/mol, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 ίση με 164,73 kJ/mol. Η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D) κατά μία log-μονάδα (Z) βρέθηκε υψηλότερη κατά την επώαση του ενζύμου σε NaDES, γεγονός που υποδεικνύει ότι το σύστημα NaDES-ένζυμο εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία στις θερμοκρασιακές αλλαγές.

Η τιμή της  $\Delta H^*$  δεν παρουσιάζει μεταβολή με την αύξηση της θερμοκρασίας τόσο για το σύστημα NaDES-ένζυμο όσο και για το σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο (Διάγραμμα 15). Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τάξης του 35% στην τιμή της  $\Delta H^*$  για το σύστημα NaDES-ένζυμο, γεγονός που υποδηλώνει ότι περισσότεροι μη ομοιοπολικοί δεσμοί θα πρέπει να διασπαστούν για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης). Εκτιμάται λοιπόν ότι για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης) του ενζύμου απαιτείται κατά μέσο όρο η διάσπαση 41 και 30 μη ομοιοπολικών δεσμών για το σύστημα NaDES-ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 15: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta H^*$  και  $\Delta G^*$  του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5



Διάγραμμα 16: Γραφική απεικόνιση της θερμοδυναμικής παραμέτρου  $\Delta S^*$  του ενζύμου στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Οι θετικές τιμές της  $\Delta S^*$  υποδηλώνουν αύξηση του βαθμού αταξίας και στα δύο συστήματα (Διάγραμμα 16). Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο σύστημα NaDES-ένζυμο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τιμής της  $\Delta S^*$  που υποδηλώνει αύξηση του βαθμού αταξίας στο συγκεκριμένο σύστημα (Διάγραμμα 16).

Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις οι τιμές της  $\Delta G^*$  είναι θετικές και υψηλές (Διάγραμμα 15). Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της  $\Delta G^*$  κατά 10% στην περίπτωση του ενζύμου που επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση του συστήματος NaDES-ένζυμο παρατηρείται μείωση της τιμής της  $\Delta G^*$  στην υψηλότερη εξετασθείσα θερμοκρασία (70 °C) (Διάγραμμα 15). Επιπλέον, οι τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα NaDES-ένζυμο είναι υψηλότερες σε όλες τις εξετασθείσες θερμοκρασίες σε σχέση με τις τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο.

Συμπερασματικά, το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα στο NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% συν-διαλύτη νερό σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα.

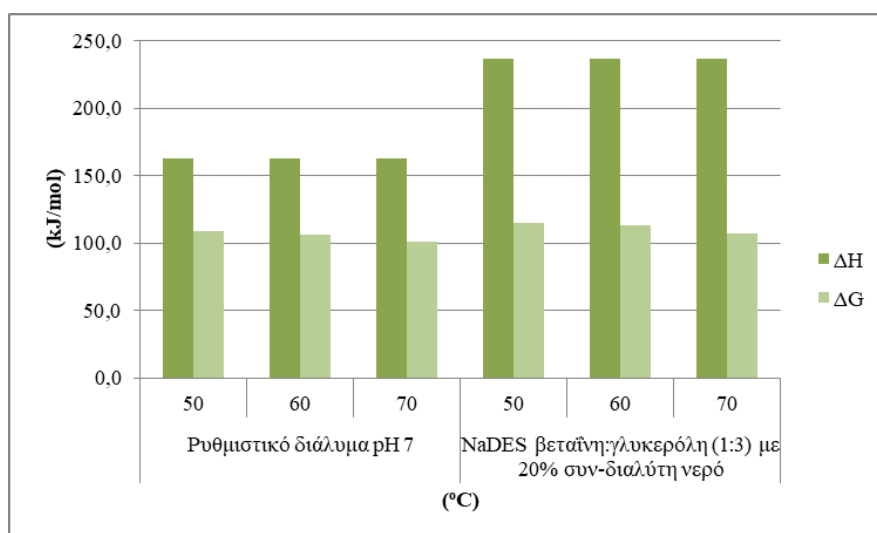
### 3.1.7.3 NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και ρυθμιστικό διάλυμα pH 7

Η σταθερότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στον NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό καθώς επίσης στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Επιλέχθηκε αυτή η τιμή pH καθώς αντιστοιχούσε στο pH του NaDES.

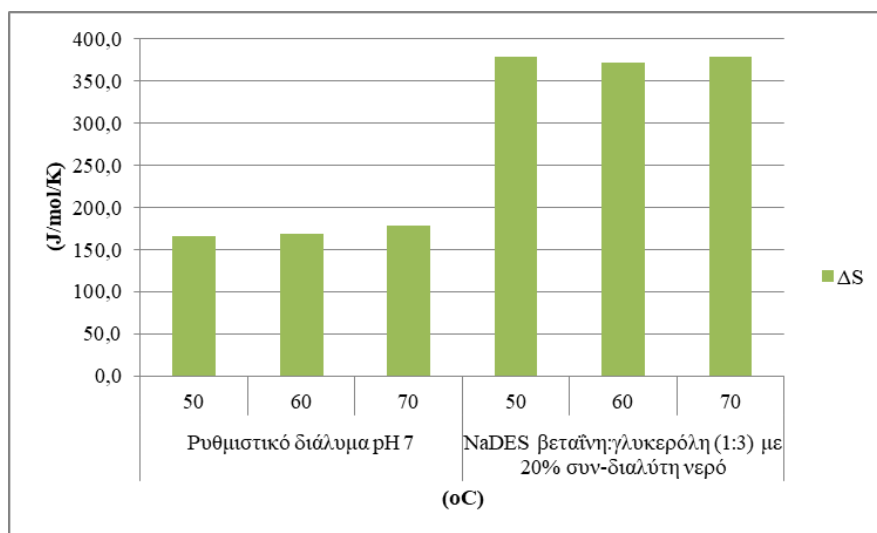
Οι τιμές των σταθερών θερμικής απενεργοποίησης  $k_d$  του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό κυμαίνονται ανάμεσα 0,0037 έως 1,2950  $h^{-1}$ , ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 από 0,0046 έως 10,4820  $h^{-1}$ . Προκύπτει ότι για την ίδια θερμοκρασία το  $k_d$  παρουσιάζει μικρότερη τιμή όταν το ένζυμο επωάζεται σε NaDES συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι χρόνοι ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) καθώς και οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D) βρέθηκαν υψηλότεροι στην περίπτωση, που το ένζυμο επωάζεται σε NaDES. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο  $t_{1/2}$  στους 50 °C στην περίπτωση του NaDES (Ενότητα 3.1.3.) είναι 99,0 h, ενώ στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος (Ενότητα 3.1.6.) είναι 87% μικρότερος.

Η ενέργεια θερμικής απενεργοποίησης  $E_d$  του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό βρέθηκε ίση με 239,7 kJ/mol, ενώ στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 ίση με 165,3 kJ/mol. Η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D) κατά μία log-μονάδα (Z) βρέθηκε υψηλότερη κατά την επώαση του ενζύμου σε NaDES, γεγονός που υποδεικνύει ότι το σύστημα NaDES-ένζυμο εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία στις θερμοκρασιακές αλλαγές (de Oliveira et al., 2020).

Η τιμή της  $\Delta H^*$  δεν παρουσιάζει μεταβολή με την αύξηση της θερμοκρασίας τόσο για το σύστημα NaDES-ένζυμο όσο και για το σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο (Διάγραμμα 17). Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τάξης του 45% στην τιμή της  $\Delta H^*$  για το σύστημα NaDES-ένζυμο, γεγονός που υποδηλώνει ότι περισσότεροι μη ομοιοπολικοί δεσμοί θα πρέπει να διασπαστούν για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης). Εκτιμάται λοιπόν ότι για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης (απενεργοποίησης) του ενζύμου απαιτείται κατά μέσο όρο η διάσπαση 44 και 30 μη ομοιοπολικών δεσμών για το σύστημα NaDES-ενζύμου και ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 17: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta H^*$  και  $\Delta G^*$  του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7



Διάγραμμα 18: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta S^*$  του ενζύμου στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7



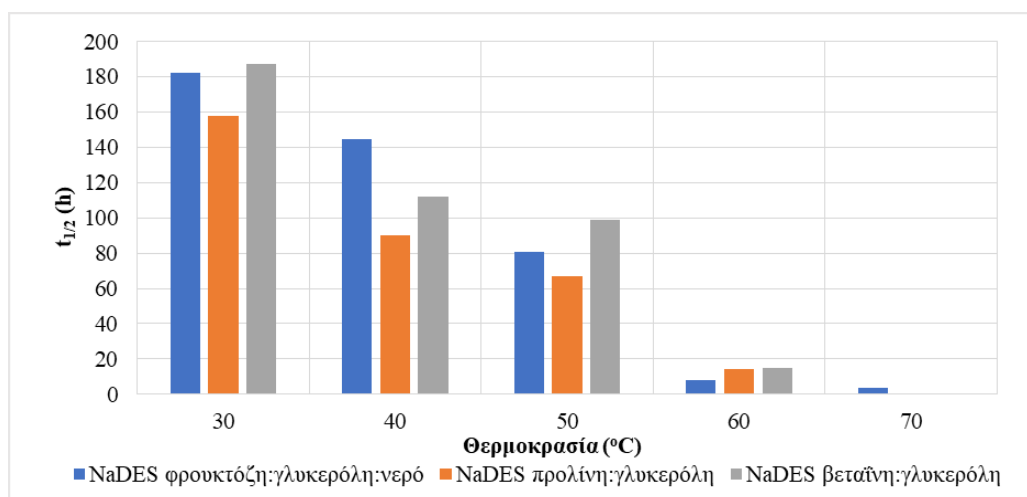
Οι θετικές τιμές της  $\Delta S^*$  υποδηλώνουν αύξηση του βαθμού αταξίας και στα δύο συστήματα (Διάγραμμα 18). Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο σύστημα NaDES-ένζυμο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της τιμής της  $\Delta S^*$  που υποδηλώνει αύξηση του βαθμού αταξίας στο συγκεκριμένο σύστημα (Διάγραμμα 18).

Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις οι τιμές της  $\Delta G^*$  είναι θετικές και υψηλές (Διάγραμμα 17). Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της  $\Delta G^*$  κατά 7% στην περίπτωση του ενζύμου που επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση του συστήματος NaDES-ένζυμο παρατηρείται μείωση της τιμής της  $\Delta G^*$  στην υψηλότερη εξετασθείσα θερμοκρασία (70 °C) (Διάγραμμα 17). Επιπλέον, οι τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα NaDES-ένζυμο είναι υψηλότερες σε όλες τις εξετασθείσες θερμοκρασίες σε σχέση με τις τιμές της  $\Delta G^*$  στο σύστημα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο.

Συμπερασματικά, το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα.

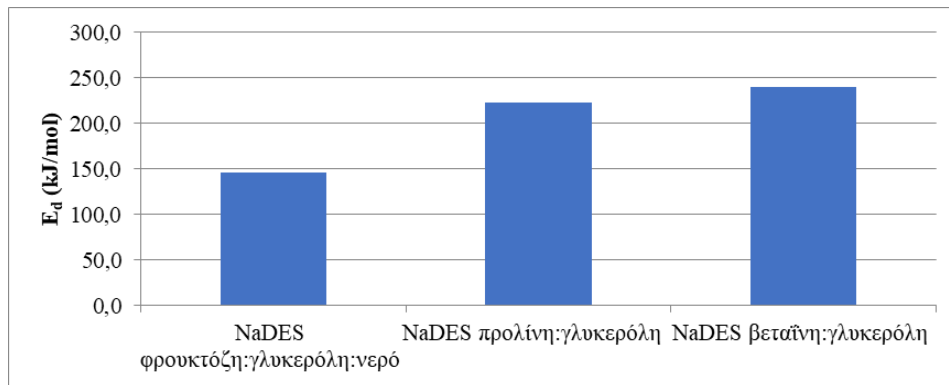
### 3.1.7.4 Σύγκριση σταθερότητας ενζύμου στους NaDES

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα όταν επωάζεται στους NaDES συγκριτικά με τα ρυθμιστικά διαλύματα. Στις περισσότερες θερμοκρασίες, οι τιμές του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) είναι υψηλότερες (Διάγραμμα 19) όταν το ένζυμο επωάζεται στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό συγκριτικά με τους άλλους δύο NaDES, γεγονός που συνεπάγεται τη βραδύτερη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στο διαλύτη αυτό.



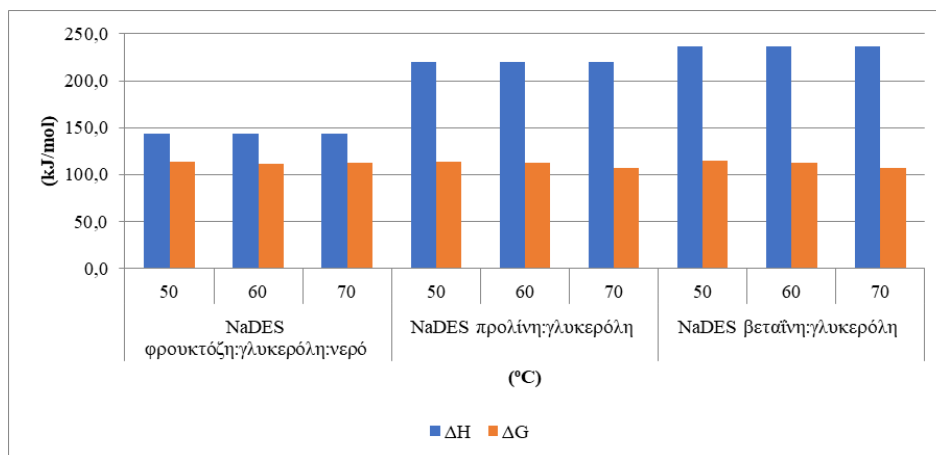
Διάγραμμα 19: Γραφική απεικόνιση του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) του ενζύμου στους τρεις NaDES

Οι τιμές της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης ( $E_d$ ) του ενζύμου είναι υψηλές και για τους τρεις NaDES, με την τιμή της  $E_d$  για την επώαση του ενζύμου σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό να είναι η υψηλότερη (Διάγραμμα 20). Αυτό υποδηλώνει ότι απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας προκειμένου να επιτευχθεί η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στο διαλύτη αυτόν.



Διάγραμμα 20: Γραφική απεικόνιση της ενέργειας θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου στους τρεις NaDES

Όπως αναφέρθηκε και στις Ενότητες 3.1.7.1., 3.1.7.2. και 3.1.7.3., η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G^*$ ) παρουσιάζει υψηλές και θετικές τιμές, που συνεπάγονται τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του ενζύμου στη θερμική απενεργοποίηση, όταν αυτό επωάζεται στους NaDES. Εκ των τριών NaDES, μεγαλύτερες τιμές  $\Delta G^*$  για τις περισσότερες θερμοκρασίες εμφανίζονται όταν το ένζυμο επωάζεται στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό (Διάγραμμα 21). Στο συγκεκριμένο σύστημα NaDES-ένζυμο παρατηρείται επίσης σημαντική αύξηση της διαφοράς ενθαλπίας ( $\Delta H^*$ ) για τις τρεις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 21), συγκριτικά με τα συστήματα των NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό. Αυτό υποδηλώνει ότι περισσότεροι μη ομοιοπολικοί δεσμοί θα πρέπει να διασπαστούν για το σχηματισμό του ασταθούς ενδιάμεσου που προηγείται της μετουσίωσης.



Διάγραμμα 21: Γραφική απεικόνιση των θερμοδυναμικών παραμέτρων  $\Delta H^*$  και  $\Delta G^*$  του ενζύμου στους τρεις NaDES

Βάσει των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το ένζυμο εμφανίζει βελτιωμένη θερμοσταθερότητα όταν επωάζεται στο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, συγκριτικά με την επώαση στους NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό.

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες, που αποδεικνύουν τη αυξημένη θερμοσταθερότητα των ενζύμων σε NaDES. Σε μία μελέτη, που εξέτασε τη σταθερότητα μίας κυτταρινάσης στους 50 °C, σε δεκατέσσερις διαφορετικούς διαλύτες NaDES, έδειξε ότι επτά από αυτούς αύξησαν το χρόνο ημιζωής του ενζύμου συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα,

που χρησιμοποιήθηκε. Μάλιστα, στους NaDES βεταΐνη/1,4 βουτανοδιόλη και χλωριούχος χολίνη/1,4-βουτανοδιόλη (μοριακή αναλογία 1:2) παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ημιζωής κατά περίπου 11 και 9 φορές αντίστοιχα, σε σχέση με την επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα. Συνεπώς, η κυτταρινάση απενεργοποιούταν με βραδύτερο ρυθμό στους δύο αυτούς NaDES, γεγονός που υποδηλώνει την ενισχυμένη θερμοσταθερότητα του συστήματος NaDES-ένζυμο (Yao et al., 2022).

Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκε η σταθερότητα μίας λακκάσης κατά την επώασή της στους 70 °C για 15 λεπτά σε 25% w/w NaDES (βεταΐνη-ξυλιτόλη) σε ρυθμιστικό διάλυμα. Βρέθηκε ότι η εναπομείνουσα ενεργότητα της λακκάσης ήταν 10 φορές μεγαλύτερη από την μετρούμενη εναπομείνουσα ενεργότητα, όταν αυτή επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (Delorme et al., 2020).

## 3.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε NaDES

Παρατίθεται αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, με το πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα Neutrase® σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Στα αποτελέσματα των εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων με το Duncan Test, προκειμένου να βρεθούν οι στατιστικά σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την EYE

### 3.2.1 Εκχυλίσεις σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

#### 3.2.1.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC)

Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) σε mg γαλλικού οξέος /g πρώτης ύλης για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 22: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	107,59±3,92	116,89±1,26	122,28±1,29	123,33±1,51	119,85±7,80
2	116,20±3,18	129,68±3,45	132,86±0,36	133,82±2,44	124,27±3,74
3	132,03±3,56	138,39±1,07	141,20±6,86	153,15±2,51	120,12±1,37
4	137,13±1,33	140,95±1,93	141,03±0,35	147,04±4,53	121,06±8,14

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TPC (Πίνακας 22). Ειδικότερα στα χαμηλά ενζυμικά φορτία (0,1 και 0,5 % v/v) παρατηρείται αυξητική τάση της απόδοσης σε TPC με το χρόνο, ενώ στα υψηλά ενζυμικά φορτία (0,75 και 1,0 % v/v) η εκχύλιση των TPC φαίνεται να ολοκληρώνεται στις 3 h. Σε κάθε περίπτωση η EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TPC. Ειδικότερα, η εφαρμογή EYE σε NaDES αυξάνει την εκχύλιση των TPC σε ποσοστά από 12 έως και 21% ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι τόσο ο χρόνος εκχύλισης όσο και το ενζυμικό φορτίο αποτελούν στατιστικά σημαντικούς παράγοντες στην εκχύλιση των TPC ( $p < 0,001$ ) (Πίνακας 1 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μέχρι τις 3 h εκχύλισης (Πίνακας 2 του Παραρτήματος) ( $p < 0,01$ ). Αναφορικά με την επίδραση του ενζυμικού φορτίου στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται κατά την αύξηση του φορτίου σε όλο το εύρος φορτίων που εξετάστηκαν (από 0,1 έως και 1 % v/v) ( $p < 0,01$ ) (Πίνακας 3 του Παραρτήματος).

### 3.2.1.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών TFC σε mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 23: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	37,51±1,14	37,51±1,04	42,77±2,87	40,43±1,06	35,35±0,34
2	37,63±0,74	37,63±0,77	45,75±2,39	41,36±1,67	37,64±0,00
3	40,44±1,69	40,44±1,41	52,41±1,63	48,53±1,17	41,05±0,48
4	44,49±0,31	44,49±1,33	51,35±0,94	50,19±0,60	41,48±1,35

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου μέχρι και 0,75% v/v και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TFC (Πίνακας 23). Σε κάθε περίπτωση η EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TFC. Η εφαρμογή EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TFC σε ποσοστά από 7 έως και 21% ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι τόσο ο χρόνος εκχύλισης όσο και το ενζυμικό φορτίο έχουν σημαντική επίδραση στην εκχύλιση των TFC ( $p < 0,0001$ ) (Πίνακας 4 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 3 και 4 h εκχύλισης ( $p < 0,001$ ) (Πίνακας 5 του Παραρτήματος). Αναφορικά με την επίδραση του ενζυμικού φορτίου στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται για ενζυμικά φορτία μεγαλύτερα ή ίσα του 0,75% v/v ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 6 του Παραρτήματος).

### 3.2.1.3 Αντιοξειδωτική δράση

Στον Πίνακα 24 παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών  $IC_{50}^*$  για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h. Η γραφική παράσταση για την εύρεση του  $IC_{50}$  δημιουργήθηκε μέσω των Εξισώσεων (3) και (4) (Διαγράμματα 9 με 34 του Παραρτήματος).

Πίνακας 24: Δείκτης  $IC_{50}$  ( $\mu L$  εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	0,53	0,58	0,55	0,52	0,57
2	0,42	0,49	0,43	0,52	0,59
3	0,52	0,40	0,42	0,57	0,57
4	0,43	0,33	0,53	0,43	0,35

\*Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα είναι  $\leq 0,05$ .

Όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Πίνακας 24). Ο στατιστικός έλεγχος, που πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 7 του

Παραρτήματος), έδειξε ότι ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο είναι στατιστικά μη σημαντικοί παράγοντες για την τιμή του IC<sub>50</sub>, καθώς εμφάνισαν p>0,05.

### 3.2.2 Εκχυλίσεις σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

#### 3.2.2.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων

Στον Πίνακα 25 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) σε mg γαλλικού οξέος /g πρώτης ύλης για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 25: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	71,75±2,54	87,54±1,32	93,67±3,65	88,93±3,87	87,62±3,12
2	75,07±4,69	94,95±0,46	97,32±3,19	98,12±2,73	88,84±3,20
3	78,57±5,29	105,03±1,62	106,43±2,52	106,73±2,73	91,25±0,41
4	78,92±1,05	102,92±3,29	105,86±1,36	107,22±4,60	97,57±3,25

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TPC (Πίνακας 25). Η εκχύλιση των TPC φαίνεται να ολοκληρώνεται πρακτικά σε 3 h για όλα τα εξετασθέντα ενζυμικά φορτία. Η EYE με χαμηλό ενζυμικό φορτίο οδηγεί σε μικρότερη απόδοση TPC σε σχέση με το NaDES. Η εφαρμογή EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TPC σε ποσοστά από 7 έως και 9% για ενζυμικά φορτία μεγαλύτερα του 0,1 % v/v.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο έχουν σημαντική επίδραση στην εκχύλιση των TPC (p<0,0001) (Πίνακας 8 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά μη σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 3 και 4 h εκχύλισης (p<0,05) (Πίνακας 9 του Παραρτήματος). Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται όταν το ενζυμικό φορτίο μεταβάλλεται από 0,5 % v/v προς μεγαλύτερες τιμές (p<0,001) (Πίνακας 10 του Παραρτήματος).

#### 3.2.2.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών

Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών TFC σε mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης, για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 26: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	31,17±4,76	39,81±3,97	41,05±1,56	41,46±0,74	38,10±1,41
2	39,54±3,00	44,51±2,43	47,88±1,77	51,94±2,13	38,61±2,04
3	46,39±1,40	46,60±1,08	52,38±0,55	49,03±1,46	43,20±5,74
4	46,15±4,21	48,79±0,86	53,58±1,39	49,27±1,17	44,29±3,25

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου έως και 0,75 % (v/v) και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TFC (Πίνακας 26). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η εκχύλιση ολοκληρώνεται σε 3 h. Σε κάθε περίπτωση η EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TFC. Η εφαρμογή EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TFC σε ποσοστά από 4 έως και 17%, ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο έχουν σημαντική επίδραση στην εκχύλιση των TFC ( $p < 0,005$ ) (Πίνακας 11 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά μη σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 3 και 4 h εκχύλισης ( $p < 0,01$ ) (Πίνακας 12 του Παραρτήματος). Επιπλέον, στατιστικά μη σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των ενζυμικών φορτίων 0,75% και 1 % v/v (Πίνακας 13 του Παραρτήματος) ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2.3 Αντιοξειδωτική δράση

Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών  $IC_{50}^*$  για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1 % v/v σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h. Η γραφική παράσταση για την εύρεση του  $IC_{50}$  δημιουργήθηκε μέσω των Εξισώσεων (3) και (4) (Διαγράμματα 35 με 54 του Παραρτήματος).

Πίνακας 27: Δείκτης  $IC_{50}$  ( $\mu L$  εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	0,55	0,54	0,49	0,48	0,48
2	0,54	0,50	0,47	0,45	0,57
3	0,51	0,50	0,48	0,48	0,63
4	0,49	0,49	0,44	0,46	0,44

\*Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα είναι  $\leq 0,05$ .

Όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Πίνακας 27). Γενικά ο δείκτης  $IC_{50}$  μειώνεται με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης και με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι ο χρόνος εκχύλισης και το ενζυμικό φορτίο έχουν σημαντική επίδραση στην τιμή του δείκτη  $IC_{50}$  ( $p < 0,005$ ) (Πίνακας 14 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με

την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται την 4<sup>η</sup> ώρα της εκχύλισης ( $p < 0,005$ ) (Πίνακας 15 του Παραρτήματος). Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 0,75 και 1 % v/v ενζυμικού φορτίου ( $p < 0,01$ ) (Πίνακας 16 του Παραρτήματος).

### 3.2.3 Εκχυλίσεις σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

#### 3.2.3.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) σε mg γαλλικού οξέος /g πρώτης ύλης, για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 28: TPC (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	95,54±2,97	95,61±1,54	100,49±4,64	106,35±2,97	82,77±0,47
2	93,78±3,12	100,75±0,70	103,10±3,02	105,60±2,19	83,49±1,56
3	96,15±1,42	101,75±0,67	107,39±4,76	110,33±1,63	96,34±1,33
4	106,48±1,55	101,45±3,21	111,26±2,56	107,41±1,33	100,65±0,23

Η αύξηση του ενζυμικού φορτίου και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TPC (Πίνακας 28). Σε κάθε περίπτωση η EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TPC. Ειδικότερα, η εφαρμογή EYE σε NaDES αυξάνει την εκχύλιση των TPC σε ποσοστά από 1 έως και 10% ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι μόνο το ενζυμικό φορτίο έχει σημαντική επίδραση στην εκχύλιση των TPC ( $p < 0,0001$ ) (Πίνακας 17 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του ενζυμικού φορτίου, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται για ενζυμικά φορτία μεγαλύτερα ή ίσα του 0,75 % v/v ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 18 του Παραρτήματος).

#### 3.2.3.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών TFC σε mg κατεχίνης/g πρώτης ύλης, για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h.

Πίνακας 29: TFC (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
1	47,12±3,89	54,16±4,73	55,80±2,57	61,64±1,68	47,97±3,98
2	56,69±1,06	63,94±2,62	58,78±1,41	62,98±3,11	54,38±4,68



<b>3</b>	58,95±0,43	64,52±0,00	61,74±3,55	61,81±1,69	51,57±1,43
<b>4</b>	66,81±0,82	69,74±0,92	66,71±1,66	64,68±2,60	54,51±0,75

Η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί γενικά σε αύξηση της απόδοσης σε TFC (Πίνακας 29). Ειδικότερα για τους χρόνους εκχύλισης 2, 3 και 4 h παρατηρείται μεγαλύτερη απόδοση σε TFC, όταν χρησιμοποιείται ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v. Σε κάθε περίπτωση η EYE σε NaDES βελτιώνει την εκχύλιση των TFC. Ειδικότερα, η εφαρμογή EYE σε NaDES αυξάνει την εκχύλιση των TFC σε ποσοστά από 15 έως και 22% ανάλογα με το ενζυμικό φορτίο.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι μόνο ο χρόνος εκχύλισης έχει σημαντική επίδραση στην εκχύλιση των TFC ( $p < 0,01$ ) (Πίνακας 19 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται για αύξηση του χρόνου εκχύλισης από τις 2 στις 4 h ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 20 του Παραρτήματος).

### 3.2.3.3 Αντιοξειδωτική δράση

Στον Πίνακα 30 παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών  $IC_{50}$  \* για την εκχύλιση με ενζυμικά φορτία 0,1, 0,5, 0,75 και 1% v/v σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλυτή νερό και για την εκχύλιση απουσία ενζύμου, σε χρόνους εκχύλισης 1, 2, 3 και 4 h. Η γραφική παράσταση για την εύρεση του  $IC_{50}$  δημιουργήθηκε μέσω την Εξισώσεων (3) και (4) (Διαγράμματα 55 με 74 του Παραρτήματος).

Πίνακας 30: Δείκτης  $IC_{50}$  ( $\mu L$  εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλυτή νερό

Χρόνος εκχύλισης (h)	Ενζυμικό φορτίο (% v/v)				NaDES
	0,1	0,5	0,75	1,0	
<b>1</b>	0,52	0,51	0,59	0,53	0,64
<b>2</b>	0,51	0,50	0,57	0,52	0,53
<b>3</b>	0,51	0,50	0,57	0,49	0,51
<b>4</b>	0,51	0,48	0,52	0,46	0,50

\*Η τυπική απόκλιση των μετρήσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα είναι  $\leq 0,05$ .

Όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Πίνακας 30). Γενικά ο δείκτης  $IC_{50}$  μειώνεται με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι τόσο ο χρόνος εκχύλισης όσο και το ενζυμικό φορτίου έχουν σημαντική επίδραση στην τιμή του δείκτη  $IC_{50}$  ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 21 του Παραρτήματος). Επιπλέον, η post-hoc analysis (Duncan Test) αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, έδειξε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται την 4<sup>η</sup> ώρα της εκχύλισης ( $p < 0,005$ ) (Πίνακας 22 του Παραρτήματος). Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται για ενζυμικά φορτία μεγαλύτερα ή ίσα του 0,75% v/v ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 23 του Παραρτήματος).

### 3.2.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων εκχυλίσεων σε NaDES

Η μελέτη των ενζυμικά υποβοηθούμενων εκχυλίσεων σε NaDES έδειξε ότι γενικά η αύξηση του ενζυμικού φορτίου και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγούν σε βελτιωμένη απόδοση σε TPC και TFC.

Όσον αφορά την απόδοση των TPC, μεγαλύτερες τιμές εμφανίζονται στην εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5). Συγκεκριμένα η μεγαλύτερη τιμή που καταγράφηκε είναι  $153,15 \pm 2,51$  mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης (χρόνος εκχύλισης 3 h και ενζυμικό φορτίο 1 % v/v), η οποία είναι 43 % και 38 % υψηλότερη από τις μεγαλύτερες τιμές που καταγράφηκαν κατ' αντιστοιχία για την εκχύλιση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 1 % v/v) και για την εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v). Συνεπώς, εκ των τριών διαλυτών, καταλληλότερος για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων θεωρείται ο NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5).

Όσον αφορά την απόδοση των TFC, μεγαλύτερες τιμές εμφανίζονται στην εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Συγκεκριμένα η μεγαλύτερη τιμή που καταγράφηκε είναι  $69,74 \pm 0,92$  mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v), η οποία είναι 33 % και 30 % υψηλότερη από τις μεγαλύτερες τιμές που καταγράφηκαν κατ' αντιστοιχία για την εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) (χρόνος εκχύλισης 3 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v) και για την εκχύλιση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v). Συνεπώς, εκ των τριών διαλυτών, καταλληλότερος για την εκχύλιση φλαβονοειδών θεωρείται ο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό.

Οι τιμές του δείκτη  $IC_{50}$  βρέθηκαν αρκετά χαμηλές, υποδεικνύοντας υψηλή αντιοξειδωτική δράση όλων των εκχυλισμάτων και με τους τρεις NaDES.

### 3.3 Αναστολή της δράσης των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μία μεταβολική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Ο ΣΔ επηρεάζει το 2% του παγκόσμιου πληθυσμού. Μία θεραπευτική προσέγγιση του ΣΔ αποτελεί η αναστολή της δράσης ενζύμων τα οποία υδρολύουν πολυσακχαρίτες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ένζυμα η α-γλυκοζιδάση (καταλύει την υδρόλυση δισακχαριτών της γλυκόζης προς γλυκόζη) και η α-αμυλάση (καταλύει την υδρόλυση α-1,4-γλυκοζιδικών δεσμών στο άμυλο). Οι αναστολείς της δράσης των προαναφερθέντων ενζύμων δύναται να συντείνουν στην καθυστέρηση απορρόφησης της γλυκόζης στο αίμα (Taslimi & Gulcin, 2017).

Ένζυμα όπως η τυροσινάση, ελαστάση, κολλαγενάση και υαλουρονιδάση εμπλέκονται άμεσα στη γήρανση του δέρματος. Η υπερμελάγχρωση του δέρματος έχει ως βασική αιτία την υπερπαραγωγή μελανίνης. Το ένζυμο τυροσινάση είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μελανίνης. Η αναστολή της δράσης της μπορεί να μειώσει την παραγωγή μελανίνης και να επιτύχει λεύκανση του δέρματος, επιλύοντας αποτελεσματικά την υπερμελάγχρωση (Li et al., 2021).

Ο προσδιορισμός της αναστολή της δράσης των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα εκχυλίσματα, που προέκυψαν από τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, με το πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα Neutrase® σε χρόνο εκχύλισης 4 h. Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα, καθώς παρουσίασαν υψηλό ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και φλαβονοειδών (TFC).

#### 3.3.1 Αναστολή ενζυμικής δράσης της τυροσινάσης

Στους Πίνακες 31, 32 και 33 παρουσιάζεται η % αναστολή της δράσης της τυροσινάσης για τα εκχυλίσματα, που προέκυψαν με την εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό αντίστοιχα. Η % αναστολή της δράσης της τυροσινάσης από το kojic acid, το οποίο χρησιμοποιείται ως αναστολέας, βρέθηκε ίση με 96%.

Πίνακας 31: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

		% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	47
	0,5	51
	0,75	90
	1,0	93
	NaDES	43

Πίνακας 32: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% νερό (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

		% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	45
	0,5	47
	0,75	50
	1,0	61
	NaDES	43

Πίνακας 33: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης τυροσινάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

		% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	61
	0,5	82
	0,75	89
	1,0	92
	NaDES	47

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Πινάκων τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση και με τους τρεις NaDES αναστέλλουν την δράση της τυροσινάσης. Παρατηρείται ότι με την αύξηση του ενζυμικού φορτίου αυξάνεται και η αναστολή της ενζυμικής δράσης. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι ένα μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο επιτρέπει μεγαλύτερη εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, στις οποίες οφείλεται η αναστολή της δράσης της τυροσινάσης.

Για όλα τα ενζυμικά φορτία και για την εκχύλιση μόνο με NaDES, καλύτερα αποτελέσματα φάνηκε να έχει ο NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Παρατηρείται ότι για την εκχύλιση με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) επιτυγχάνεται 93% αναστολή (Πίνακας 31), ενώ για την εκχύλιση με ίδιο ενζυμικό φορτίο σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν- διαλύτη νερό επιτυγχάνεται 92% αναστολή (Πίνακας 33). Οι τιμές αυτές προσεγγίζουν αρκετά την αναστολή, που επιτυγχάνεται με το kojic acid (96%).

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες, οι οποίες εξετάζουν την αναστολή της δράσης της τυροσινάσης από εκχυλίσματα φυτών σε NaDES. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού *Cytinus hypocistis L.* με τη χρήση συμβατικών διαλυτών και NaDES. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σε NaDES παρουσίασαν ενισχυμένη ικανότητα αναστολής της δράσης της τυροσινάσης. Καθώς τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν και υψηλό ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), η ικανότητα αυτή να μπορεί να αποδοθεί εκεί (Zengin et al., 2022). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των εκχυλισμάτων από τη φλούδα πορτοκαλιού, με τη χρήση NaDES διαφορετικών αναλογιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα αυτά παρουσίασαν επίσης ενισχυμένη ικανότητα αναστολής της δράσης της τυροσινάσης, αλλά και υψηλό ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) (Lin, 2022).

### 3.3.2 Αναστολή ενζυμικής δράσης της α-γλυκοζιδάσης

Στους Πίνακες 34, 35 και 36 παρουσιάζεται η % αναστολή της δράσης της α-γλυκοζιδάσης για τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη με (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό αντίστοιχα. Παρατίθεται τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση της μέγιστης αναστολής (mg εκχυλίσματος/ mL ρυθμιστικού διαλύματος) με την επί τοις εκατό αναστολή στη συγκέντρωση αυτή.

Πίνακας 34: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

		Συγκέντρωση μέγιστης αναστολής	% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	20,0	87
	0,5	10,3	86
	0,75	7,2	86
	1,0	4,3	80
NaDES		11,4	87

Πίνακας 35: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

		Συγκέντρωση μέγιστης αναστολής	% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	10,3	65
	0,5	9,5	63
	0,75	5,0	67
	1,0	5,0	66
NaDES		9,3	38

Πίνακας 36: Επί τοις εκατό αναστολή δράσης α-γλυκοζιδάσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

		Συγκέντρωση μέγιστης αναστολής	% αναστολή
Ενζυμικό φορτίο (% v/v)	0,1	11,4	57
	0,5	10,1	47
	0,75	5	58
	1,0	4,3	40
NaDES		10,3	51

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Πινάκων, η δράση της α-γλυκοζιδάσης αναστέλλεται από τα εκχυλίσματα, που προέκυψαν από την εκχύλιση και με τους τρεις NaDES. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται το ενζυμικό φορτίο, η συγκέντρωση στην οποία εμφανίζεται η μέγιστη αναστολή μειώνεται. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η αύξηση του ενζυμικού φορτίου οδηγεί σε αυξημένη εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, που είναι σε θέση να αναστέλλουν τη δράση της α-γλυκοζιδάσης. Μεγαλύτερη αναστολή της δράσης του εν λόγω ενζύμου παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5).

Οι έρευνες που έχουν γίνει, με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα των εκχυλισμάτων σε NaDES να αναστέλλουν την δράση της α-γλυκοζιδάσης, είναι λίγες. Ωστόσο στη μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού *Cytinus hyrocistis L.* με τη χρήση παραδοσιακών διαλύτων και NaDES, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σε NaDES ήταν καλοί αναστολείς της δράσης της α-γλυκοζιδάσης (Zengin et al., 2022).

## 4 Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας διπλωματικής αποτέλεσε η πράσινη προσέγγιση της διεργασίας εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*

Διερευνήθηκε η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme Assisted Extraction) σε φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES). Χρησιμοποιήθηκε το πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα Neutralse® σε τρεις διαφορετικούς φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES). Οι NaDES που εξετάστηκαν ήταν (α) φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1:5, β) προλίνη:γλυκερόλη σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2 με 20 % w/w συν-διαλύτη νερό (γ) βεταΐνη:γλυκερόλη σε γραμμομοριακή αναλογία 1:3 με 20 % w/w συν-διαλύτη νερό.

Πρώτο στάδιο της παρούσας διπλωματικής αποτέλεσε η μελέτη της σταθερότητας του ενζύμου στους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES) και σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH (8, 7,5 και 7). Οι τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν ίδιες με αυτές των NaDES. Η μελέτη θερμικής σταθερότητας, έδειξε χαμηλότερες τιμές της σταθεράς θερμικής απενεργοποίησης ( $k_d$ ) και υψηλότερες τιμές χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) και χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D) και για τα τρία συστήματα NaDES-ένζυμο συγκριτικά με τα συστήματα ρυθμιστικό διάλυμα-ένζυμο αποδεικνύοντας ότι το ένζυμο απενεργοποιείται βραδύτερα, όταν επωάζεται σε NaDES. Οι διαφορές στις τιμές των υπολογιζόμενων σταθερών ήταν πολύ μεγαλύτερες μεταξύ των δύο συστημάτων σε υψηλές θερμοκρασίες (50 °C – 70 °C). Ειδικότερα, στους 50 °C καταγράφηκε:

- 63 % μείωση του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) κατά την επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8, συγκριτικά με την επώαση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5),
- 59 % μείωση του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) κατά την επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5 συγκριτικά με την επώαση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό
- 87 % μείωση του χρόνου ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) κατά την επώαση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7 συγκριτικά με την επώαση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Στους 60 °C οι χρόνοι ημιζωής του ενζύμου στους τρεις NaDES κυμάνθηκαν από 8 έως 15 ώρες ενώ στα ρυθμιστικά διαλύματα από 1 έως 1,5 ώρες. Είναι φανερό ότι οι NaDES αποτελούν ένα θερμοπροστατευτικό περιβάλλον για τα ένζυμα.

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι  $\Delta H^*$ ,  $\Delta S^*$  και  $\Delta G^*$  του ενζύμου στους τρεις NaDES καταδεικνύουν σταθερότερο περιβάλλον για το ένζυμο τον NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό έναντι των άλλων δύο NaDES.

Δεύτερο στάδιο της έρευνας αποτέλεσε η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε NaDES, όπου εξετάστηκε η ταυτόχρονη επίδραση του ενζυμικού φορτίου και του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης. Η απόδοση της διεργασίας αξιολογήθηκε με βάση τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC) και την αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Επίσης, προσδιορίστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση.

Η μελέτη των ενζυμικά υποβοηθούμενων εκχυλίσεων σε NaDES έδειξε ότι η απόδοση της εκχύλισης σε TPC και TFC εξαρτάται τόσο από το ενζυμικό φορτίο όσο και από τον χρόνο εκχύλισης. Συγκεκριμένα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καταγράφηκαν υψηλότερες αποδόσεις σε TPC και TFC με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης και του ενζυμικού φορτίου. Επιπλέον, μεταξύ των NaDES εμφανίστηκαν διαφοροποιήσεις ως προς τα ποσοστά των εκχυλισθέντων βιοδραστικών ενώσεων στις ίδιες πάντα συνθήκες χρόνου και ενζυμικού φορτίου.

Η EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) εμφάνισε μεγαλύτερη εκχυλισσιμότητα σε φαινολικές ενώσεις καθώς καταγράφηκαν  $153,15 \pm 2,51$  mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης (χρόνος εκχύλισης 3 h και ενζυμικό φορτίο 1 % v/v), η οποία είναι 43 % και 38 % υψηλότερη από τις μεγαλύτερες τιμές που καταγράφηκαν κατ' αντιστοιχία για την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 1 % v/v) και για την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v). Επιπλέον, φαίνεται πως η EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) ολοκληρώνεται σε 3 ώρες ενώ στους δύο άλλους NaDES απαιτείται επιπλέον μία ώρα. Όσον αφορά στην απόδοση των TFC, μεγαλύτερες τιμές εμφανίστηκαν κατά την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό. Συγκεκριμένα η μεγαλύτερη τιμή που καταγράφηκε ήταν  $69,74 \pm 0,92$  mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v), η οποία είναι 33 % και 30 % υψηλότερη από τις μεγαλύτερες τιμές που καταγράφηκαν κατ' αντιστοιχία για την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) (χρόνος εκχύλισης 3 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v) και για την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό (χρόνος εκχύλισης 4 h και ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v) και επιπλέον απαιτείται το μικρότερο ενζυμικό φορτίο. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας σε TPC και TFC φάνηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις η EYE σε NaDES υπερισχύει της εκχύλισης μόνο με NaDES. Τέλος όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Από τη μελέτη της αναστολής της δράσης των ενζύμων τυροσινάση και α-γλυκοζιδάση, η οποία εμφάνισε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα για όλα εκχυλίσματα, αποδεικνύεται ότι οι βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο περικάρπιο του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, πράγματι προσδίδουν στο φυτό αντιγηραντική και αντιδιαβητική δράση.



## 5 Προοπτικές για έρευνα

Βάσει των συμπερασμάτων που προέκυψαν από την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται οι ακόλουθες προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

1. Μελέτη θερμικής σταθερότητας του πρωτεολυτικού εμπορικού σκευάσματος Neutrase® σε άλλα είδη NaDES
2. Μελέτη θερμικής σταθερότητας υδρολυτικών ενζύμων που σχετίζονται με την αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, όπως κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και πηκτινάσες, σε διάφορους NaDES
3. Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν την EYE σε NaDES όπως διαφορετικές αναλογίες στερεού-υγρού και διαφορετική κοκκομετρία της πρώτης ύλης (*Rosa Canina L.*)
4. Πραγματοποίηση ελέγχου αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την EYE στους εξεταζόμενους NaDES
5. Τεχνοοικονομική μελέτη με σκοπό την κλιμάκωση μεγέθους της διεργασίας

## 6 Βιβλιογραφία

- Ahmed, F., & Iqbal, M. (2018). Antioxidant activity of *Ricinus communis*. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(4), 107-112. <https://dx.doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.05.555667>
- Amin, F., Asad, S. A., Nazli, Z. I. H., Kalsoom, U., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2023). Immobilization, biochemical, thermodynamic, and fruit juice clarification properties of lignocellulosic biomass-derived exo-polygalacturonase from *Penicillium paxilli*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(14), 13181-13196. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02559-1>
- Bärlocher, F., & Graça, M. A. (2020). Total phenolics. *Methods to study litter decomposition: a practical guide*, 157-161. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_18)
- Barrett, A.J. (1994). Classification of peptidases *Methods in Enzymology*, 244, 1-15, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44003-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44003-4).
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32, 216-232. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9272-x>
- Benvenuti, L., Zielinski, A. A. F., & Ferreira, S. R. S. (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>.
- Bhat, M.K. & Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3-4), 583-620. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00006-2)
- Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). *Plant physiology, development and metabolism*. Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1\\_33](https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33)
- Bindu, V. U., & Mohanan, P. V. (2020). Thermal deactivation of  $\alpha$ -amylase immobilized magnetic chitosan and its modified forms: a kinetic and thermodynamic study. *Carbohydrate Research*, 498, 108185. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108185>
- Burns, J. K. (1991). The polygalacturonases and lyases. *The chemistry and technology of pectin*, 165-188.
- Bustamante-Vargas, C. E., Junges, A., Venquiaruto, L. D., Oro, C. E. D., Julio-Orozco, D. J., Zabot, G. L., ... & Dallago, R. M. (2019). Thermal inactivation kinetics and thermodynamic properties of immobilised *Aspergillus niger* pectinase in rigid polyurethane foam. *International Food Research Journal*, 26(5), 1535-1545.
- Chen, H., Zhou, X., & Zhang, J. (2014). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydrate polymers*, 111, 567-575.
- Chen, S., Xing, X. H., Huang, J. J., & Xu, M. S. (2011). Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.017>

Cheng, X., Bi, L. Zhao, Z. & Chen, Y. (2015). Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products, *Advances in Engineering Research*, 371-375

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant physiology*, 156(4), 1701-1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.

Costa, J.R., Tonon, R.V., Cabral, L., Gottschalk, L., Pastrana, L. & Pintado, M.E. (2020). Valorization of Agricultural Lignocellulosic Plant Byproducts through Enzymatic and Enzyme-Assisted Extraction of High-Value-Added Compounds: A Review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(35), 13112-13125. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02087>

Cutler, R.R. (2003). SECONDARY METABOLITES | Medicinal and Pharmaceutical Uses . In: A.V. Roberts (Ed), *Encyclopedia of Rose Science*, (pp. 716-726). <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00094-X>.

Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K., & Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. *Extremophiles*, 12, 51-59. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0089-7>

Das, S., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2021). Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 899-917. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.060>

de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food chemistry*, 212, 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047>.

de Oliveira, R.L., da Silva, M.F., da Silva, S.P., Cavalcanti, J. V. F. L., Converti, A., & Porto, T. S. (2020). Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. *Food and Bioprocess Processing*, 122, 169-182. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.001>

de Queirós, L.D., Dias, F.F.G., de Ávila, A.R.A., Macedo, J.A., Macedo, G.A., & de Moura, J.M.L.N. (2021). Effects of enzyme-assisted extraction on the profile and bioaccessibility of isoflavones from soybean flour. *Food Research International*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110474>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.022>

Deylami, M. Z., Rahman, R. A., Tan, C. P., Bakar, J. A. M. I. L. A. H., & Olusegun, I. (2014). Thermodynamics and kinetics of thermal inactivation of peroxidase from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp. *Journal of Engineering Science and Technology*, 9(3), 374-383.

- Fattahi, A., Niyazi, F., Shahbazi, B., Farzaei, M. H., & Bahrami, G. (2017). Antidiabetic mechanisms of *Rosa canina* fruits: an in vitro evaluation. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(1), 127-133. <https://doi.org/10.1177/2156587216655263>
- Frankenberger, W.T. & Johanson, J.B. (1982). Effect of pH on enzyme stability in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 433-437. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90101-8).
- Freitas, D. S., Rocha, D., Castro, T. G., Noro, J., Castro, V. I., Teixeira, M. A., ... & Silva, C. (2022). Green extraction of cork bioactive compounds using natural deep eutectic mixtures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(24), 7974-7989. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01422>
- Gabrielii, I. & Gatenholm, P. (1998). Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1661-1667 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980822\)69:8<1661::AID-APP19>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980822)69:8<1661::AID-APP19>3.0.CO;2-X)
- Ghazghazi, H., Miguel, M.G., Hasnaoui, B., Sebei, H., Ksontini, M., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G. & Barroso J.G. (2010). Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities, *African Journal of Biotechnology*, 9(18), 2709-2716
- Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2020). Industrial use of cell wall degrading enzymes: the fine line between production strategy and economic feasibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 356.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G. & Ferreira I.C.F.R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review, *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302-315. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029>
- Gohel, S. D., & Singh, S. P. (2013). Characteristics and thermodynamics of a thermostable protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete. *International journal of biological macromolecules*, 56, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.01.028>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Gulfi, M., Arrigoni, E. and Amadò, R. (2007). In vitro fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions, *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.018>
- Heinze, T. (2015). Cellulose: Structure and Properties,. *Advances in Polymer Science*, 271, 1-52. [https://doi.org/10.1007/12\\_2015\\_319](https://doi.org/10.1007/12_2015_319)
- Houfani, A.A., Anders, N., Spiess, A.C., Baldrian, P. & Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. *Biomass and Bioenergy*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>
- Hu J., Arantes V. & Saddler J.N. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?. *Biotechnol Biofuels*, 4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-36>

- Ioelovich, M. (2008). Cellulose as a nanostructured polymer: A short review. *Bioresources*, 3, 1403-1418. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.3.4.Ioelovich>
- Jahromi, R.R.F., Morris, P., Martinez-Torres, R.J. & Dalby, P.A. (2011). Structural stability of *E. coli* transketolase to temperature and pH denaturation, *Journal of Biotechnology*, 155(2), 209-216, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.023>.
- Jayasekara, S. and Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications., In: Pascual, A.R. & Martín, M.E. (Eds), *Cellulose*. <https://www.intechopen.com/chapters/66517>
- Jemaa, H. B., Jemia, A. B., Khlifi, S., Ahmed, H. B., Slama, F. B., Benzarti, A., ... & Aouidet, A. (2017). Antioxidant activity and  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of *Rosa canina* L. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 14(2), 1-8.
- Jensen, W. A., Armstrong, J. M., De Giorgio, J., & Hearn, M. T. (1997). Thermodynamic analysis of the stabilisation of pig heart mitochondrial malate dehydrogenase and maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by different salts, amino acids and polyols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338(2), 186-198.
- Jürgens, A., Seitz, B. & Kowarik, I. (2007). Genetic differentiation of *Rosa canina* (L.) at regional and continental scales. *Plant Systematics and Evolution*, 269, 39–53. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0569-3>
- Karimov, O.K., Kolchina, G.Y. & Movsumzade, E.M. (2020). The Structures and Reactivity of Phenylpropane Units of Lignin. *Chemistry Research Journal*, 8-13
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant physiology*, 154(2), 483-486.
- Khatri, S., Paramanya, A., & Ali, A. (2019). Phenolic acids and their health-promoting activity. *Plant and Human Health, Volume 2: Phytochemistry and Molecular Aspects*, 661-680. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-03344-6\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-030-03344-6_27)
- Latif, S., Diosady, L. L., & Anwar, F. (2008). Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from canola (*Brassica napus* L.) seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 887-892. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700319>
- Li, M. X., Xie, J., Bai, X., & Du, Z. Z. (2021). Anti-aging potential, anti-tyrosinase and antibacterial activities of extracts and compounds isolated from *Rosa chinensis* cv. 'JinBian'. *Industrial Crops and Products*, 159, 113059. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113059>
- Lin, L. (2022). Phenolic acid extraction from orange peel with natural deep eutectic solvents. In: *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2321, No. 1).
- Liu, J.J., Gasmalla, M.A.A., Li, P., & Yang, R. (2016). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.002>.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>

- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., & Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in plant science*, 8.
- Lu, Y., He, Q., Fan, G., Cheng, Q. & Song, G. (2021). Extraction and modification of hemicellulose from lignocellulosic biomass: A review. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 779-804. <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0065>
- Łubek-Nguyen, A., Ziemichód, W. & Olech, M. (2022). Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications, *Applied Sciences*, 12. <https://doi.org/10.3390/app12073232>
- Luque de Castro, M.D. & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.
- Marathe, S.J., Jadhav, S.B., Bankar, S.B., Singhal, R.S. (2017). Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives. In: Puri, M. (Eds), *Food Bioactives*, (pp 171-201). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4_8)
- Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z. & Yousefian, S. (2011). Phytochemical contents and biological activities of Rosa canina fruit from Iran, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4584-4589.
- Mota, T.R., Oliveira, D.M., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O. & Santos, W.D. (2018) . Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. *AIMS Bioengineering*, 5(1), 63-77 <https://doi.org/10.3934/bioeng.2018.1.63>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>.
- Nadeak, L., Girsang, E., Ginting, C. N., & Chiuman, L. (2020). Activity of rose flower extract and resephthakulum as antioxidant and anti-tyrosinase.
- Naidu, D.S., Hlangothi, S.P. & John M.J. (2018). Bio-based products from xylan: A review, *Carbohydrate Polymers*, 179, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>
- Navone, L., & Speight, R. (2018). Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLoS One*, 13(8), e0202608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202608>
- Nawrot-Chorabik, K., Sułkowska, M. & Gumulak, N. (2022). Secondary Metabolites Produced by Trees and Fungi: Achievements So Far and Challenges Remaining. *Forests*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/f13081338>
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Gulpinar, A. R., Sekeroglu, N., Kartal, M., & Sener, B. (2012). Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of

Pistacia terebinthus L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chemistry*, 130(4), 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.119>

Ortega, N., Sáez, L., Palacios, D., & Busto, M. D. (2022). Kinetic Modeling, Thermodynamic approach and molecular dynamics simulation of thermal inactivation of lipases from *Burkholderia cepacia* and *Rhizomucor miehei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6828. <https://doi.org/10.3390/ijms23126828>

Pagano, I., Campone, L., Celano, R., Piccinelli, A.L. & Rastrelli L. (2021). Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*, 1651. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462295>

Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The chemistry behind the folin–ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543-17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>

Phetcharat, L., Wongsuphasawat, K., & Winther, K. (2015). The effectiveness of a standardized rose hip powder, containing seeds and shells of *Rosa canina*, on cell longevity, skin wrinkles, moisture, and elasticity. *Clinical interventions in aging*, 1849-1856. <https://doi.org/10.2147/CIA.S90092>

Phyo, P., Gu, Y. & Hong, M. (2019). Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR, *Cellulose*, 26, 291–304. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2094-7>

Popa, V.I. & Spiridon, J. (1998). Hemicelluloses: structure and properties, *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 297-311.

Qadir, R., Anwar, F., Naseem, K., Tahir, M. H., & Alhumade, H. (2022). Enzyme-Assisted Extraction of Phenolics from *Capparis spinosa* Fruit: Modeling and Optimization of the Process by RSM and ANN. *ACS omega*, 7(37), 33031-33038. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02850>

Ranveer, R.C., Patil, S.N., & Sahoo, A.K. (2013). Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 370-375. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.006>.

Rao, J., Lv, Z. Chen, G. & Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>

Rashidi, M., Konarova, M., Aslam, W. & Beltramini, J.N. (2018). TiN-Cu Heterogeneous Nanocatalysts for Effective Depolymerisation of Oxidised Lignin. *ChemistrySelect*, 3(12), 3379-3385. <https://doi.org/10.1002/slct.201702771>

Ricarte, G. N., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., & Ribeiro, B. D. (2020). Enzyme-assisted extraction of carotenoids and phenolic compounds from sunflower wastes using green solvents. *3 Biotech*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02393-0>

Ringli, C., Hauf, G., & Keller, B. (2001). Hydrophobic interactions of the structural protein GRP1. 8 in the cell wall of protoxylem elements. *Plant physiology*, 125(2), 673-682.

- Ropartz, D. & Ralet, MC. (2020). Pectin Structure. *Pectin: Technological and Physiological Properties*, 17-36, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M. & Latha L.Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM*, 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/>
- Selahvarzian, A., Alizadeh, A., Baharvand, P.A., Eldahshan, O.A. & Rasoulia, B. (2018). Medicinal Properties of *Rosa canina L.* *Herbal Medicines Journal*, 3(2), 77-84 <https://doi.org/10.22087/hmj.v3i2.703>
- Shallom, D. & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228, [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)
- Sharma, N., Rathore, M. & Sharma, M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 45–60 <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>
- Sharma, O.P., & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
- Souza, T.S.P. & Kawaguti, H.Y. (2021). Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry, *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1446–1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>
- Streimikyte, P., Viskelis, P., & Viskelis, J. (2022). Enzymes-assisted extraction of plants for sustainable and functional applications. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2359. <https://doi.org/10.3390/ijms23042359>
- Sutton, A. T., Fraige, K., Leme, G. M., da Silva Bolzani, V., Hilder, E. F., Cavalheiro, A. J., ... & Funari, C. S. (2018). Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography—searching for alternatives to organic solvents. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, 3705-3713. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1027-5>
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z. & Zhao, Y. (2020). The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2992468>
- Taslimi, P., & Gulçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: In vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on  $\alpha$ -glycosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10). <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>
- Tiwari, A. K., Swapna, M., Ayesha, S. B., Zehra, A., Agawane, S. B., & Madhusudana, K. (2011). Identification of proglycemic and antihyperglycemic activity in antioxidant rich fraction of some common food grains. *International Food Research Journal*, 18(3).



- Ünlü, A. E. (2021). Green and non-conventional extraction of bioactive compounds from olive leaves: screening of novel natural deep eutectic solvents and investigation of process parameters. *Waste and biomass valorization*, 12, 5329-5346. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01411-3>
- Usmani, Z., Sharma, M., Tripathi, M., Lukk, T., Karpichev, Y., Gathergood, N., ... & Gupta, V. K. (2023). Biobased natural deep eutectic system as versatile solvents: Structure, interaction and advanced applications. *Science of The Total Environment*, 881, 163002. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163002>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>.
- Vanda, H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G., & Choi, Y. H. (2019). Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep eutectic solvents: Synthesis, properties, and applications*, 61-81. <https://doi.org/10.1002/9783527818488.ch4>
- Vo, T. P., Tran, T. Q. D., Phan, T. H., Huynh, H. D., Vo, T. T. Y., Vo, N. M. K., ... & Nguyen, D. Q. (2023). Ultrasonic-assisted and enzymatic-assisted extraction to recover tannins, flavonoids, and terpenoids from used tea leaves using natural deep eutectic solvents. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(11), 5855-5864. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16688>
- Wang, C., Shen, Z., Cui, X., Jiang, Y., & Jiang, X. (2020). Response surface optimization of enzyme-assisted extraction of R-phycoerythrin from dry *Pyropia yezoensis*. *Journal of applied phycology*, 32, 1429-1440. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01963-x>
- Withers, S., Lu, F. Kim, H., Zhu, Y., Ralph, J. & Wilkerson C.G. (2012). Identification of Grass-specific Enzyme That Acylates Monolignols with p-Coumarate. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8347–8355 <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284497>
- Wusigale, Liang, L. & Luo, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 391-403, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.027>
- Yahya, N.A., Attan, N. & Wahab, R.A. (2018). An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 112, 69-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.002>.
- Yao, J., Li, C., Xiao, L., Wu, Y., Wu, Q., Cui, Z., & Wang, B. (2022). Influence of natural deep eutectic solvents on stability and structure of cellulase. *Journal of Molecular Liquids*, 346. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118238>
- Yin, X., You, Q. & Jiang, Z. (2011). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology, *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1358-1364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.053>.
- Zengin, G., Cádiz-Gurrea, M. D. L. L., Fernández-Ochoa, Á., Leyva-Jiménez, F. J., Carretero, A. S., Momotko, M., ... & Boczkaj, G. (2022). Selectivity Tuning by Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) for Extraction of Bioactive Compounds from *Cytinus Hypocistis*—

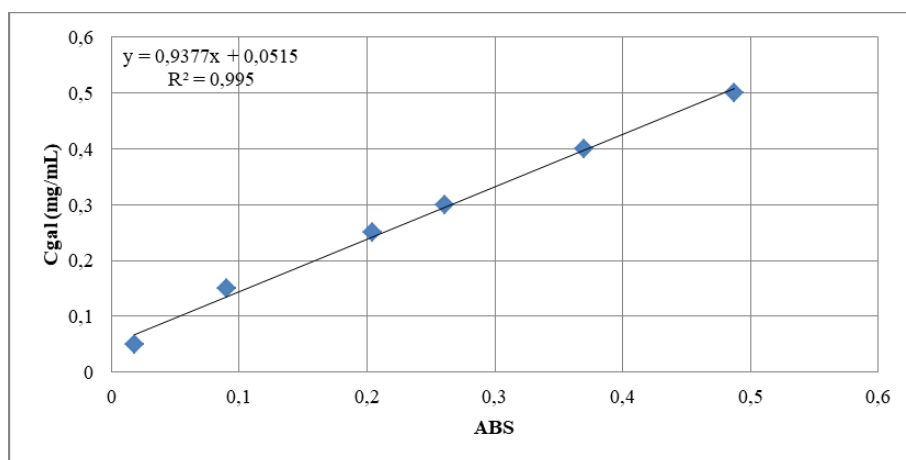
Studies of Antioxidative, Enzyme-Inhibitive Properties and LC-MS Profiles. *Molecules*, 27(18), 5788. <https://doi.org/10.3390/molecules27185788>

Zhang, Q.W., Lin, L.G. & Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chinese Medicine*, 13(20). <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

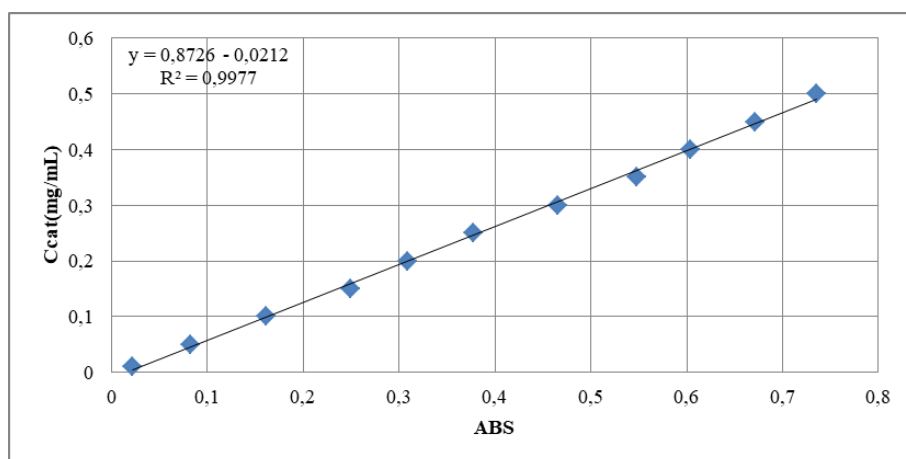
Χαμηλάκης Σ. (2022). *Φυσικά Προϊόντα* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://dx.doi.org/10.57713/kallipos-6>

## 7 Παράρτημα

Στα Διαγράμματα 1 και 2 παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το γαλλικό οξύ και την κατεχίνη, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) και φλαβονοειδή (TFC).

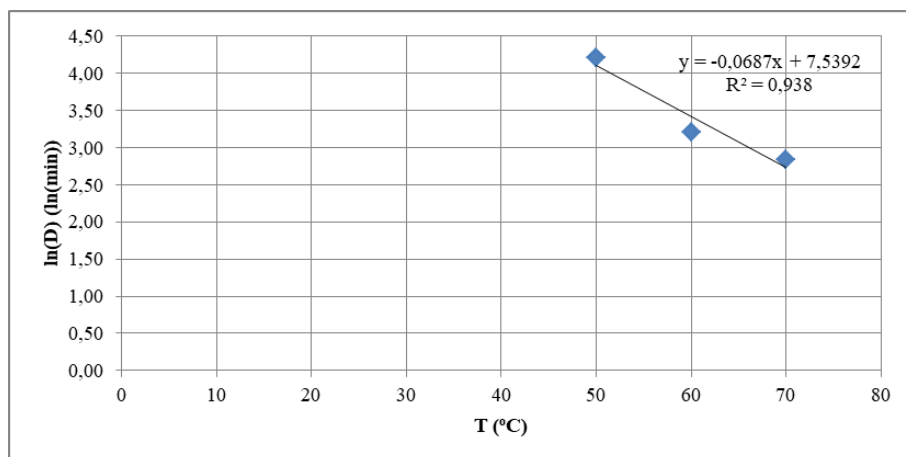


Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (mg/m) για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

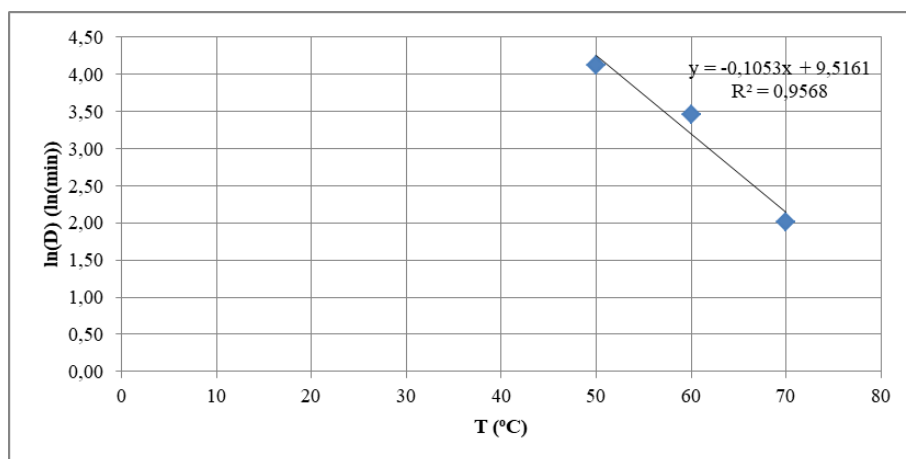


Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (mg/mL) για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου

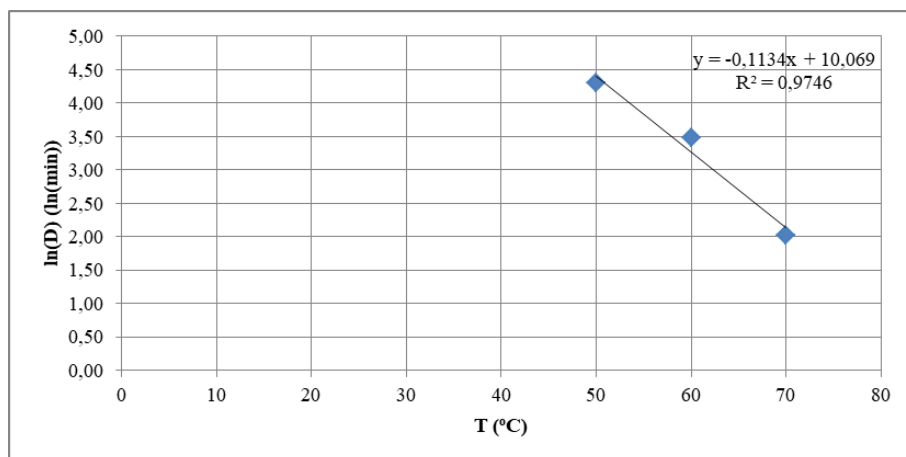
Στα Διαγράμματα 3 με 8 παρουσιάζεται η γραμμική μεταβολή του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$ , σύμφωνα με την Εξίσωση 9.



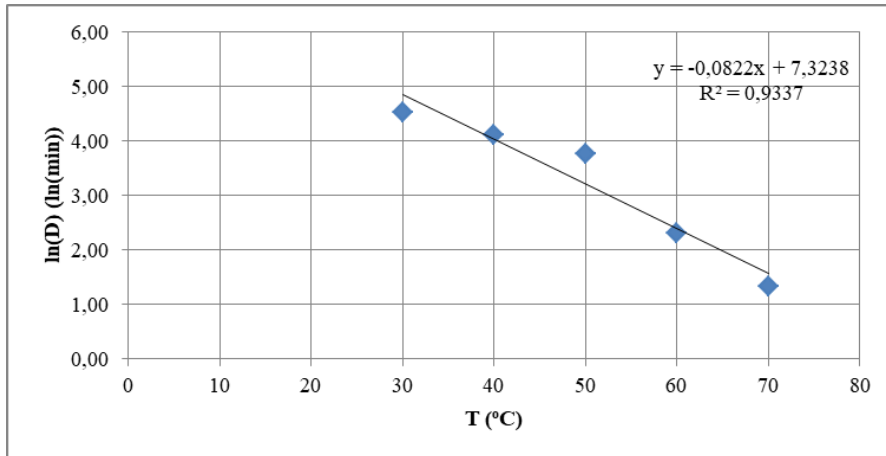
Διάγραμμα 3: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 50-70 °C για το NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)



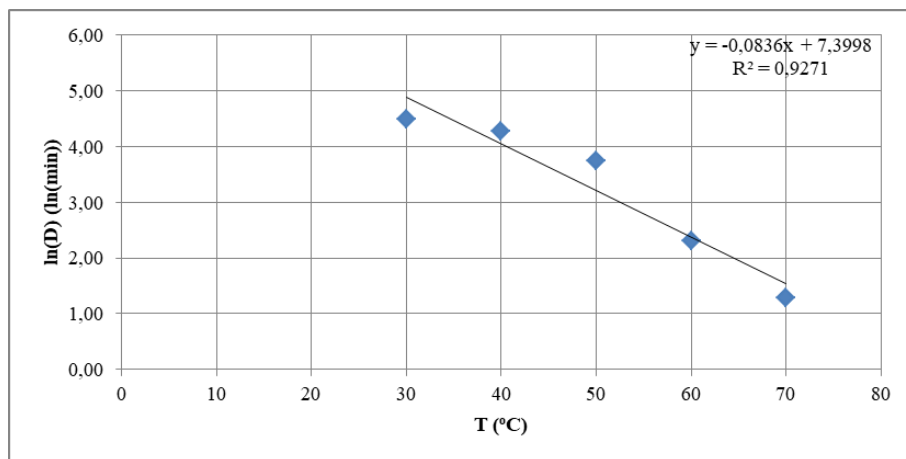
Διάγραμμα 4: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 50-70 °C για το NaDES προλίνη:γλυκερόλη(1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό.



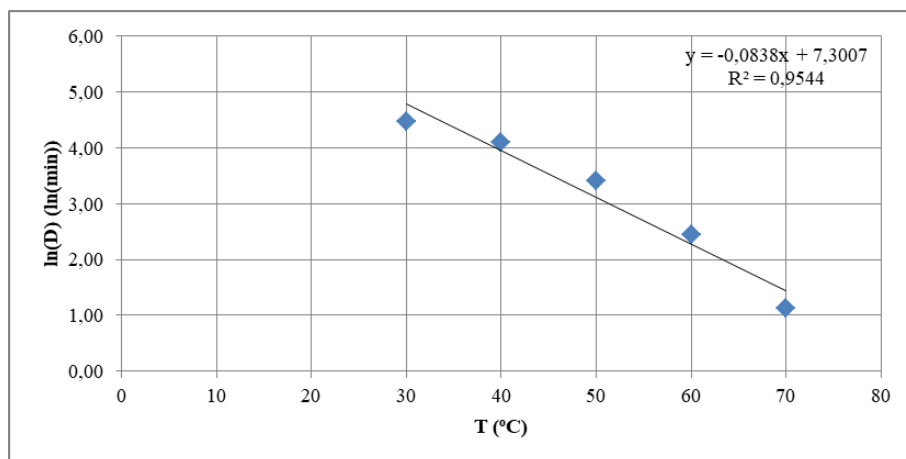
Διάγραμμα 5: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 50-70 °C για το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό



Διάγραμμα 6: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8



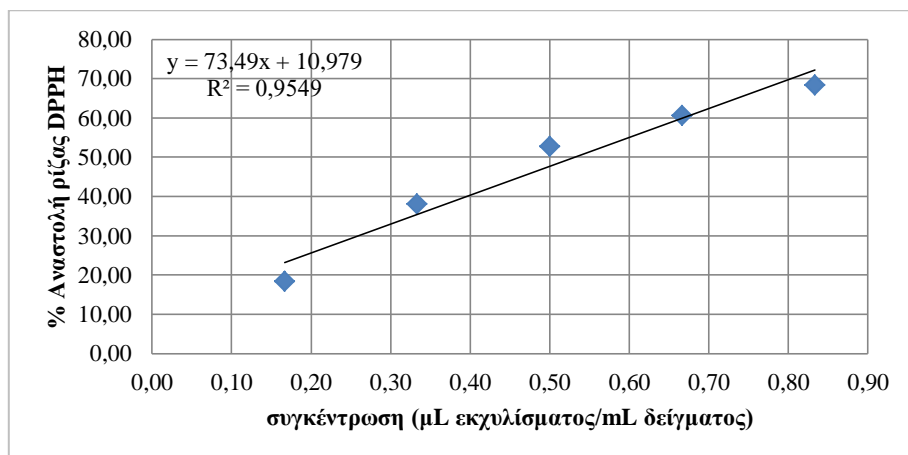
Διάγραμμα 7: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5



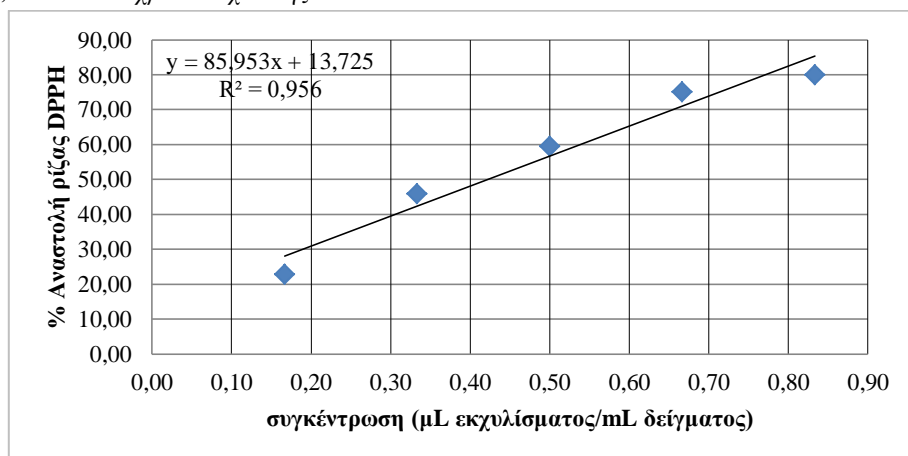
Διάγραμμα 8: Αναπαράσταση γραμμικής μεταβολής του  $\ln(D)$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για την εύρεση της τιμής  $Z$  στο εύρος θερμοκρασιών 30-70 °C για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5

Επίσης στα Διαγράμματα 9 με 74 παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναστολή της ρίζας του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τις ενζυμικά υποβοηθούμενες εκχυλίσεις του περικαρπίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου *Rosa Canina L.*, με το πρωτεολυτικό εμπορικό σκεύασμα Neutrase® σε

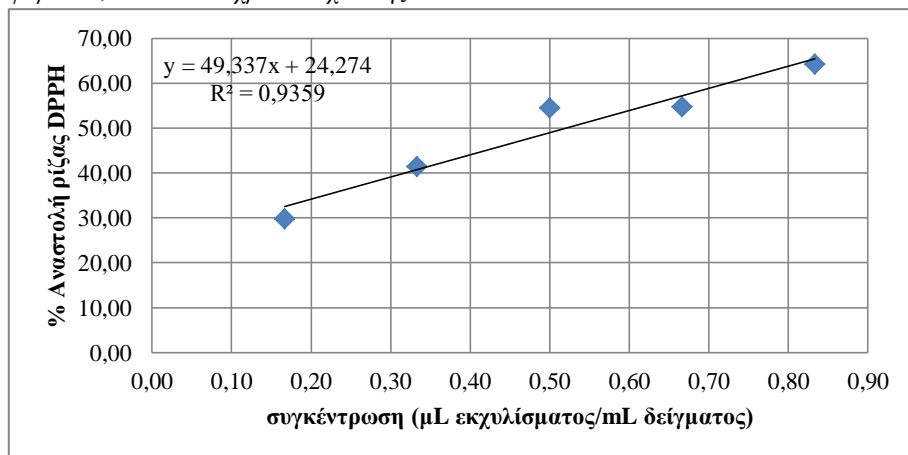
NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό.



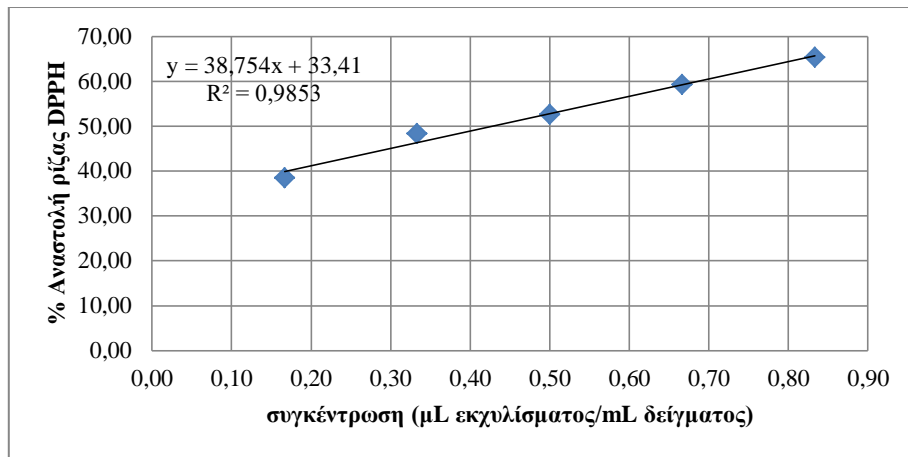
Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



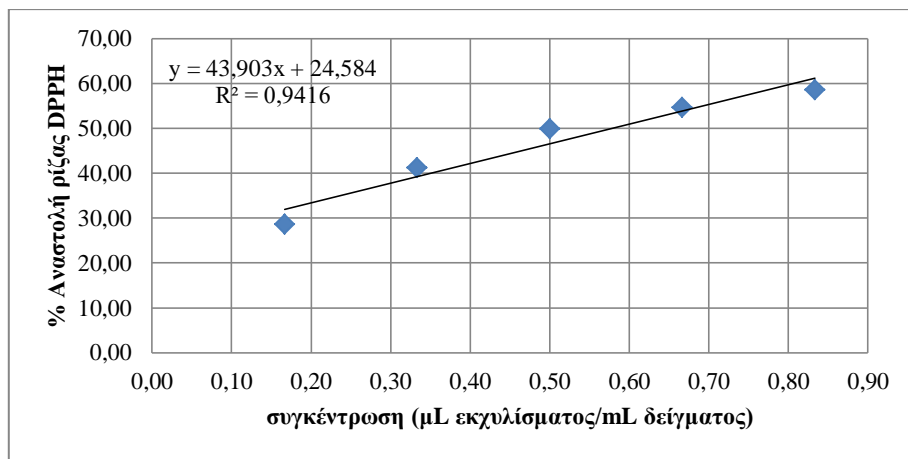
Διάγραμμα 16: Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



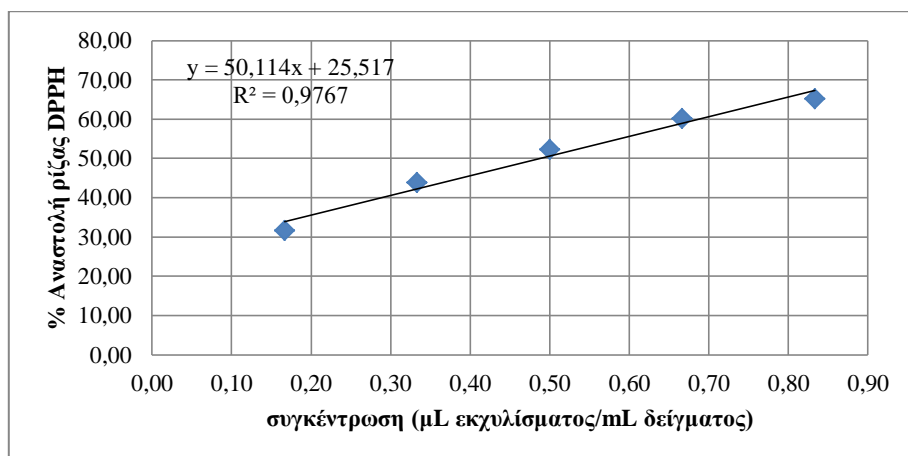
Διάγραμμα 17: Ποσοστιαία αναστολή της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



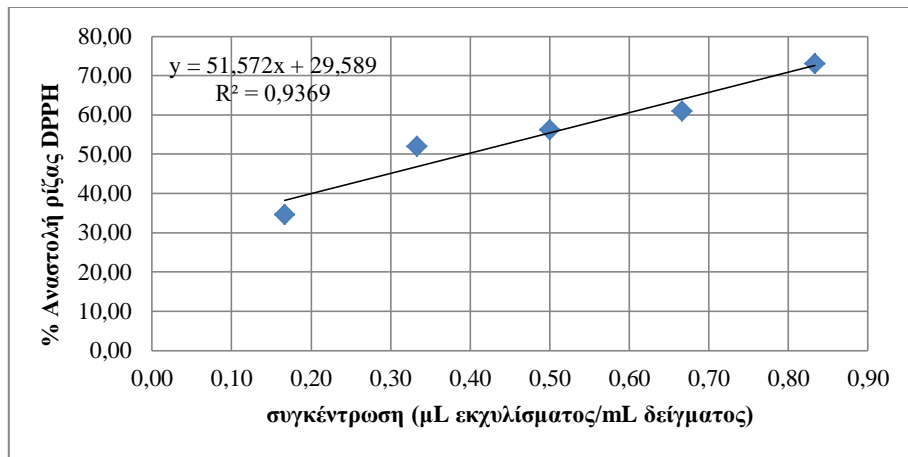
Διάγραμμα 18: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



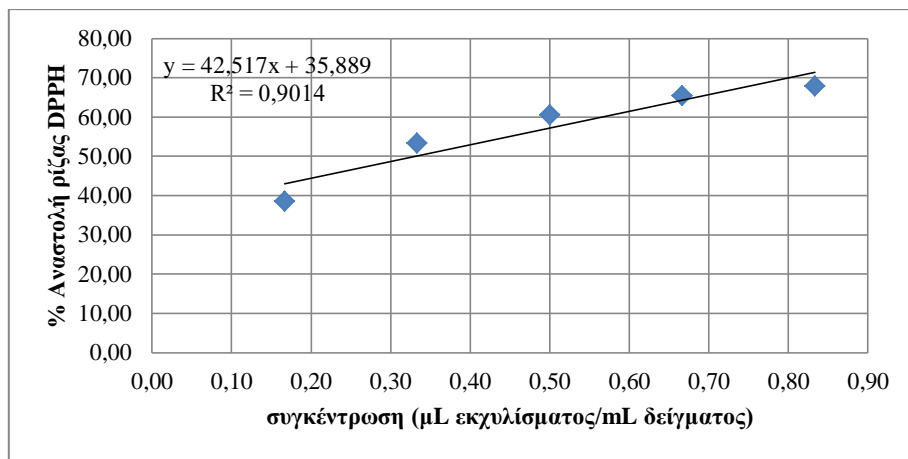
Διάγραμμα 19: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



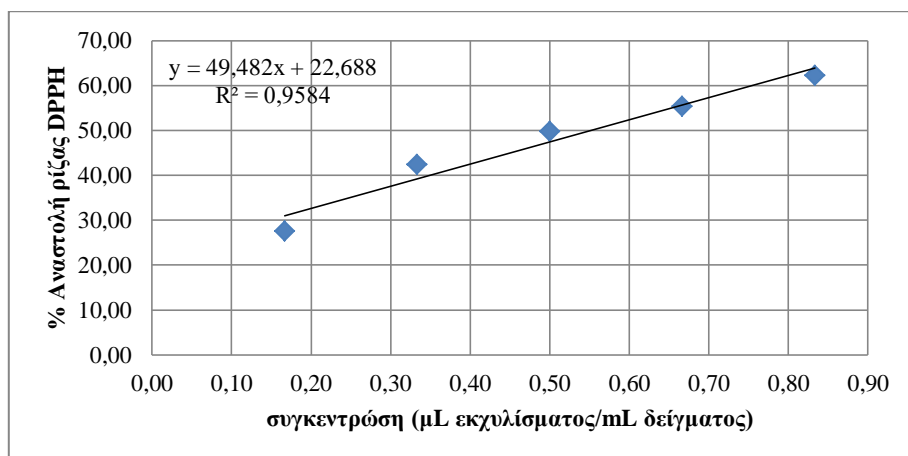
Διάγραμμα 20: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



Διάγραμμα 21: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h

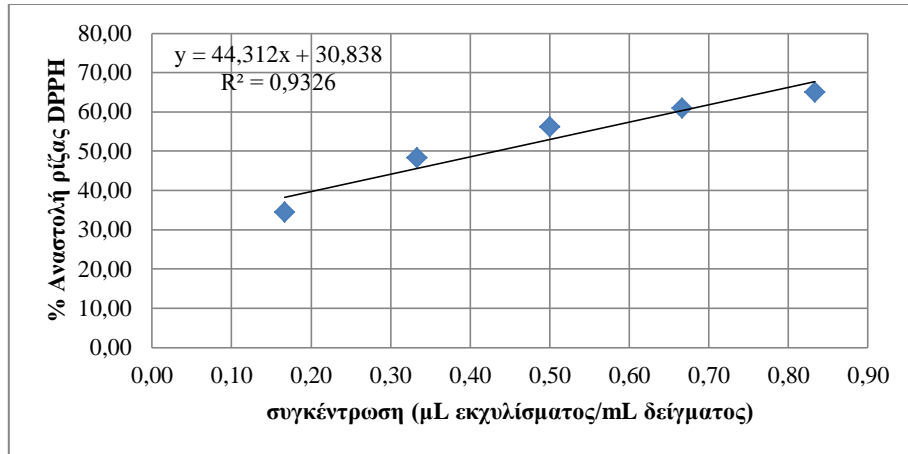


Διάγραμμα 22: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h

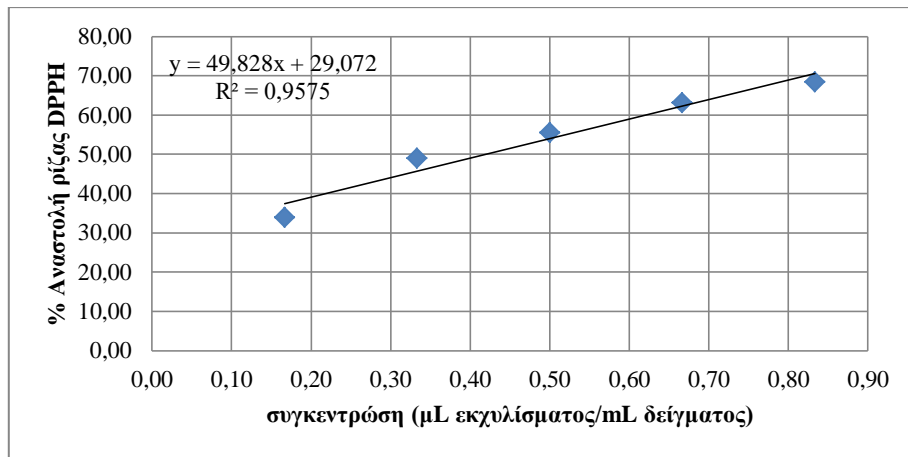


Διάγραμμα 23: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h

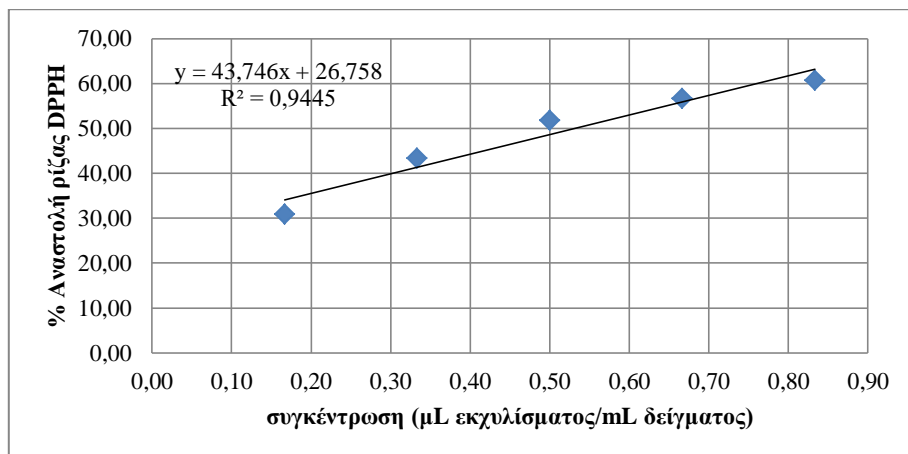




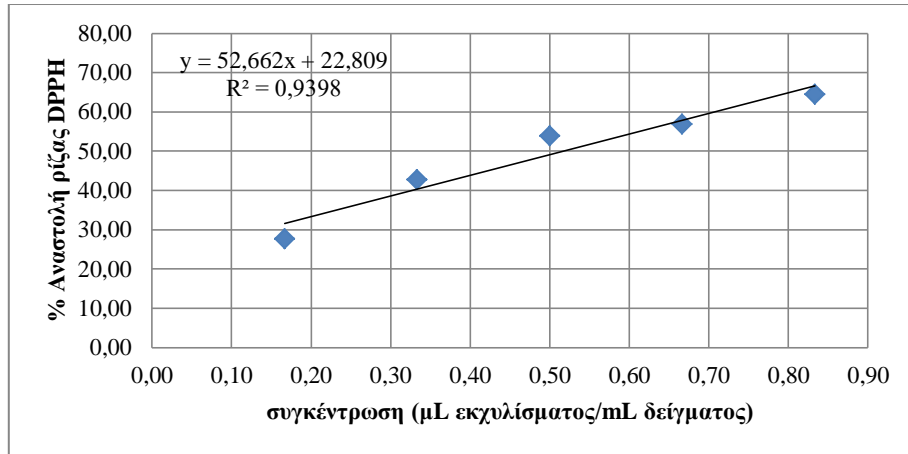
Διάγραμμα 24: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



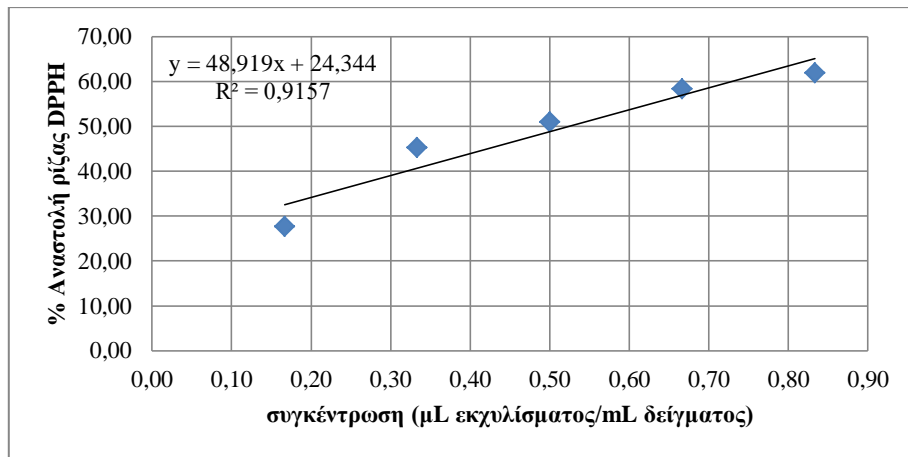
Διάγραμμα 25: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



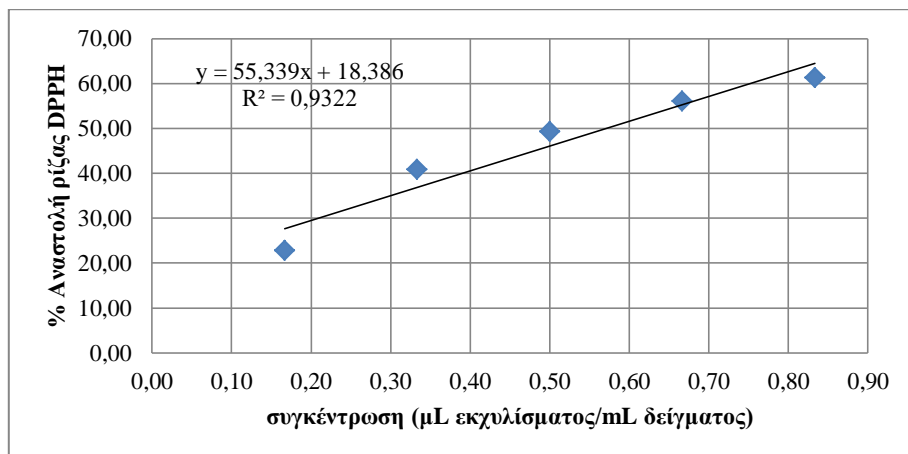
Διάγραμμα 26: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



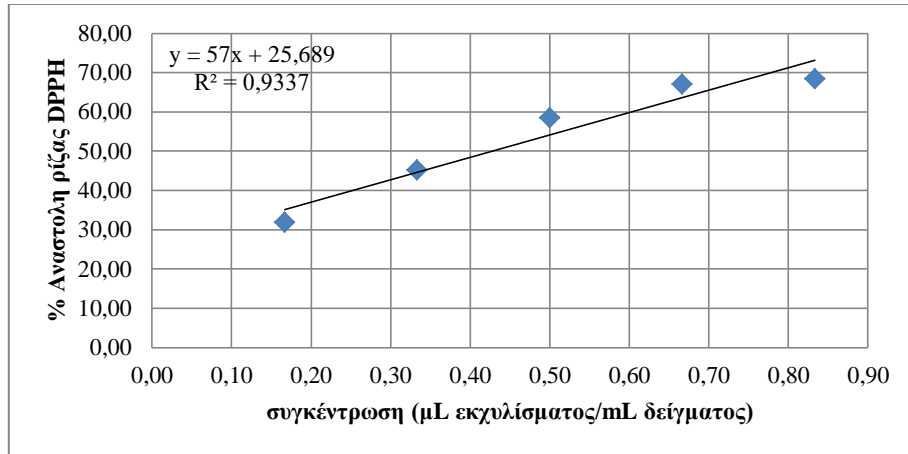
Διάγραμμα 27: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό(1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



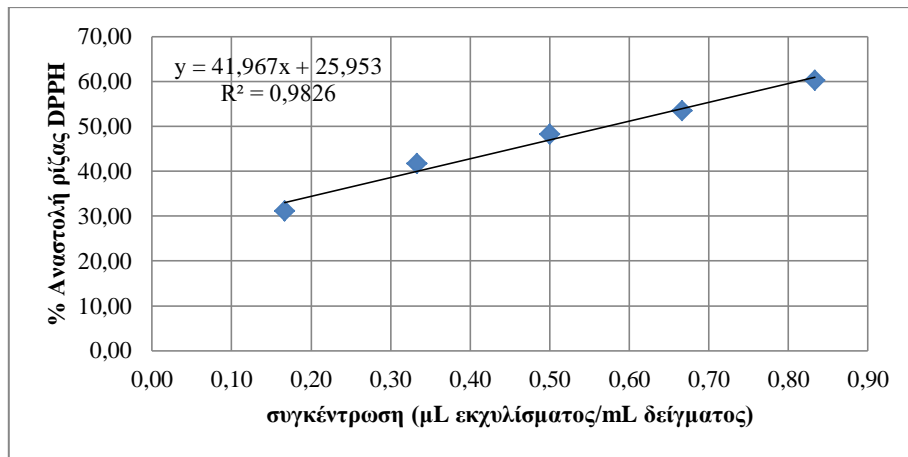
Διάγραμμα 28: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



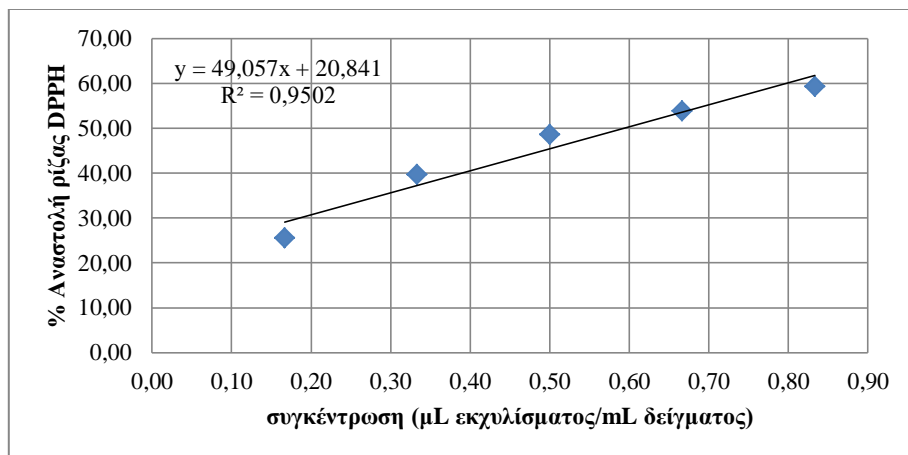
Διάγραμμα 29: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



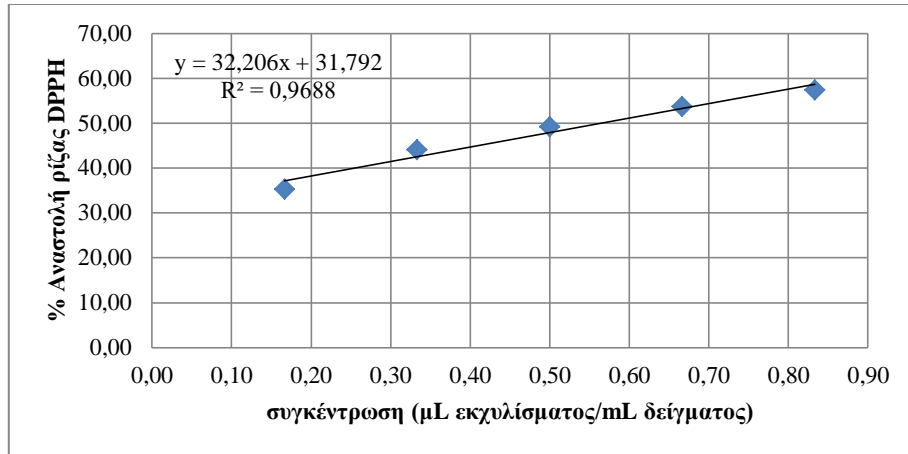
Διάγραμμα 30: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5), με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



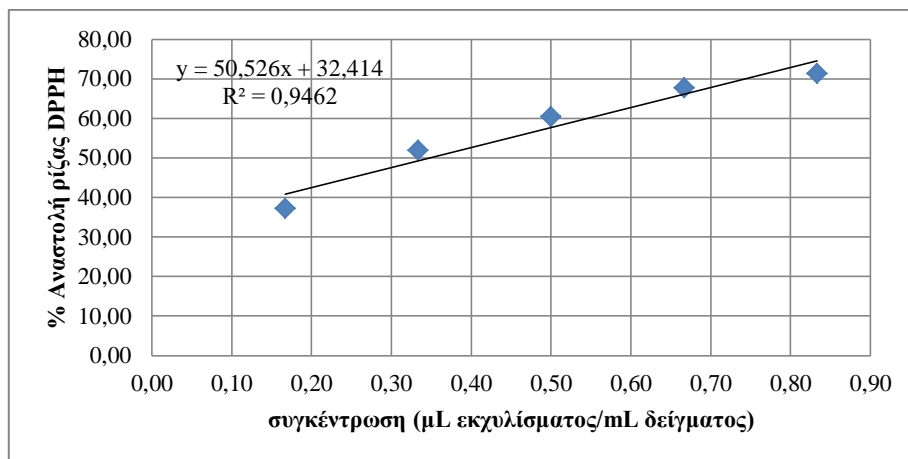
Διάγραμμα 31: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και χρόνο εκχύλισης 1 h



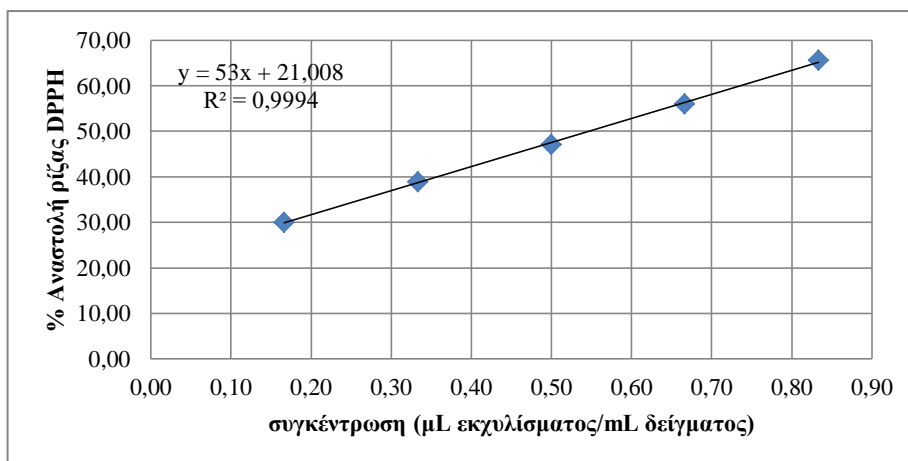
Διάγραμμα 32: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5) και χρόνο εκχύλισης 2 h



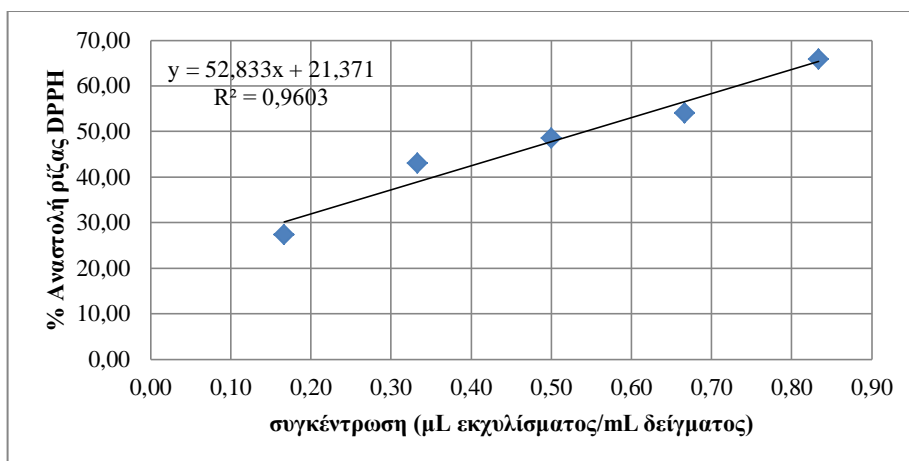
Διάγραμμα 33: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό(1:1:5) και χρόνο εκχύλισης 3 h



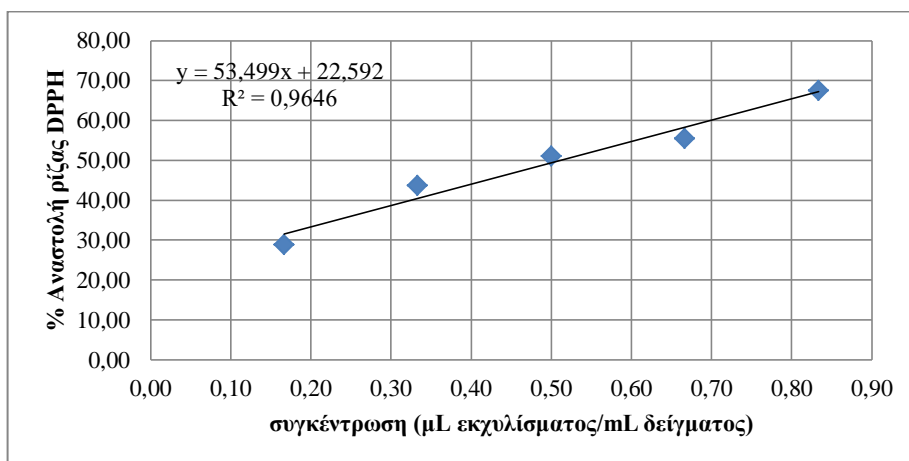
Διάγραμμα 34: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό(1:1:5) και χρόνο εκχύλισης 4 h



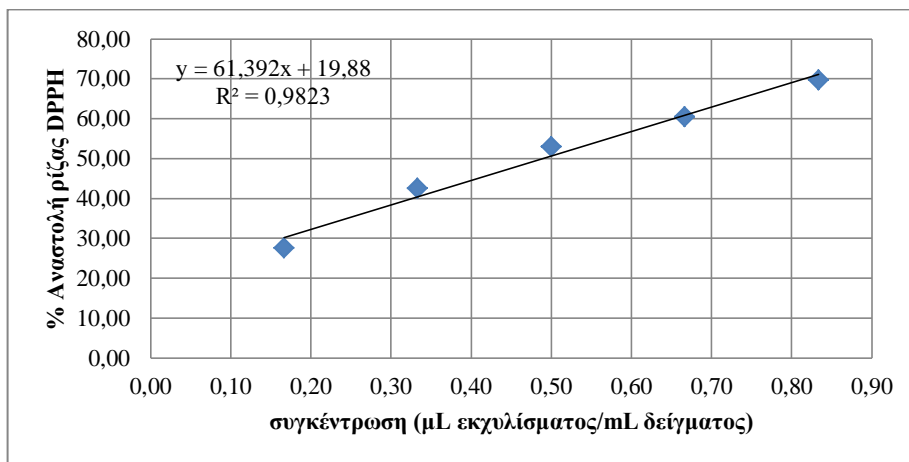
Διάγραμμα 35: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



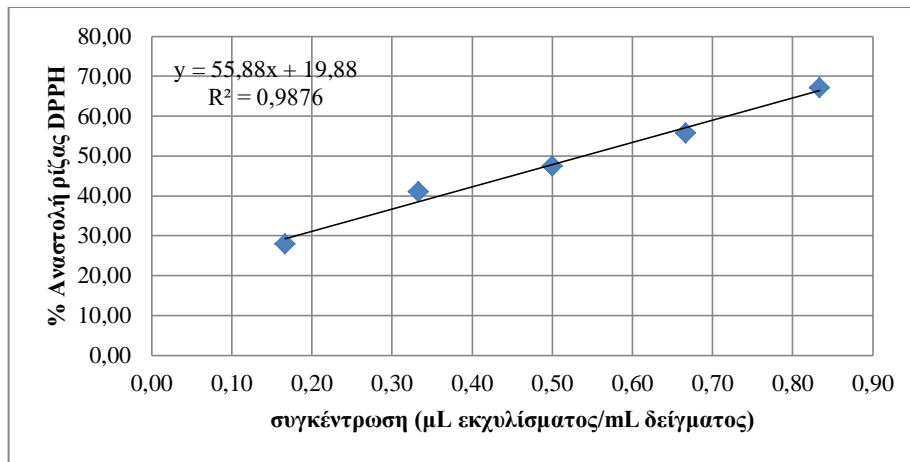
Διάγραμμα 36: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



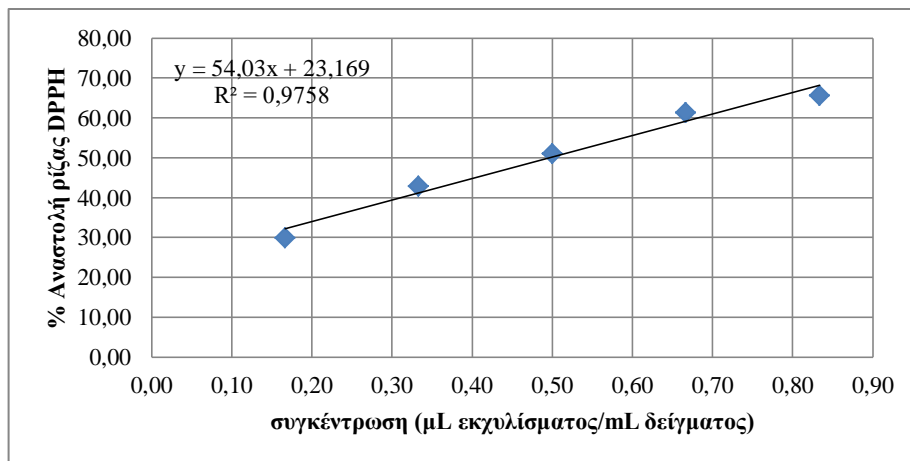
Διάγραμμα 37: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



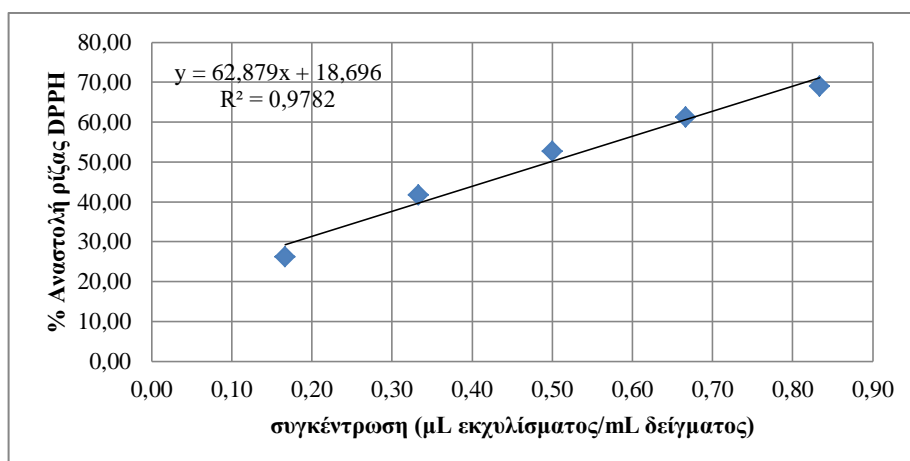
Διάγραμμα 38: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



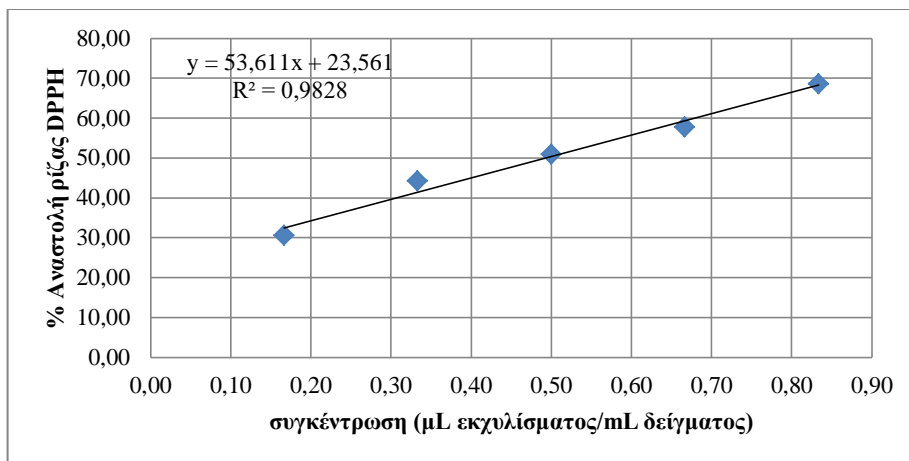
Διάγραμμα 39: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



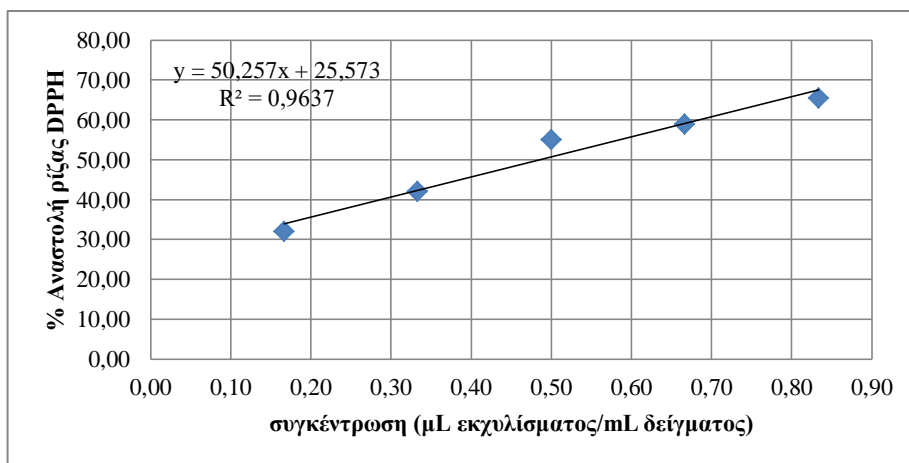
Διάγραμμα 40: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



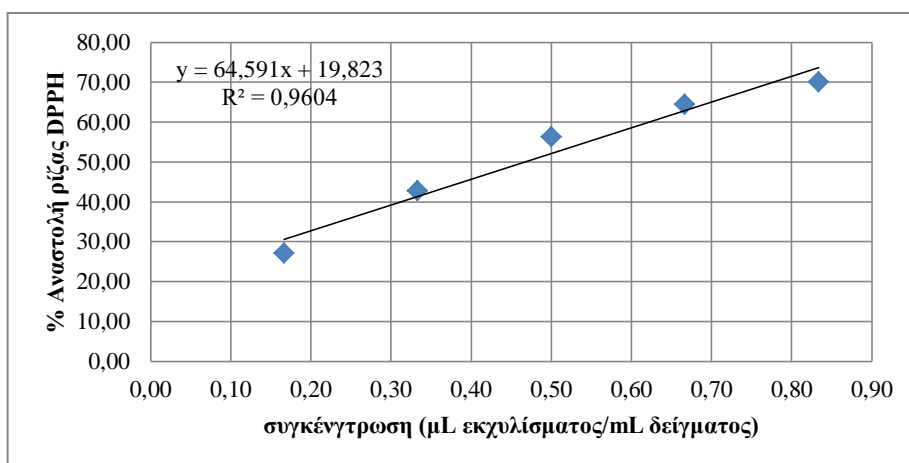
Διάγραμμα 41: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



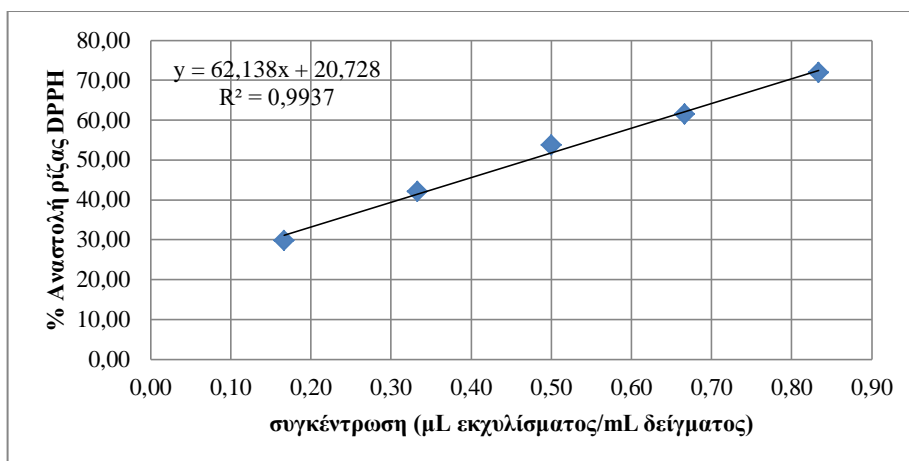
Διάγραμμα 42: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



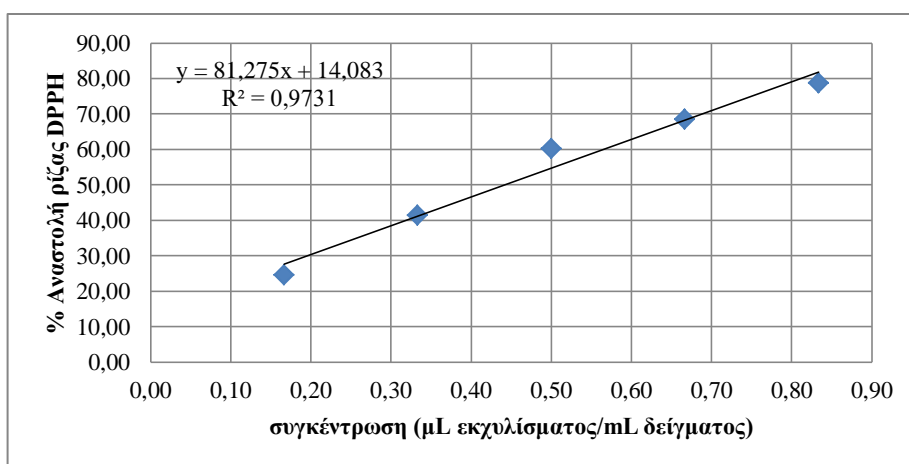
Διάγραμμα 43: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



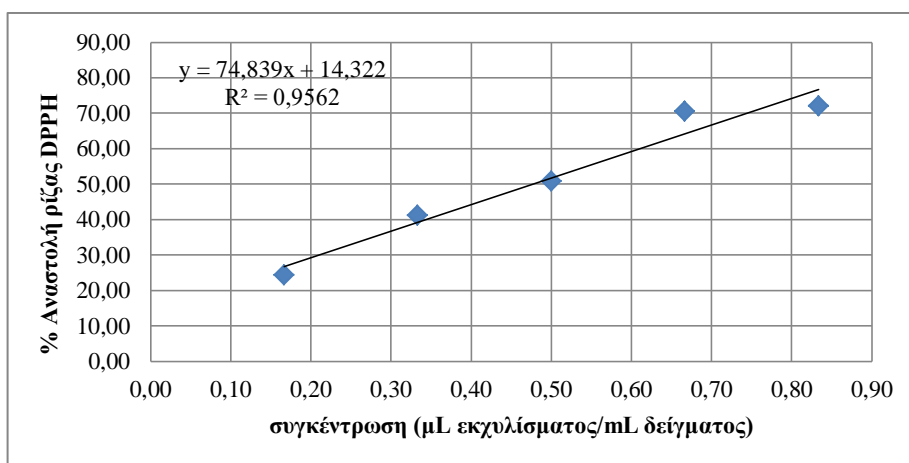
Διάγραμμα 44: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



Διάγραμμα 45: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h

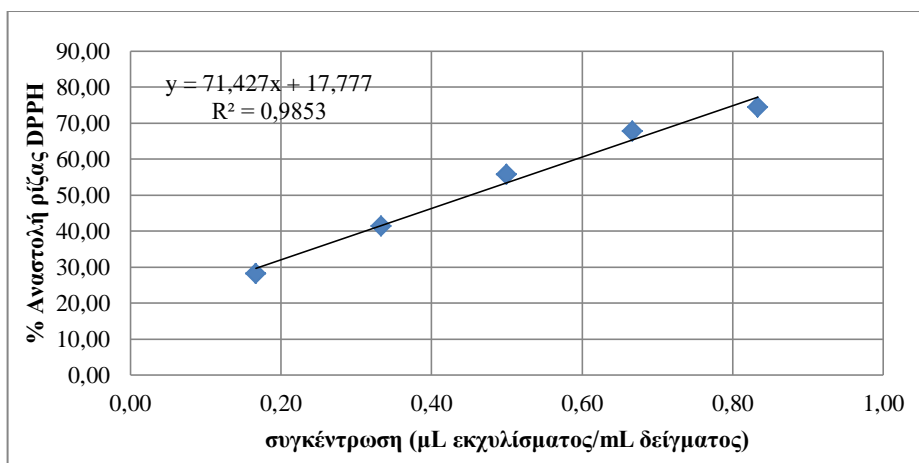


Διάγραμμα 46: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h

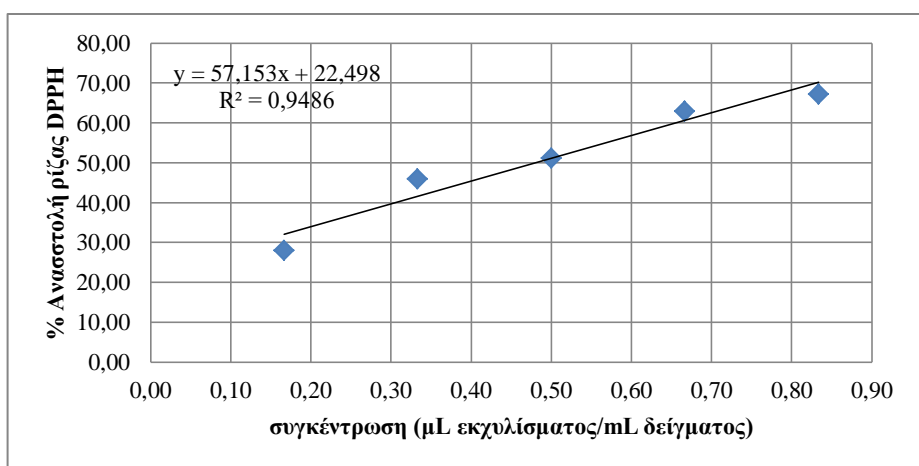


Διάγραμμα 47: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h

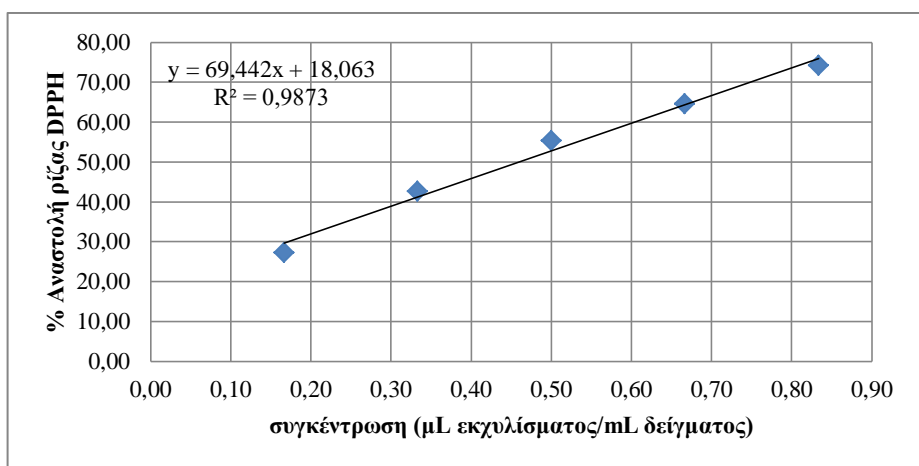




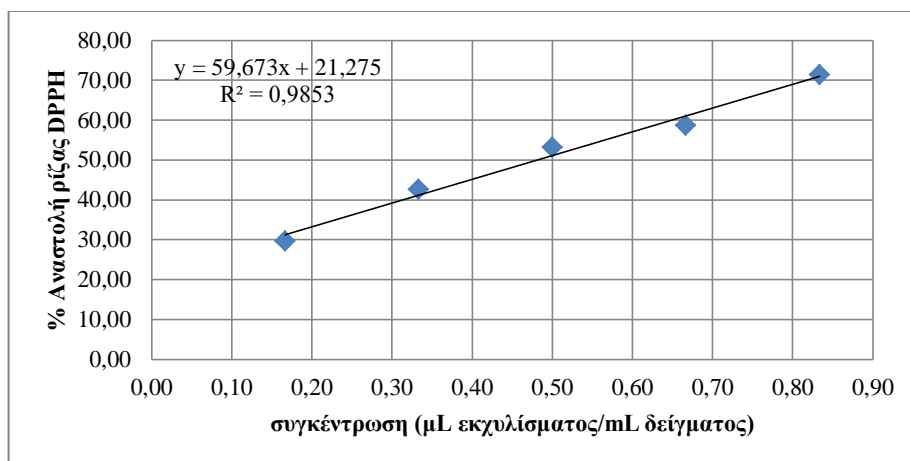
Διάγραμμα 48: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



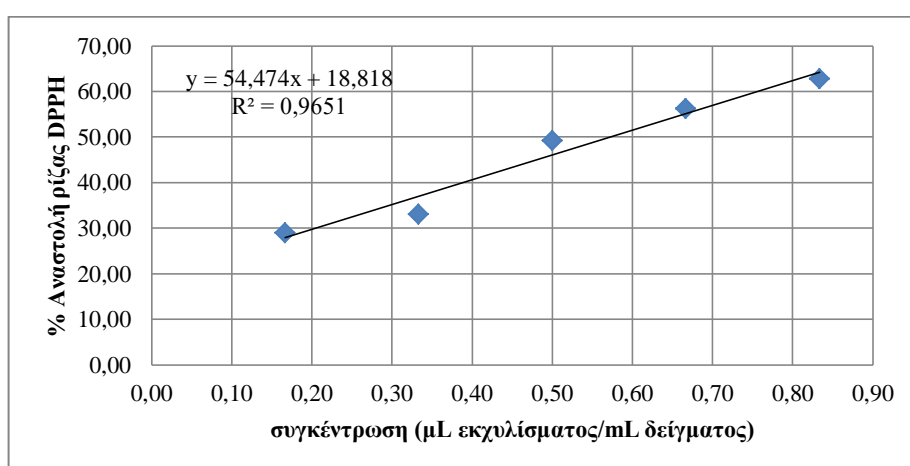
Διάγραμμα 49: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



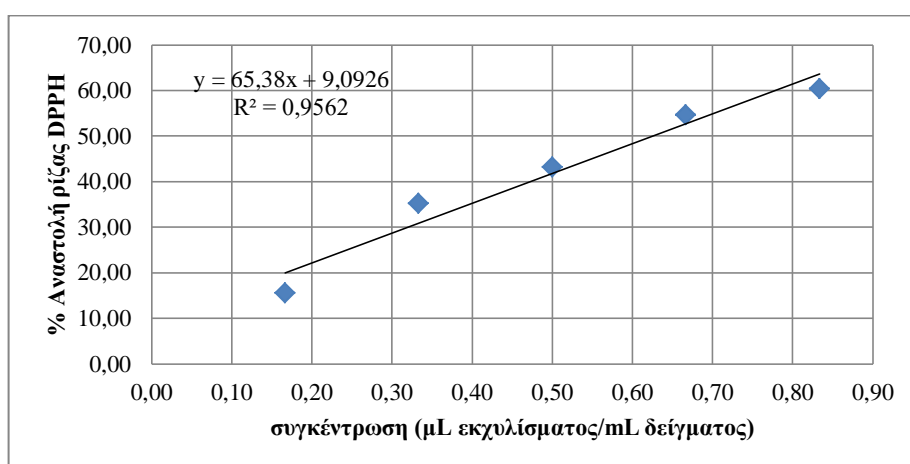
Διάγραμμα 50: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



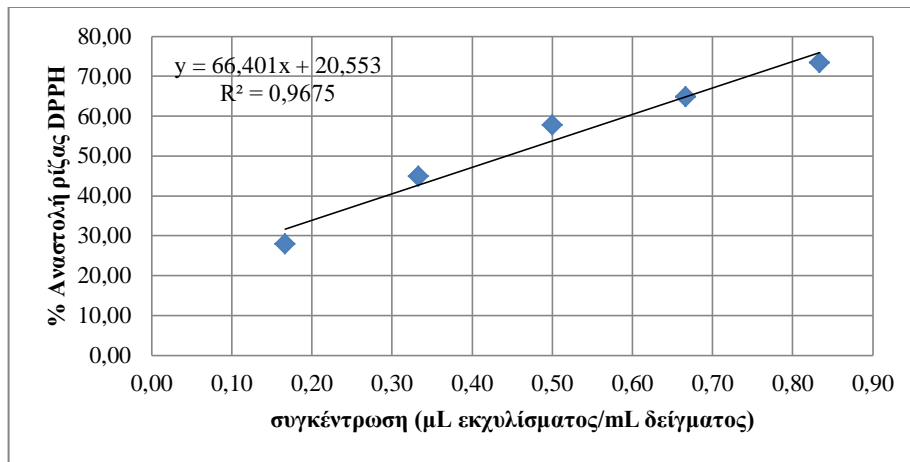
Διάγραμμα 51: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 1 h



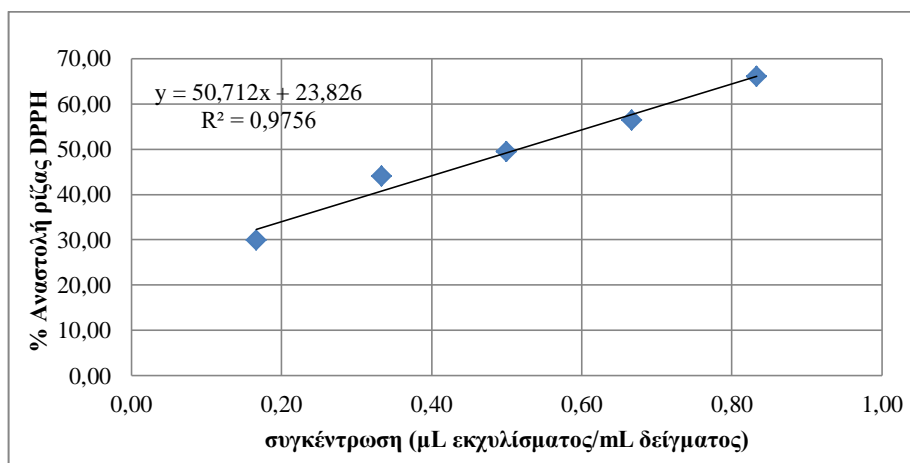
Διάγραμμα 52: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 2 h



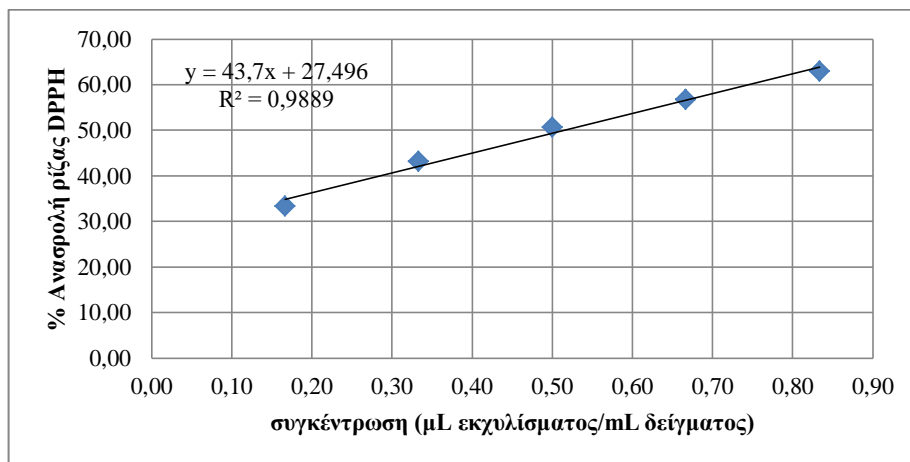
Διάγραμμα 53: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 3 h



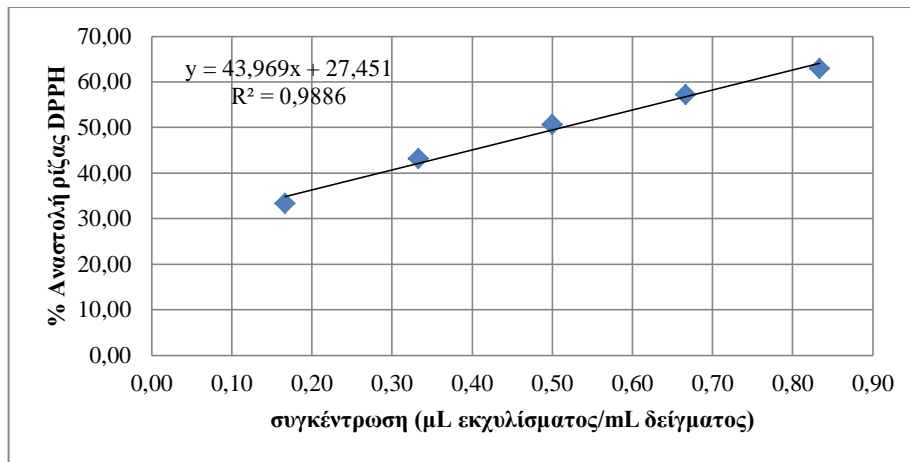
Διάγραμμα 54: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES προπυλήνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 4 h



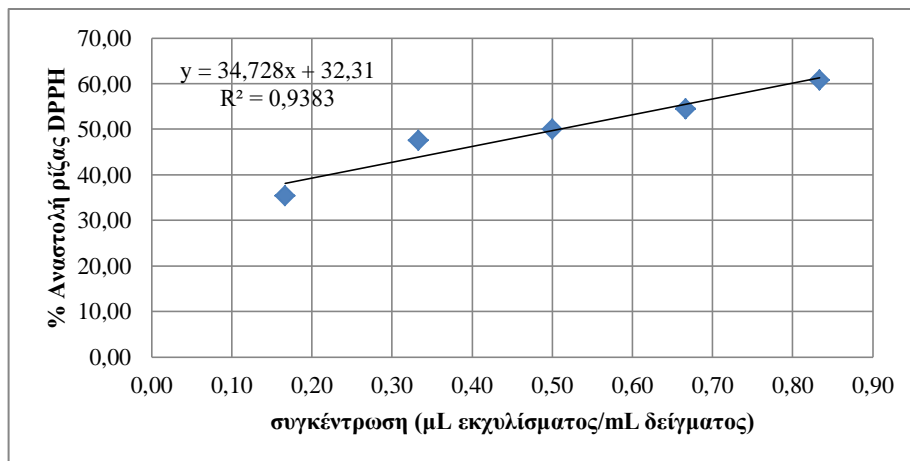
Διάγραμμα 55: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



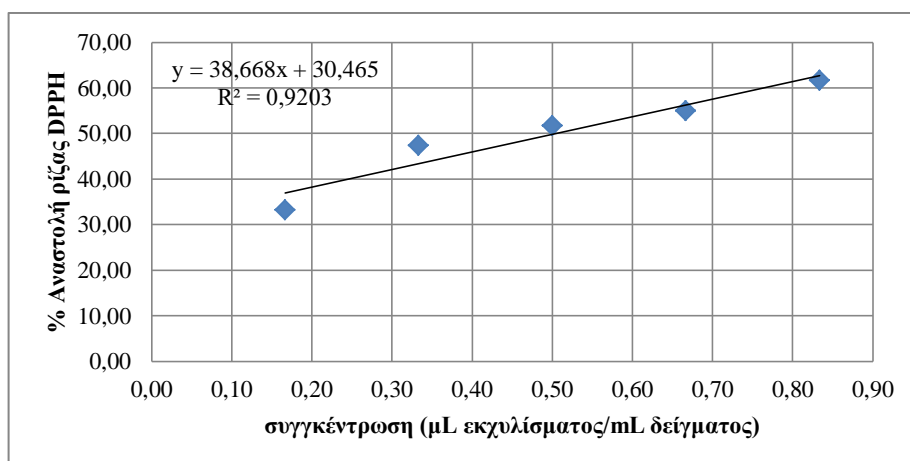
Διάγραμμα 56: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



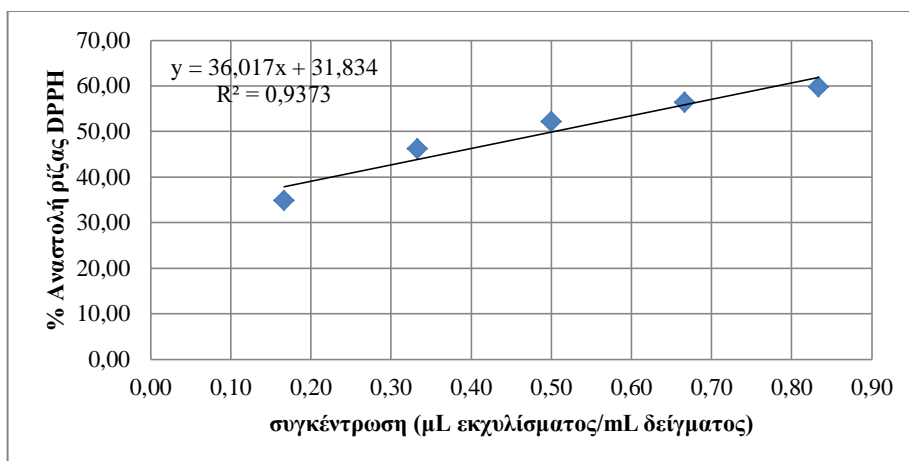
Διάγραμμα 57: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



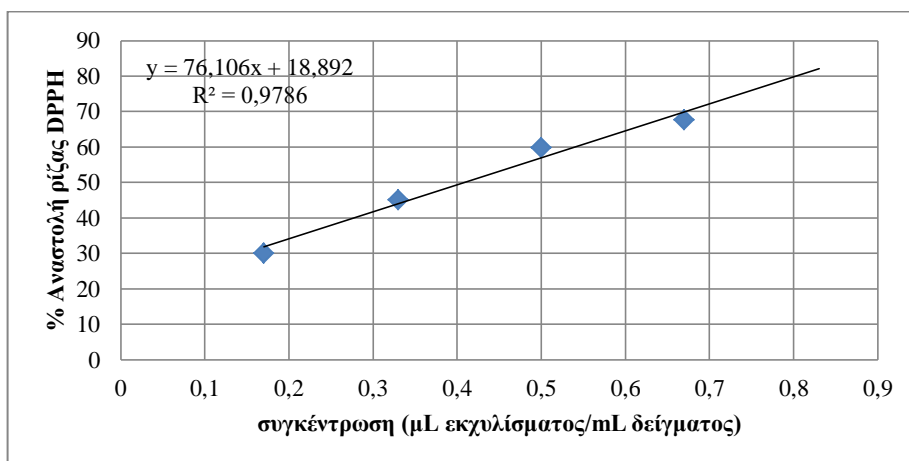
Διάγραμμα 58: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



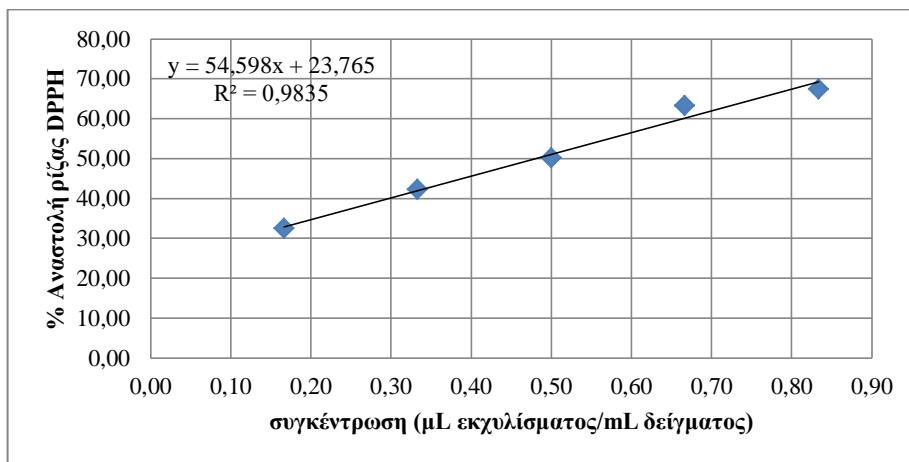
Διάγραμμα 59: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5% v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



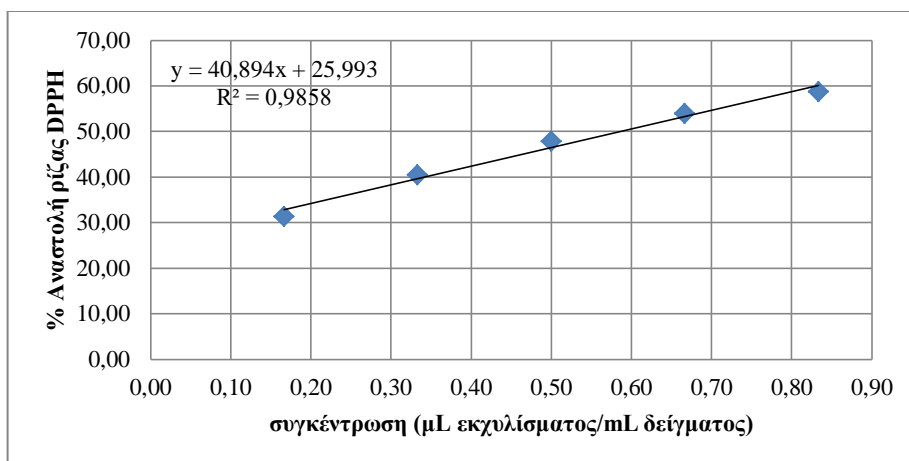
Διάγραμμα 60: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



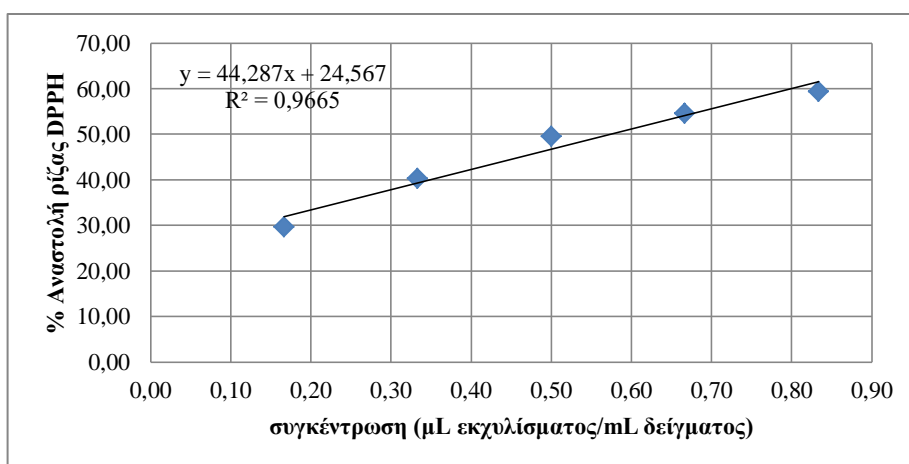
Διάγραμμα 61: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



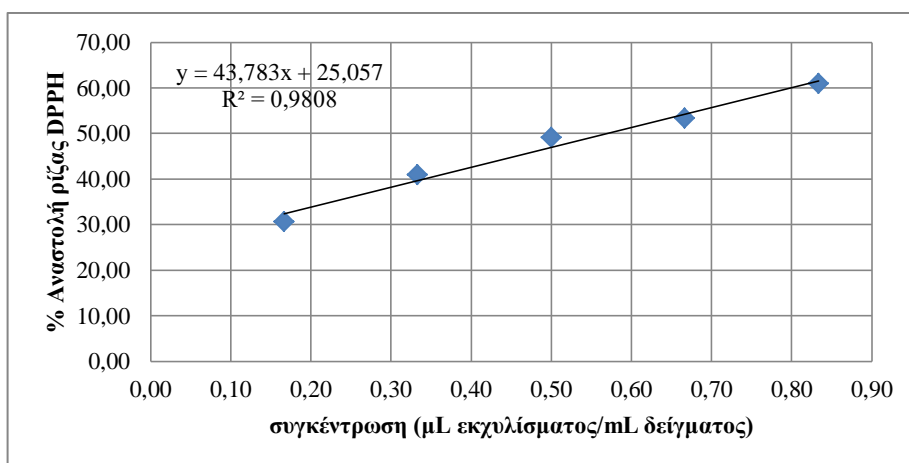
Διάγραμμα 62: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,5 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



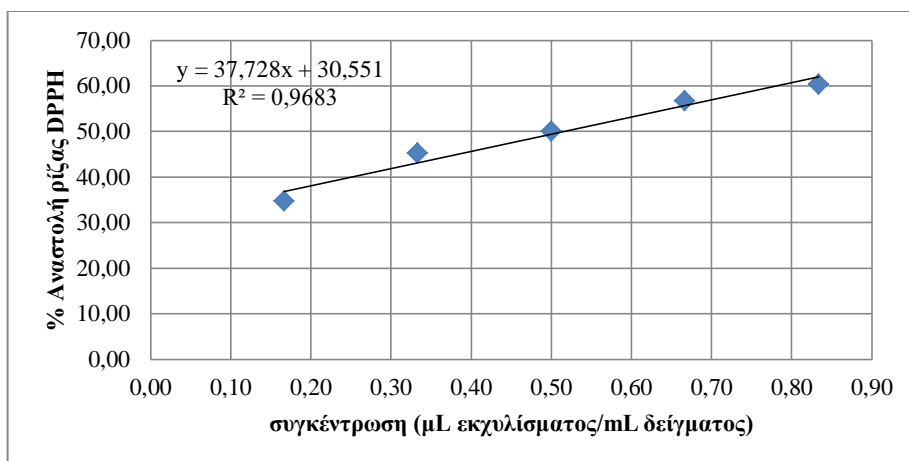
Διάγραμμα 63: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



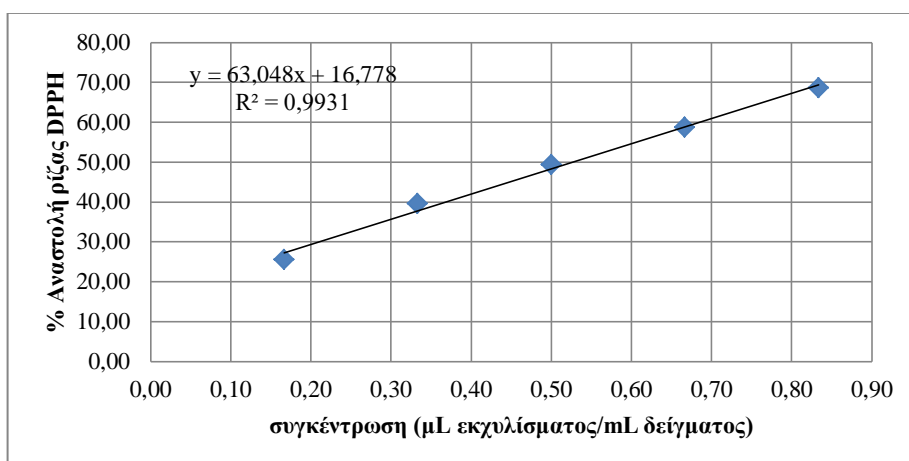
Διάγραμμα 64: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



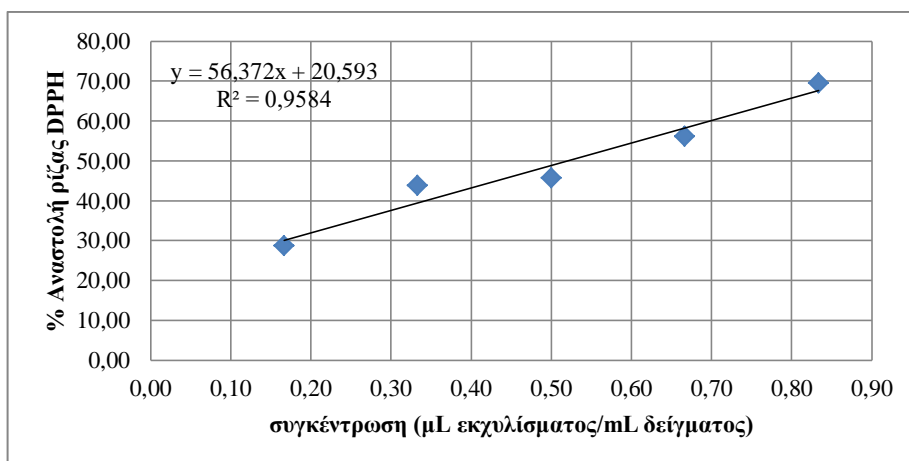
Διάγραμμα 65: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h



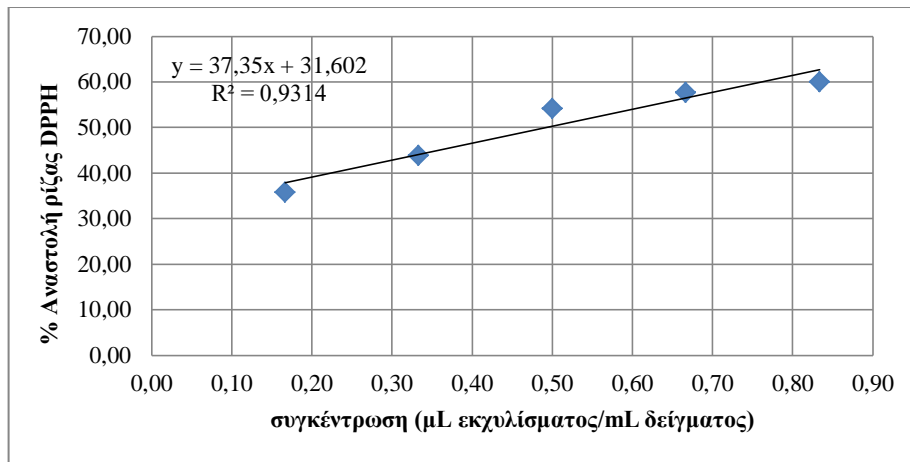
Διάγραμμα 66: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 0,75 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h



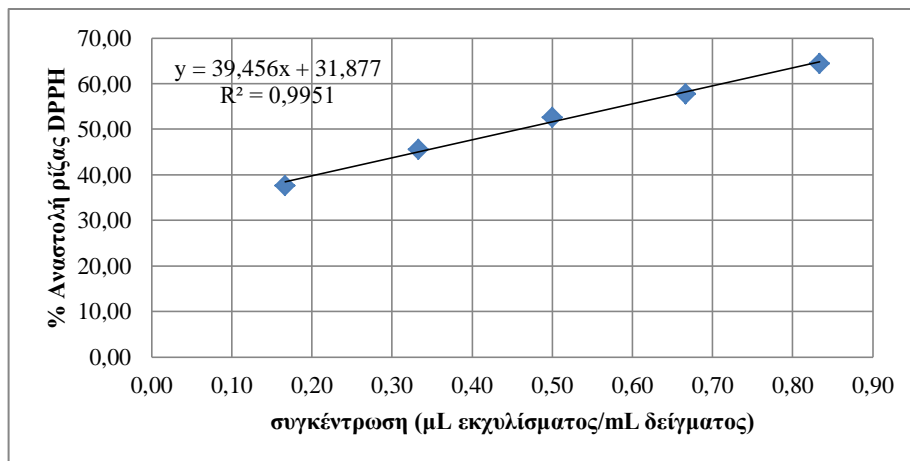
Διάγραμμα 67: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 1 h



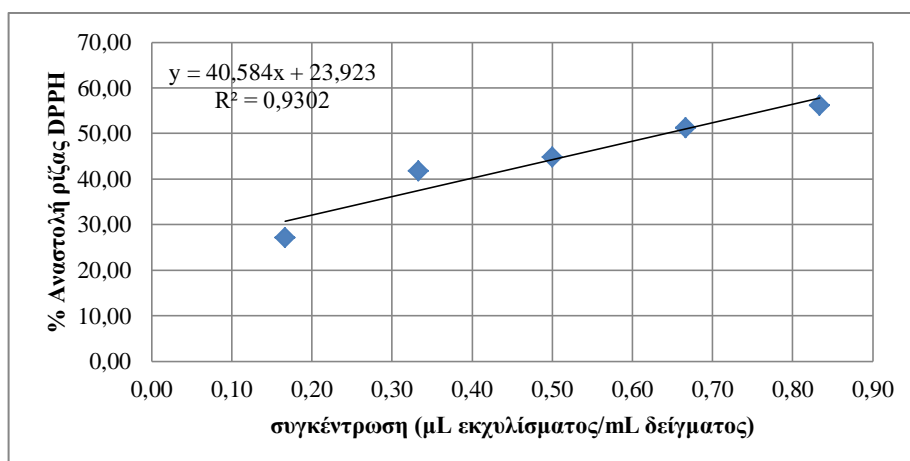
Διάγραμμα 68: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 2 h



Διάγραμμα 69: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 3 h

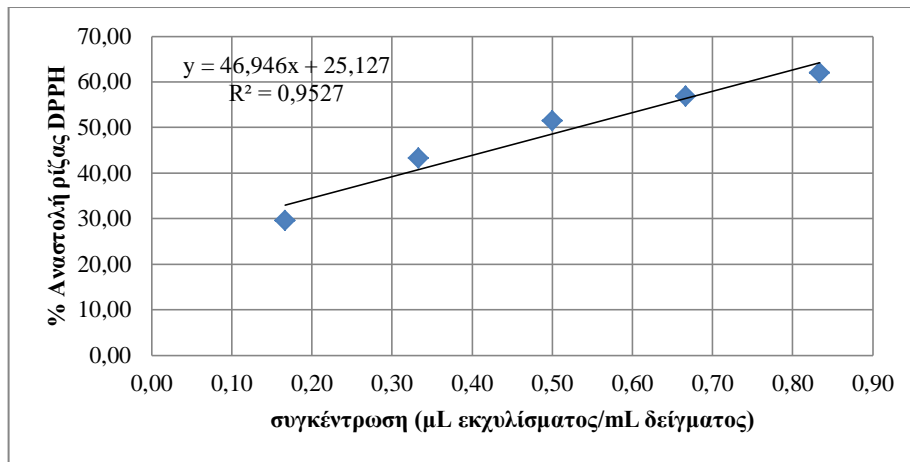


Διάγραμμα 70: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος που προέκυψε από την EYE σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό, με ενζυμικό φορτίο 1 % v/v και χρόνο εκχύλισης 4 h

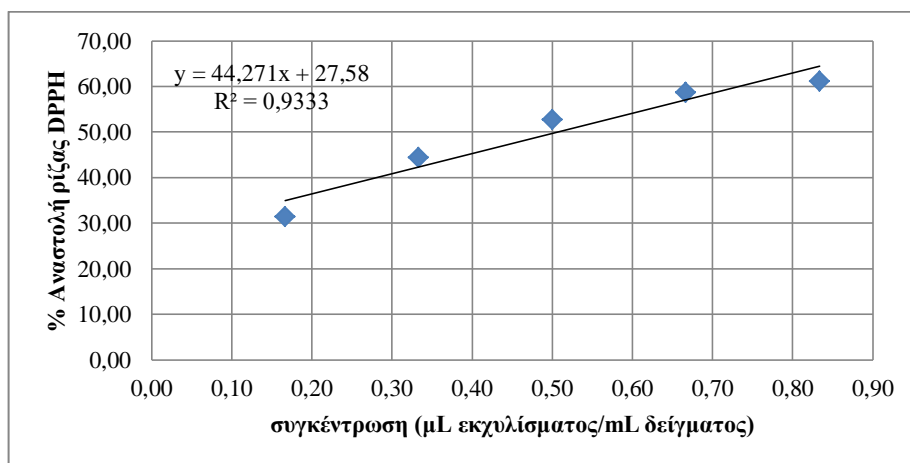


Διάγραμμα 71: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 1 h

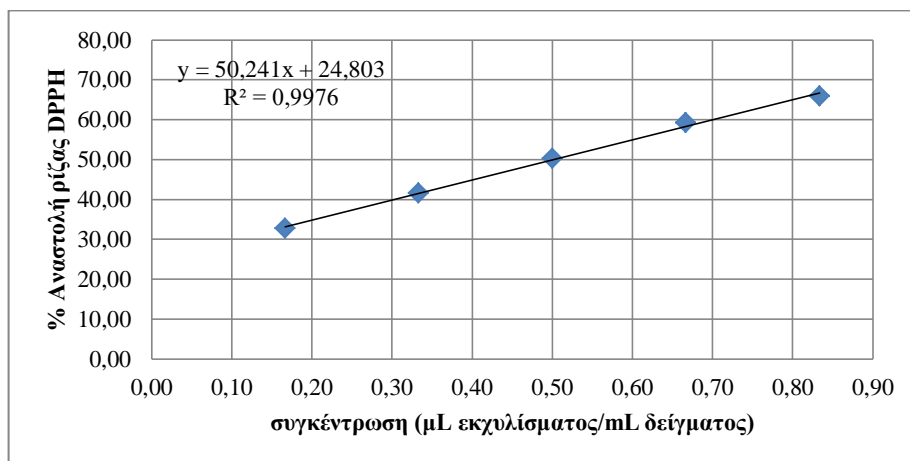




Διάγραμμα 72: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 2 h



Διάγραμμα 73: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 3 h



Διάγραμμα 74: Ποσοστιαία αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος με NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό και χρόνο εκχύλισης 4 h

Στους παρακάτω Πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test για τον κάθε χαρακτηρισμό (TPC, TFC και IC<sub>50</sub>) των εκχυλισμάτων και με τους τρεις NaDES.

Πίνακας 1: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Effect	Univariate Tests of Significance for TPC (extraction Neutrased Fr Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	278001.8	1	278001.8	25876.91	0.000000
time	1519.1	3	506.4	47.13	0.000008
enzyme load	629.4	3	209.8	19.53	0.000280
Error	96.7	9	10.7		

Πίνακας 2: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)-Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Cell No.	time	Duncan test; variable TPC (extraction Neutrased Fr Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 10.743, df = 9.0000			
		{1}	{2}	{3}	{4}
		117.52	128.14	140.26	141.33
1	1		0.001474	0.000093	0.000071
2	2	0.001474		0.000703	0.000461
3	3	0.000093	0.000703		0.655991
4	4	0.000071	0.000461	0.655991	

Πίνακας 3: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)-Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Cell No.	enzyme load	Duncan test; variable TPC (extraction Neutrased Fr Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 10.743, df = 9.0000			
		{1}	{2}	{3}	{4}
		122.10	131.48	134.34	139.33
1	0.1,0		0.003065	0.000725	0.000124
2	0.5,0	0.003065		0.247686	0.009987
3	0.75,0	0.000725	0.247686		0.059883
4	1.00,0	0.000124	0.009987	0.059883	

Πίνακας 4: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Effect	Univariate Tests of Significance for TFC (extraction Neutrased Fr Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	30234.68	1	30234.68	13615.41	0.000000
time	202.85	3	67.62	30.45	0.000048
enzyme load	174.68	3	58.23	26.22	0.000088
Error	19.99	9	2.22		

Πίνακας 5: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)-Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable TFC (extraction Neutrase Fr Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.2206, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1	39.022	0.098834	0.000164	0.000100
2	2	0.098834	40.963	0.000702	0.000306
3	3	0.000164	0.000702	46.477	0.394671
4	4	0.000100	0.000306	0.394671	47.419

Πίνακας 6: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)-Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable TFC (extraction Neutrase Fr Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.2206, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
1	0.1,0	40.667	0.553189	0.000168	0.002351
2	0.5,0	0.553189	40.018	0.000113	0.001239
3	0.75,0	0.000168	0.000113	48.069	0.021176
4	1.00,0	0.002351	0.001239	0.021176	45.128

Πίνακας 7: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES φρουκτόζη:γλυκερόλη:νερό (1:1:5)

Univariate Tests of Significance for IC50 (extraction Neutrase Fr Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3.676806	1	3.676806	800.1513	0.000000
time	0.027819	3	0.009273	2.0180	0.181971
enzyme load	0.007319	3	0.002440	0.5309	0.672318
Error	0.041356	9	0.004595		

Πίνακας 8: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Univariate Tests of Significance for TPC (Extraction Neutrase Proline Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	140444.5	1	140444.5	23029.64	0.000000
time	514.4	3	171.5	28.12	0.000067
enzyme load	1677.7	3	559.2	91.70	0.000000
Error	54.9	9	6.1		

Πίνακας 9: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό - Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable TPC (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6.0984, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
		85.472	91.366	99.191	98.730
1	1		0.008348	0.000104	0.000127
2	2	0.008348		0.002026	0.002402
3	3	0.000104	0.002026		0.798093
4	4	0.000127	0.002402	0.798093	

Πίνακας 10: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαινολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό - Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable TPC (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6.0984, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
		76.078	97.610	100.82	100.25
1	0.1,0		0.000210	0.000070	0.000092
2	0.5,0	0.000210		0.112362	0.165091
3	0.75,0	0.000070	0.112362		0.751394
4	1.00,0	0.000092	0.165091	0.751394	

Πίνακας 11: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη με 20% συν-διαλύτη νερό

Univariate Tests of Significance for TFC (Extraction Neutrase Proline Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	33264.61	1	33264.61	5860.883	0.000000
time	304.62	3	101.54	17.890	0.000392
enzyme load	154.13	3	51.38	9.052	0.004421
Error	51.08	9	5.68		

Πίνακας 12: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό - Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable TFC (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5.6757, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
		38.373	45.967	48.600	49.445
1	1		0.001618	0.000322	0.000217
2	2	0.001618		0.152667	0.079480
3	3	0.000322	0.152667		0.628065
4	4	0.000217	0.079480	0.628065	

Πίνακας 13: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό -Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable TFC (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5.6757, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
		40.812	44.927	48.724	47.922
1	0.1,0		0.037345	0.001734	0.002909
2	0.5,0	0.037345		0.059205	0.109275
3	0.75,0	0.001734	0.059205		0.645487
4	1.00,0	0.002909	0.109275	0.645487	

Πίνακας 14: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό

Univariate Tests of Significance for IC <sub>50</sub> (Extraction Neutrase Proline Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3.865328	1	3.865328	19390.54	0.000000
time	0.003335	3	0.001112	5.58	0.019334
enzyme load	0.009485	3	0.003162	15.86	0.000616
Error	0.001794	9	0.000199		

Πίνακας 15: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό -Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable IC <sub>50</sub> (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00020, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
		.51220	.49018	.49223	.47143
1	1		0.063884	0.076727	0.004063
2	2	0.063884		0.841863	0.093135
3	3	0.076727	0.841863		0.077100
4	4	0.004063	0.093135	0.077100	

Πίνακας 16: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES προλίνη:γλυκερόλη (1:2) με 20% συν-διαλύτη νερό -Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable IC <sub>50</sub> (Extraction Neutrase Proline Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00020, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
		.52296	.50751	.46862	.46697
1	0.1,0		0.156299	0.000602	0.000563
2	0.5,0	0.156299		0.003810	0.003664
3	0.75,0	0.000602	0.003810		0.872361
4	1.00,0	0.000563	0.003664	0.872361	

Πίνακας 17: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φαιολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Univariate Tests of Significance for TPC (extraction Neutrased_Bet/Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	184234.6	1	184234.6	11390.51	0.000000
time	78.6	3	26.2	1.62	0.252295
enzyme load	1672.0	3	557.3	34.46	0.000029
Error	145.6	9	16.2		

Πίνακας 18: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαιολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό-Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable TPC (extraction Bet Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16.174, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
		97.990	99.890	123.92	107.42
1	0.1,0		0.520973	0.000079	0.011178
2	0.5,0	0.520973		0.000106	0.026691
3	0.75,0	0.000079	0.000106		0.000432
4	1.00,0	0.011178	0.026691	0.000432	

Πίνακας 19: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA εκχυλισθέντων φλαβονοειδών (TFC) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Univariate Tests of Significance for TFC (extraction Neutrased_Bet / Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	59546.83	1	59546.83	6046.881	0.000000
time	306.19	3	102.06	10.364	0.002811
enzyme load	82.40	3	27.47	2.789	0.101702
Error	88.63	9	9.85		

Πίνακας 20: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test εκχυλισθέντων φαιολικών ενώσεων (TPC) σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό-Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable TFC (extraction Neutrased_Bet/Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 9.8475, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
		54.678	60.599	61.758	66.987
1	1		0.025853	0.013595	0.000603
2	2	0.025853		0.614301	0.022135
3	3	0.013595	0.614301		0.042981
4	4	0.000603	0.022135	0.042981	

Πίνακας 21: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό

Effect	Univariate Tests of Significance for IC50 (extraction Neutrased_Bet/Gl) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	4.295256	1	4.295256	20279.24	0.000000
time	0.004319	3	0.001440	6.80	0.010893
enzyme load	0.011019	3	0.003673	17.34	0.000441
Error	0.001906	9	0.000212		

Πίνακας 22: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό -Παράγοντας εξέτασης ο χρόνος εκχύλισης

Duncan test; variable IC50 (extraction Bet Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00021, df = 9.0000					
Cell No.	time	{1}	{2}	{3}	{4}
		.53750	.52500	.51750	.49250
1	1		0.255561	0.095765	0.002704
2	2	0.255561		0.484848	0.014297
3	3	0.095765	0.484848		0.038172
4	4	0.002704	0.014297	0.038172	

Πίνακας 23: Έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με Duncan Test για την τιμή IC<sub>50</sub> στην εκχύλιση σε NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη (1:3) με 20% συν-διαλύτη νερό -Παράγοντας εξέτασης το ενζυμικό φορτίο

Duncan test; variable IC50 (extraction Neutrased_Bet/Gl) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00021, df = 9.0000					
Cell No.	enzyme load	{1}	{2}	{3}	{4}
		.51250	.49750	.56250	.50000
1	0.1,0		0.196611	0.001051	0.255561
2	0.5,0	0.196611		0.000270	0.813647
3	0.75,0	0.001051	0.000270		0.000321
4	1.00,0	0.255561	0.813647	0.000321	