



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

«Μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης κόκκινων πιπεριών του γένους *Capsicum annuum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία MIR»



ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΣΑΡΟΓΛΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΑΜ: 19684003, 19684087

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

ΘΑΛΕΙΑ ΤΣΙΑΚΑ

Αθήνα, Ιούλιος 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF FOOD SCIENCES  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**Diploma Thesis**

**«Study of the antimicrobial and antioxidant activity of red peppers of the  
genus *Capsicum annuum* using experimental design models and MIR  
spectroscopy»**

**ANAGNOSTOPOULOU ANASTASIA, SAROGLOU VASILEIOS**

**RN: 19684003, 19684087**

**Supervisor:**

**THALIA TSIAKA**

**Athens, July 2023**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«Μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης κόκκινων πιπεριών του γένους *Capsicum annuum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού»**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή**

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

<b>A/α</b>	<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>1.</b>	Τσιάκα Θάλεια	Διδακτικό Προσωπικό ΕΣΠΑ/ Επιβλέπουσα	
<b>2.</b>	Κοντελής Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής/ Μέλος	
<b>3.</b>	Σινάνογλου Βασιλεία	Καθηγήτρια – Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Τροφίμων/ Μέλος	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Αναστασία Αναγνωστοπούλου του Χαραλάμπους και Βασίλειος Σαρόγλου του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 19684003 και 19684087 αντίστοιχα, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουν υπεύθυνα ότι:

«Είναι συγγραφείς αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαν για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκαναν χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουν ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από αυτούς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικό τους, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας».

Η Δηλούσα

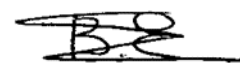
Ο Δηλών

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΣΑΡΟΓΛΟΥ



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας, στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Θάλεια Τσιάκα, τόσο για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, και τις γνώσεις που μας παρείχε κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης, όσο και για την παροχή των εργαστηρίων στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.*

*Επίσης, ευχαριστούμε θερμά τον επίκουρο καθηγητή Σπυρίδωνα Κοντελέ και τον μεταπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Γεώργιο Φίλντιση, για την πολύτιμη βοήθειά κατά την εκτέλεση των μικροβιολογικών πειραμάτων καθώς και για την μετέπειτα επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, οφείλουμε να ευχαριστήσουμε την καθηγήτρια του τμήματος και κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Τροφίμων Βασιλεία Σινάνογλου για την καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή του πειράματος της φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier καθώς και κατά την επεξεργασία των φασμάτων.*

*Ακόμη, νιώθουμε την ανάγκη να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες και τους φίλους μας, για την αγάπη, τη στήριξη, την κατανόηση και τη συμπαράστασή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.*

*Πάνω απ' όλα, είμαστε ευγνώμονες για την ευκαιρία που μας δόθηκε να ασχοληθούμε με αυτό το θέμα και να επεκτείνουμε τις γνώσεις μας. Η ολοκλήρωση της πτυχιακής μας εργασίας αποτελεί για εμάς ένα σημαντικό ορόσημο και μια προσωπική επίδειξη αφοσίωσης και επιμονής, η οποία δεν θα ήταν ποτέ εφικτή χωρίς την υποστήριξή σας.*

Αναστασία-Βασίλης

Ιούλιος 2023

ΣΤΙΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΑΣ  
ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΛΟ ΜΑΣ ΦΙΛΟ ΓΙΩΡΓΟ...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας εστιάζει στη μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων των σπόρων της κόκκινης πιπεριάς τσίλι (*Capsicum annuum*) με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού, φασματοφωτομετρικών αναλύσεων και φασματοσκοπίας υπέρυθρου, ώστε να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικοί παράγοντες. Αρχικά, έγινε αναφορά στη σπουδαιότητα των παραπροϊόντων και κυρίως σε αυτών της πιπεριάς *Capsicum*. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση στις κυριότερες μεθόδους προσδιορισμού και εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων, κυρίως φαινολικών ενώσεων, καθώς επίσης και στη χρήση των αλκοολούχων αποσταγμάτων, όπως το τσίπουρο, ως διαλύτες για την εκχύλιση των ενώσεων αυτών. Επιπλέον, παρουσιάστηκαν οι σημαντικότερες κατηγορίες αλλοιογόνων μικροοργανισμών που δημιουργούν προβλήματα στην ασφάλεια των τροφίμων. Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, με μέγιστη τιμή 0,365 mg GAE/g σπόρου. Επίσης, εξετάστηκε η δράση τους έναντι των αλλοιογόνων μικροοργανισμών *S. aureus*, *B. cereus* και *L. monocytogenes* σε συγκεκριμένες συνθήκες επώασης (π.χ. χρόνος, θερμοκρασία, pH) μέσω του ποσοστού αναστολής τους. Ειδικότερα, τα εκχυλίσματα συνέβαλαν στην ανάπτυξη του *B. cereus*, ενώ έδρασαν ανασταλτικά κατά του *S. aureus* και της *L. monocytogenes*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier για την κατηγοριοποίηση των χαρακτηριστικότερων ενώσεων των σπόρων της πιπεριάς. Σημειώνεται πως τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό λογισμικό Minitab και εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου βαθμού Box-Behnken.

**Λέξεις κλειδιά:** παραπροϊόντα τροφίμων, εκχυλίσματα πιπεριάς *Capsicum*, σπόροι πιπεριάς, αντιοξειδωτική δράση, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιμικροβιακή δράση, ποσοστό αναστολής, εδώδιμοι διαλύτες εκχύλισης



## ABSTRACT

The subject of this thesis focuses on the study of the antioxidant and antimicrobial activity of extracts from the seeds of the red chili pepper (*Capsicum annuum*) using experimental design models, spectrophotometric analyses and MIR spectroscopy, in order to introduce them as enhancer factors in the food industry. Primarily, the importance of by-products, and particularly those of the pepper *Capsicum*, was reported. Subsequently, a literature review was conducted on the main methods of determination and extraction of bioactive compounds, mainly phenolic compounds, as well as on the use of alcoholic distillates, such as tsipouro, as solvents for the extraction of these compounds. Furthermore, the most significant categories of spoilage microorganisms causing problems in food safety were. Regarding the experimental part, the total phenolic content of the extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method, with a maximum value of 0.365 mg GAE/g seed. Additionally, their activity against the pathogenic microorganisms *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes* in specific incubation conditions (e.g. time, temperature, pH) was examined through their inhibition rate. In particular, the extracts contributed to the growth of *B. cereus*, while they acted as inhibitors against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. Finally, Fourier transform infrared spectroscopy was performed to classify the most characteristic compounds of pepper seeds. It is noted that the results were processed with the statistical software Minitab and application of experimental design of the second order Box-Behnken.

**Keywords:** food by-products, *Capsicum* pepper extracts, pepper seeds, antioxidant activity, total phenolic content, antimicrobial activity, inhibition rate, edible extraction solvents.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	12
1.1. Πιπεριές <i>Capsicum annuum</i> .....	12
1.2. Βιοδραστικές ενώσεις του είδους <i>Capsicum annuum</i> .....	15
1.2.1. Βιταμίνες και μέταλλα .....	15
1.2.2. Φαινόλες και φλαβονοειδή.....	16
1.2.3. Καροτενοειδή .....	17
1.2.4. Καψαϊκίνοειδή.....	19
1.2.5. Λιπίδια: λιπαρά οξέα και στερόλες .....	20
1.2.6. Υδατάνθρακες: ελεύθερα σάκχαρα και πολυσακχαρίτες.....	21
1.2.7. Άλλα φυτοχημικά που προσδιορίζονται σε καρπούς, σπόρους και φύλλα πιπεριών.....	21
1.2.8. Συγκεντρωτικός πίνακας βιοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχονται στους σπόρους της κόκκινης πιπεριάς <i>Capsicum annuum</i> .....	23
1.3. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων.....	24
1.3.1. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων.....	25
1.3.2. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας .....	26
1.3.3. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία .....	30
1.4. Παραπροϊόντα τροφίμων: Γενικά στοιχεία .....	31
1.5. Παραπροϊόντα πιπεριάς ( <i>Capsicum annuum</i> ) .....	33
1.6. Μέθοδοι εκχύλισης.....	36
1.6.1. Συμβατικές μέθοδοι (Conventional methods).....	36
1.6.2. Μη-συμβατικές μέθοδοι (Non-conventional methods).....	38
1.6.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων εκχύλισης .....	41
1.6.4. Μέθοδοι εκχύλισης σπόρων πιπεριάς ( <i>Capsicum annuum</i> L.) .....	42
1.7. Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού (Design Of Experiments).....	44
1.8. Αλκοολούχα ποτά ως διαλύτες/εκχυλιστικά μέσα .....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	48
2.1. Υγεία και τρόφιμο .....	48
2.2. Κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών στα τρόφιμα.....	48
2.2.1 Βακτήρια .....	48
2.2.2 Ζύμες - Μύκητες.....	50
2.2.3 Ιοί.....	52
2.3. Προβλήματα αλλοίωσης τροφίμων και τρόποι αντιμετώπισης .....	53
2.3.1 Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή.....	55
2.4. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης των πιπεριών τσίλι ( <i>Capsicum annuum</i> ) .....	57
2.5. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των πιπεριών τσίλι ( <i>Capsicum annuum</i> ) .....	59

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	63
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b> .....	65
<b>3.1. Προετοιμασία δείγματος</b> .....	65
<b>3.2. Πειραματική πορεία</b> .....	66
3.2.1. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου – Μέθοδος <i>Folin Ciocalteu</i> .....	66
3.2.2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης – Μέτρηση με <i>Bioscreen</i> .....	68
3.2.3. Φασματοσκοπία μετασχηματισμού <i>Fourier (FTIR)</i> .....	69
<b>3.3. Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken</b> .....	70
<b>3.4. Στατιστική ανάλυση δεδομένων</b> .....	71
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b> .....	73
<b>4.1. Βελτιστοποίηση εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού</b> .....	73
<b>4.2. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς τσίλι ενάντια σε επιλεγμένους μικροοργανισμούς</b> .....	81
4.2.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	81
4.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	85
4.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	91
<b>4.3. Βιβλιογραφική σύγκριση επίδρασης πειραματικών συνθηκών εκχύλισης στο φαινολικό περιεχόμενο και στον προσδιορισμό αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων της πιπεριάς <i>Capsicum</i></b> .....	99
<b>4.4. Φασματοσκοπία μετασχηματισμού <i>Fourier (FTIR)</i></b> .....	101
<b>4.5. Συμπεράσματα</b> .....	107
<b>4.6. Μελλοντικοί στόχοι</b> .....	110
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	111

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1 Παγκόσμια παραγωγή λαχανικών για το 2020 (Cvetkovic, Ranilovic and Jokic 2022).....	13
Εικόνα 1.2 Ποικιλομορφία είδους <i>Capsicum</i> (Hernandez-Perez et al.2020) .....	14
Εικόνα 1.3 Υποκατηγορίες φλαβονοειδών (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019).....	16
Εικόνα 1.4 Φαινολικές ενώσεις στις πιπεριές <i>Capsicum</i> (Hernandez-Perez et al. 2020).....	17
Εικόνα 1.5 Χημικές δομές των καροτενοειδών που έχουν βρεθεί στις κόκκινες πιπεριές <i>Capsicum annuum</i> L. (Perez-Galvez et al 2003).....	18
Εικόνα 1.6 Χημική δομή καψαϊκινουειδών (Dekebo 2020) .....	19
Εικόνα 1.7 Χημικές δομές της βετουλίνης (α) και του βετουλινικού οξέος (b) (Hordyjewska et al. 2019) .....	21
Εικόνα 1.8 Μέρη Πιπεριάς (Diane 2018) .....	33
Εικόνα 1.9 Παραγωγή σάλτσας (breakfast sauce) από παραπροϊόντα πιπεριάς ( <i>Capsicum annuum</i> L.) (Bostanci, Ok, and Yilmaz 2019) .....	34
Εικόνα 1.10 Εφαρμογές εκχυλισμάτων πιπεριάς ( <i>Capsicum annuum</i> L.) στη βιομηχανία τροφίμων (Anaya-Esparza et al. 2021) .....	35
Εικόνα 1.11 Μέθοδοι εκχύλισης (Pai, Hebbar, and Selvaraj 2022).....	36
Εικόνα 1.12 Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet (Lopez-Bascon and Luque de Castro 2020).....	36
Εικόνα 1.13 Μέθοδος της διαβροχής (Ayoub, Malik, and Mehta 2020).....	37
Εικόνα 1.14 Μέθοδος βρασμού (Rasul 2018) .....	37
Εικόνα 1.15 Εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα (Chemat et al, 2017) .....	38
Εικόνα 1.16 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Alvarez-Rivera et al. 2020).....	39
Εικόνα 1.17 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Sridhar et al. 2021) .....	39
Εικόνα 1.18 Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Liu et al. 2019) .....	40
Εικόνα 1.19 Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (Chiew Wei et al. 2005) .....	41
Εικόνα 3.1 Πειραματική πορεία προσδιορισμού φαινολικού περιεχομένου .....	66
Εικόνα 3.2 Αντίδραση φαινολικών ενώσεων και αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (a), παρατηρούμενες χρωματικές αλλαγές (b) (Munteanu and Apetrei 2021) .....	67
Εικόνα 3.3 Πειραματική πορεία προσδιορισμού αντιμικροβιακής δράσης .....	68

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.1 Ταυτοποιημένα αμινοξέα σε σάρκα και σπόρους κόκκινων πιπεριών <i>Capsicum</i> (E 2022) .....	22
Πίνακας 1.2 Συγκεντρωτικός πίνακας εμπειριεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων στους σπόρους της κόκκινης πιπεριάς <i>Capsicum annuum</i> (Carvalho Lemos, Reimer and Wormit 2019, Silva et al. 2013, Dekebo 2020) .....	23
Πίνακας 1.3 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων.....	25
Πίνακας 1.4 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων (I) σε διάφορα τμήματα της πιπεριάς .....	26
Πίνακας 1.5 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων στα διάφορα τμήματα της πιπεριάς (II) .....	28
Πίνακας 1.6 Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων στα διάφορα τμήματα της πιπεριάς .....	30
Πίνακας 1.7 Μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων σπόρων πιπεριάς <i>Capsicum annuum</i> L. (Geow et al. 2021, Rasul 2018, Ligor et al. 2018, Panja 2018, Sridhar et al. 2021) .....	43
Πίνακας 1.8 Παραδείγματα εφαρμογής μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού σε παραπροϊόντα τροφίμων.....	45

Πίνακας 2.1 Κυριότερα γένη βακτηρίων που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016) .....	49
Πίνακας 2.2 Κυριότερα γένη ζυμών-μυκήτων που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016) .....	51
Πίνακας 2.3 Κυριότεροι τύποι ιών που συμμετέχουν στην παθογένεια των τροφίμων (Lorenzo et al. 2018) .....	52
Πίνακας 2.4 Κυριότερες μέθοδοι συντήρησης τροφίμων (Zhao et al. 2022, Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016, Petruzzi et al. 2017) .....	54
Πίνακας 2.5 Βακτήρια που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).....	56
Πίνακας 2.6 Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης πιπεριών <i>Capsicum</i> .....	58
Πίνακας 2.7 Μέθοδοι μέτρησης αντιμικροβιακής δράσης πιπεριών <i>Capsicum</i> .....	60
Πίνακας 3.1 Πειραματικές συνθήκες διεξαγωγής εκχυλίσεων .....	65
Πίνακας 3.2 Επίπεδα τιμών των τριών διαφορετικών παραγόντων του πειράματος .....	70
Πίνακας 4.1 Πειραματικά δεδομένα για σχεδιασμό Box-Behnken και φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων .....	73
Πίνακας 4.2 Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο.....	75
Πίνακας 4.3 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικού περιεχομένου .....	80
Πίνακας 4.4 Ποσοστά αναστολής μικροοργανισμών στα εκχυλίσματα πιπεριάς <i>Capsicum</i> .....	81
Πίνακας 4.5 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στον <i>B. cereus</i> .....	83
Πίνακας 4.6 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στον <i>S. aureus</i> .....	86
Πίνακας 4.7 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής ενάντια στον <i>S. aureus</i> .....	90
Πίνακας 4.8 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στην <i>L. monocytogenes</i> .....	92
Πίνακας 4.9 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής ενάντια στην <i>L. monocytogenes</i> .....	97
Πίνακας 4.10 Ταινίες απορροφήσεων χαρακτηριστικών ομάδων των σπόρων της πιπεριάς.....	104
Πίνακας 4.11 Σχετικές % εντάσεις των ταινιών απορρόφησης των φασμάτων ATR-FTIR των εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς .....	105

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ

Εξίσωση 4.1 Εξίσωση υπολογισμού TPC με βάση το μοντέλο Box-Behnken .....	74
Εξίσωση 4.2 Εξίσωση ποσοστού αναστολής ενάντια στον <i>B. cereus</i> με βάση το μοντέλο Box-Behnken .....	82
Εξίσωση 4.3 Εξίσωση υπολογισμού του ποσοστού αναστολής ενάντια στον <i>S. aureus</i> με βάση το μοντέλο Box-Behnken .....	85
Εξίσωση 4.4 Εξίσωση υπολογισμού του ποσοστού αναστολής ενάντια στην <i>L. monocytogenes</i> με βάση το μοντέλο Box-Behnken.....	92

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Ραβδόγραμμα 4.1 Ραβδόγραμμα Pareto για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου .....	75
Ραβδόγραμμα 4.2 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής κατά του <i>B. cereus</i> .....	83
Ραβδόγραμμα 4.3 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια του <i>S. aureus</i> .....	86
Ραβδόγραμμα 4.4 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια της <i>L. monocytogenes</i> .....	93

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 4.1 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου .....	76
Διάγραμμα 4.2 Συνδυαστική επίδραση παραμέτρων στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου .....	77
Διάγραμμα 4.3 Διάγραμμα Contour Plot (χρόνος εκχύλισης και pH) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	78
Διάγραμμα 4.4 Διάγραμμα Contour Plot (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου .....	78
Διάγραμμα 4.5 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι του <i>S. aureus</i>	87
Διάγραμμα 4.6 Συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι του <i>S. aureus</i> .....	88
Διάγραμμα 4.7 Διάγραμμα Contour Plot (αναλογία σπόρων/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής του <i>S. aureus</i> .....	89
Διάγραμμα 4.8 Διάγραμμα Contour Plot (χρόνος εκχύλισης και pH) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής του <i>S. aureus</i> .....	89
Διάγραμμα 4.9 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι της <i>L. monocytogenes</i> .....	94
Διάγραμμα 4.10 Συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι της <i>L. monocytogenes</i> .....	95
Διάγραμμα 4.11 Διάγραμμα Contour Plot (χρόνος εκχύλισης και pH) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της <i>L. monocytogenes</i> .....	96
Διάγραμμα 4.12 Διάγραμμα Contour Plot (αναλογία σπόρων/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της <i>L. monocytogenes</i> .....	96
Διάγραμμα 4.13 Συνδυαστικό φάσμα ATR-FTIR όλων των επιλεγόμενων δειγμάτων .....	102
Διάγραμμα 4.14 Μεγέθυνση αριστερής περιοχής συνολικού φάσματος ATR-FTIR όλων των επιλεγμένων δειγμάτων.....	103
Διάγραμμα 4.15 Μεγέθυνση δεξιάς περιοχής συνολικού φάσματος ATR-FTIR όλων των επιλεγμένων δειγμάτων.....	103

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.1. Πιπεριές *Capsicum annuum*

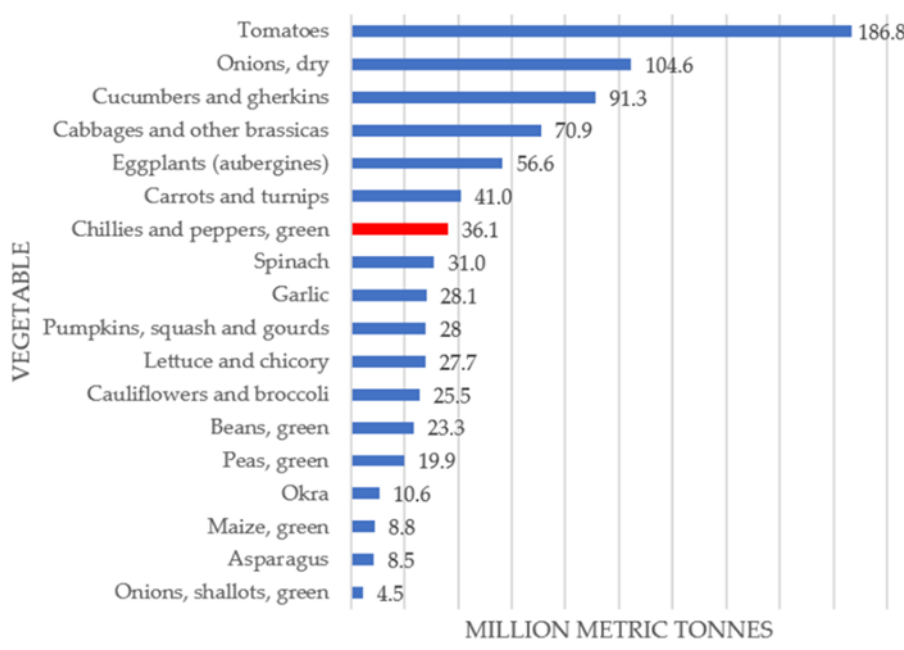
Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν διαχρονικά βασικό μέρος του απαραίτητου διαιτολογίου του ανθρώπου, καθώς επιδρούν ευεργετικά στην υγεία του καταναλωτή. Επομένως, μπορεί να μην αποτελούν τρόφιμα που προσφέρουν τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και την ευημερία του ανθρώπινου οργανισμού αλλά θεωρούνται προστατευτικά για την υγεία, χάρη στο πλήθος βιοδραστικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών συστατικών που βρίσκονται σε αυτά (Αικατερίνη Ταλέλλη 2008). Για το λόγο αυτό, έχουν κερδίσει τεράστια τεχνολογική προσοχή σε τομείς όπως η γεωργία, η επεξεργασία και η ανάπτυξη νέων τροφίμων (Mohammad Salamatullah et al. 2022).

Από βοτανολογική άποψη, η οποία βασίζεται στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του φυτού, ως φρούτο ορίζεται το σαρκώδες εκείνο μέρος του φυτού που φέρει τους σπόρους του, δηλαδή η ωριμασμένη ωοθήκη ενός ανθοφόρου φυτού, και ως λαχανικό το εδώδιμο μέρος του φυτού που δεν περιλαμβάνει τις ωοθήκες (π.χ. ρίζες, φύλλα, κ.α.). Ωστόσο, σύμφωνα με το σύστημα της γαστρονομικής ταξινόμησης, τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να διακριθούν έχοντας ως βασικό κριτήριο τον τρόπο χρησιμοποίησής τους. Έτσι, λοιπόν, μαγειρικά ένα λαχανικό έχει συνήθως σκληρή υφή, πιο ήπια γεύση και καταναλώνεται με το κυρίως φαγητό, ενώ ένα φρούτο είναι μαλακό στην υφή, έχει γλυκιά γεύση και καταναλώνεται ωμό ως επιδόρπιο (Αικατερίνη Ταλέλλη 2008; 'Is a Pepper a Fruit or a Vegetable and Why?' n.d.). Οι διαφορετικές ταξινομήσεις οφείλουν να υπάρχουν καθώς εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, η βοτανολογική ταξινόμηση αποσκοπεί στην ανακάλυψη της προέλευσης και στην αναγνώριση των ποικιλιών φρούτων και λαχανικών, ενώ η γαστρονομική αφορά τον χειρισμό τους ως τρόφιμα με διαφορετικές μαγειρικές ιδιότητες και υφές ('Is a Pepper a Fruit or a Vegetable and Why?' n.d.).

Οι πιπεριές του γένους *Capsicum* είναι από τα παλαιότερα και δημοφιλέστερα καλλιεργούμενα φυτά στον κόσμο λόγω του χρώματος, της γεύσης και της θρεπτικής τους αξίας (Gurnani et al. 2016; Mohammad Salamatullah et al. 2022). Το όνομά τους προέρχεται από τη λατινική λέξη «capsa» που σημαίνει κουτί λόγω του σχήματός του καρπού τους που περικλείει τους σπόρους όπως ακριβώς ένα κουτί. Το γένος *Capsicum* περιλαμβάνει μια σειρά από 32 είδη πικάντικων (τσίλι) και μη πιπεριών, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια *Solanaceae* και προέρχονται από την Κεντρική και Νότια Αμερική, με σπουδαιότερα τα

*Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. και *Capsicum pubescens*.

Συγκεκριμένα, το *Capsicum annuum* (πιπεριά τσίλι) είναι το πιο κοινό και το πιο οικονομικά και εμπορικά σημαντικό είδος του γένους *Capsicum* (Idrees et al. 2020, 9; Hernández-Pérez et al. 2020). Γενικότερα, σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), η παραγωγή της τσίλι πιπεριάς αποτελεί μια σημαντική παγκόσμια δραστηριότητα με αυξητική τάση τα τελευταία χρόνια λόγω της αυξανόμενης ζήτησης της σε διάφορες κουζίνες για την προσθήκη αρώματος και πικάντικης γεύσης στα φαγητά. Μάλιστα, με βάση την ετήσια παγκόσμια παραγωγή του 2020, οι πιπεριές συγκαταλέχθηκαν στα 10 κορυφαία λαχανικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.1 (Cvetković, Ranilović, and Jokić 2022).



Εικόνα 1.1 Παγκόσμια παραγωγή λαχανικών για το 2020 (Cvetkovic, Ranilovic and Jokić 2022)

Το εν λόγω μονοετές ή διετές ποώδες φυτό καλλιεργείται παγκοσμίως κυρίως σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα, αλλά και σε εύκρατα κλίματα εντός θερμοκηπίων, με κορυφαίους παραγωγούς την Κίνα, το Μεξικό, την Ινδονησία, την Τουρκία, την Ισπανία και τις ΗΠΑ (Anaya-Esparza et al. 2021; Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019; Cvetković, Ranilović, and Jokić 2022). Επιπλέον, περιλαμβάνει τις περισσότερες ποικιλίες του είδους (περίπου 50.000), παρουσιάζοντας μεγάλη βιοποικιλότητα και μεταβλητότητα στη χημική του σύνθεση (Εικόνα 1.2). Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την αξιοποίηση της πιπεριάς για την παραγωγή



διαφόρων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μερικά από τα οποία πρόκειται να αναφερθούν αναλυτικά στη συνέχεια (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019; Hernández-Pérez et al. 2020).

Ακολουθώντας την βοτανική ταξινόμηση, οι πιπεριές τσίλι είναι φρούτα σε σχήμα καμπάνας με παχύ τοίχωμα διαφορετικών μεγεθών και χρωμάτων ανάλογα με τον γονότυπο ή την εποχιακή περίοδο αναπαραγωγής. Ειδικότερα, η ποικιλία των χρωμάτων σχετίζεται με τη παρουσία διαφόρων χρωστικών. Για παράδειγμα, η χλωροφύλλη ευθύνεται για το πράσινο χρώμα των



(1)

Εικόνα 1.2 Ποικιλομορφία είδους *Capsicum* (Hernandez-Perez et al. 2020)

πιπεριών, οι ανθοκυανίνες για το μωβ/βιολετί το α- και β-καροτένιο, η ζεαξανθίνη, η λουτεΐνη και η κρυπτοξανθίνη για το κίτρινο-πορτοκαλί, ενώ η καψανθίνη, η καψορουβίνη και τα 5,6-εποξειδία της καψανθίνης για το κόκκινο χρώμα (Hernández-Pérez et al. 2020; Mohammad Salamatullah et al. 2022). Παρόλα αυτά, η πιπεριά τσίλι καλλιεργείται και καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο ως φρέσκο ή μαγειρεμένο λαχανικό κατά την γαστρονομική ταξινόμηση (λόγω της χρήσης της και σε αλμυρά πιάτα), αποξηραμένη ως μπαχαρικό ή ως χρωστικό μέσο ('Is a Pepper a Fruit or a Vegetable and Why?' n.d.; Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019). Εκτός από την ιδιαίτερη πικάντικη τους γεύση, οι πιπεριές συνιστούν σημαντικές πηγές διαιτητικών ινών, μετάλλων (κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο, ασβέστιο και φώσφορο), καθώς και πολλών βιοδραστικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων (βιταμινών, καροτενοειδών, φαινολικών). Επίσης, χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νερού και υδατανθράκων, και χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών και λιπαρών, γεγονός που τις καθιστά τροφή με λίγες θερμίδες. Συνεπώς, η συχνή κατανάλωση τους προσφέρει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Παραδείγματος χάριν, η κατανάλωση 100 g φρέσκιας πιπεριάς παρέχει τη συνολική συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ασκορβικού οξέος. Ακόμη, επιστημονικά στοιχεία αποδεικνύουν την διατροφική ισχύ της πιπεριάς ως αντιφλεγμονώδες, αντιδιαβητικό, αντιμικροβιακό, αντιοξειδωτικό και ανοσοτροποποιητικό παράγοντα (Anaya-Esparza et al. 2021). Για αυτόν το λόγο, οι πιπεριές *Capsicum* χρησιμοποιούνται ευρέως και για ιατρικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματά τους έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση από μυϊκούς πόνους και αρθρίτιδα (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019).

## 1.2. Βιοδραστικές ενώσεις του είδους *Capsicum annuum*

Οι πιπεριές, όπως και όλα τα φρούτα και τα λαχανικά, αποτελούν κύρια πηγή φυτοχημικών και δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή, φυτικών βιοδραστικών ενώσεων (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019). Αναλυτικότερα, ως βιοδραστικές ενώσεις ορίζονται «τα εγγενή μη θρεπτικά συστατικά φυτικών τροφίμων με αναμενόμενες προαγωγικές/ευεργετικές και/ή τοξικές επιδράσεις στην υγεία». Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από το μέρος του καρπού (βρώσιμο τμήμα, σπόροι, φλούδα) από το οποίο λαμβάνονται, τον γονότυπο, την ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και από τις συνθήκες ανάπτυξης, χειρισμού και αποθήκευσης του τροφίμου μετά τη συγκομιδή (Anaya-Esparza et al. 2021). Μάλιστα, ο προσδιορισμός τους στο στάδιο ωρίμανσης κρίνεται απαραίτητος μιας και έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση, το χρώμα, το άρωμα και την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκάστοτε καρπού (Hernández-Pérez et al. 2020).

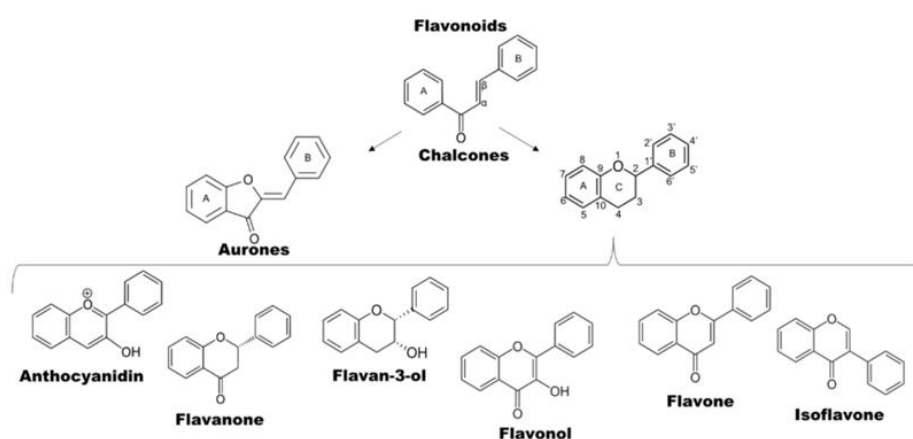
### 1.2.1. Βιταμίνες και μέταλλα

Η πιπεριά τσίλι είναι πλούσια σε προβιταμίνη Α, βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και Ε (α-τοκοφερόλη). Ειδικότερα, η προβιταμίνη Α σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα και της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, ενώ οι βιταμίνες C και Ε παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση ελαττώνοντας τα επίπεδα ελευθέρων ριζών και των χηλικών αντιδράσεων υπεροξειδωσίας στον ανθρώπινο οργανισμό, και κατ'επέκταση, μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και ορισμένων τύπων καρκίνου (Hernández-Pérez et al. 2020). Μάλιστα, η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C μπορεί να αποτρέψει την υπέρταση, και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθώς και να χρησιμεύσει ως δείκτης διατροφικής απώλειας από θερμικές διεργασίες λόγω της ευαισθησίας της στο φως, το οξυγόνο και τη θερμότητα (Montoya-Ballesteros et al. 2014).

Ακόμη, η πιπεριά τσίλι περιέχει πλήθος ανόργανων στοιχείων όπως κάλιο (K), φώσφορο (P), μαγνήσιο (Mg), ασβέστιο (Ca), νάτριο (Na), σίδηρο (Fe), ψευδάργυρο (Zn), μαγγάνιο (Mn), βόριο (B), χαλκό (Cu) και σελήνιο (Se). Τα στοιχεία αυτά διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη, την υγεία, την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών (Hernández-Pérez et al. 2020).

### 1.2.2. Φαινόλες και φλαβονοειδή

Οι φαινολικές ενώσεις είναι από τα πιο άφθονα φυτοχημικά που περιέχονται στα φρούτα και στα λαχανικά (Anaya-Esparza et al. 2021). Η δομή τους βασίζεται σε έναν αρωματικό ή φαινολικό δακτύλιο και μια ομάδα υδροξυλίου συνδεδεμένη με έναν άνθρακα του δακτυλίου αυτού. Με βάση τον υπάρχοντα αριθμό μονάδων φαινόλης, οι φαινολικές ενώσεις ταξινομούνται είτε ως απλές φαινόλες, οι οποίες περιέχουν μία μόνο δομική μονάδα φαινόλης, είτε ως πολυφαινόλες, οι οποίες περιέχουν από δύο ως και περισσότερες δομικές μονάδες φαινόλης. Στην τελευταία κατηγορία ανήκει η ομάδα των φλαβονοειδών, η πολυφαινολική φύση των οποίων τους επιτρέπει να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, όπως αυτές του υπεροξειδίου και του υδροξυλίου. Ο σκελετός τους απαρτίζεται από δύο δακτυλίους βενζολίου (δακτύλιος Α και Β) που συνδέονται μεταξύ τους με τρεις άνθρακες. Ο δακτύλιος Α προκύπτει από τη συμπύκνωση τριών μορίων μηλονυλ-CoA, ενώ ο δακτύλιος Β προκύπτει από το p-κουμαροϋλ-CoA. Τα φλαβονοειδή μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε τουλάχιστον οκτώ υποομάδες (ανθοκυανιδίνες, φλαβανόνες, φλαβαν-3όλες, φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες) ανάλογα με τις υποκαταστάσεις τους δίνοντας διαφορετικές ενώσεις (Εικόνα 1.3) (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019).



Εικόνα 1.3 Υποκατηγορίες φλαβονοειδών (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019)

Επιστημονικά δεδομένα αποδεικνύουν τη συσχέτιση μεταξύ της πλούσιας σε φυτοχημικά διατροφής και της μείωσης του κινδύνου χρόνιων μη μεταδοτικών ασθενειών, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση και ο καρκίνος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι βιολογικές επιδράσεις των πολυφαινολών και των φλαβονοειδών έχουν αποδοθεί στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία μπορεί να μετριάσει το οξειδωτικό στρες. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή είναι γνωστά και για τις βιοχημικές και φαρμακευτικές τους δράσεις ως

αντιφλεγμονώδη και αντιαλλεργικά. Έτσι, η τακτική κατανάλωση πιπεριών τσίλι μπορεί να βελτιώσει την ανθρώπινη υγεία και να δράσει προληπτικά έναντι εκφυλιστικών ασθενειών (Anaya-Esparza et al. 2021; Hernández-Pérez et al. 2020).

Επιπρόσθετα, στις πιπεριές *Capsicum* έχουν βρεθεί και άλλες φαινολικές ενώσεις (Εικόνα 1.4) πέρα από τις προαναφερόμενες, όπως οι χαλκόνες, οι κουμαρίνες, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα με κυριότερα το γαλλικό και το βανιλικό οξύ και τα υδροξυκιναμικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, το σιναπικό οξύ και το κινναμικό οξύ. Τέλος, τα στιλβένια ανήκουν και αυτά στην οικογένεια των φαινολικών και μοιράζονται εν μέρη την ίδια βιοσυνθετική οδό με τα флаβονοειδή. Ωστόσο, μόνο ένα στιλβένιο έχει εντοπιστεί στα φρούτα *C. annuum L.*, η ρεσβερατρόλη (Carvalho Lemos, Reimer, and Wormit 2019).

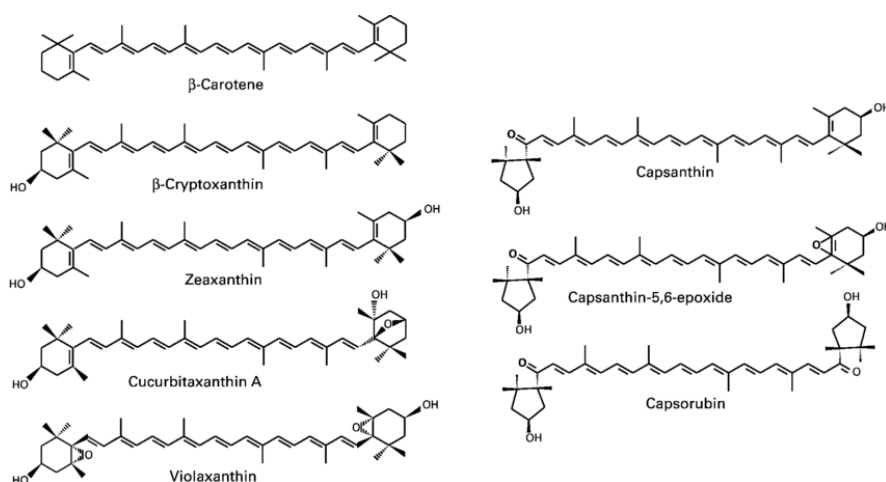
Compound
Apigenin
Apigenin 6,8-di-C-hexoside
Apigenin 6-C-pentoside-8-C-hexoside dihydrokaempferol
Dihydroquercetin
Luteolin 6-C-hexoside
Luteolin 6-C-pentoside-8-C-hexoside
Luteolin 6,8-di-C-hexoside
Luteolin 7-O-(2-apiosyl)-glucoside
Luteolin (apiosyl-acetyl)-glucoside
Luteolin 6-C-hexoside-8-C-pentoside
Luteolin 8-C-hexoside
Quercetin 3-O-rhamnoside
Quercetin rhamnoside-glucoside
Quercetin 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside
Quercetin 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside

Εικόνα 1.4 Φαινολικές ενώσεις στις πιπεριές *Capsicum* (Hernandez-Perez et al. 2020)

### 1.2.3. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές που εμπεριέχονται σε φυτά, φύκια και μικροοργανισμούς. Αποτελούν λιπόφιλες ισοπρενοειδείς ενώσεις που διαθέτουν ένα εκτεταμένο σύστημα συζυγιακών διπλών δεσμών και περιλαμβάνουν 700 χαρακτηρισμένες δομές. Οι περισσότερες από αυτές προέρχονται από το γραμμικό τετρατερπενικό φυτάνιο (C40), το οποίο χαρακτηρίζεται ως η βασική δομή του χρώματος των καροτενοειδών. Τροποποιήσεις σε αυτόν τη γραμμικό με συζυγείς δεσμούς σκελετό είναι υπεύθυνες για την ποικιλομορφία των καροτενοειδών. Αναλυτικά, οι χημικές δομές των καροτενοειδών που έχουν βρεθεί στις κόκκινες πιπεριές *C. annuum* παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.5. Επιπλέον, τα καροτενοειδή ταξινομούνται με βάση τη βιολογική τους σημασία σε πρωτογενή, τα οποία εμπλέκονται άμεσα στη φωτοσύνθεση (π.χ. β-καροτένιο, ζεαξανθίνη, λουτεΐνη) και σε δευτερογενή, τα οποία δεν εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση (π.χ. λυκοπένιο, α-καροτένιο,

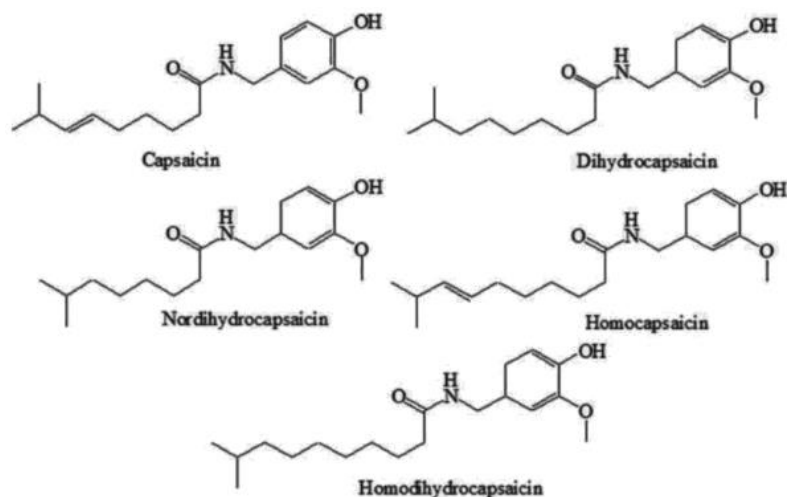
καψανθίνη). Επίσης, μπορούν να ταξινομηθούν κι ως άκυκλα (λικοπένιο), μονοκυκλικά (γ-καροτένιο) ή δικυκλικά (β-καροτένιο) (Hernández-Pérez et al. 2020).



Εικόνα 1.5 Χημικές δομές των καροτενοειδών που έχουν βρεθεί στις κόκκινες πιπεριές *Capsicum annuum* L. (Perez-Galvez et al 2003)

Γενικά, τα καροτενοειδή ευθύνονται για το έντονο χρώμα των πιπεριών *Capsicum*, και επιτελούν βασικές διατροφικές λειτουργίες που σχετίζονται με την υγεία του ανθρώπου (Anaya-Esparza et al. 2021). Θεωρούνται λειτουργικά φυτοχημικά λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης που μπορεί πιθανά να αποτρέψουν τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και να εμποδίζουν την ανάπτυξη έλκους. Τα σημαντικότερα καροτενοειδή που έχουν βρεθεί στις πιπεριές τσίλι είναι το  $\alpha$ -καροτένιο, το  $\beta$ -καροτένιο (πρόδρομος ένωση βιταμίνης A), η βιολακανθίνη, η καψανθίνη, η καψορουβίνη και το 5,6-εποξείδιο της καψανθίνης. Από αυτά, το κυριότερο είναι η καψανθίνη αντιπροσωπεύοντας το 50% του συνόλου των καροτενοειδών στις ώριμες πιπεριές, (Montoya-Ballesteros et al. 2014) που στο εμπόριο χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως χρωστικές τροφίμων, ως πρόσθετα ζωοτροφών και ως συστατικά φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων (Hernández-Pérez et al. 2020).

#### 1.2.4. Καψαϊκινοειδή



Εικόνα 1.6 Χημική δομή καψαϊκινοειδών (Dekebo 2020)

Τα καψαϊκινοειδή ανήκουν στην οικογένεια των αλκαλοειδών. Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ευθύνονται τόσο για την έντονη και καυτερή γεύση των πιπεριών τσίλι, όσο και για μέρος της βιολογικής δραστηριότητάς τους, της οποίας τα αποτελέσματα, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία. Γενικότερα, στις πιπεριές *Capsicum* έχουν βρεθεί τα εξής καψαϊκινοειδή: η καψαϊκίνη (C), η διυδροκαψαϊκίνη (DHC), η νορ-διυδροκαψαϊκίνη (NHC), η ομοκαψαϊκίνη και η ομοδιυδροκαψαϊκίνη, η χημική δομή των οποίων αποτυπώνεται στην Εικόνα 1.6. Τα κυριότερα από αυτά είναι η καψαϊκίνη και η διυδροκαψαϊκίνη καθώς υπάρχουν σε ποσοστό ανώτερο του 80% της συνολικής περιεκτικότητας της πιπεριάς σε καψαϊκινοειδή. Αξίζει να σημειωθεί πως η καυτερή/πικάντικη αίσθηση αποδίδεται κυρίως στην καψαϊκίνη, ενώ τα υπόλοιπα καψαϊκινοειδή αποδίδουν πιο ήπιες γεύσεις. Διαθέσιμα πειραματικά στοιχεία αποδεικνύουν τη δυνατότητα των καψαϊκινοειδών να μειώνουν το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή, τον πόνο και την πρόσληψη λίπους. Κατ' επέκταση, εμφανίζουν θετικό αντίκτυπο ενάντια στην παχυσαρκία αλλά και στις καρδιαγγειακές και γαστρεντερικές διαταραχές, τις δερματολογικές παθήσεις, τον καρκίνο, και τη νευρογενή κύστη. Μάλιστα, η καψαϊκίνη έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε προκαταρκτικές μελέτες για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και του πνεύμονα, καθώς και για διάφορους τύπους λευχαιμίας. Ακόμη, έχει χημειοπροληπτικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες (Montoya-Ballesteros et al. 2014; Hernández-Pérez et al. 2020).

### 1.2.5. Λιπίδια: λιπαρά οξέα και στερόλες

Είναι γνωστό πως οι λιποδιαλυτές βιταμίνες μπορούν και μεταφέρονται από τα φυτικά όργανα μέσω λιπιδίων, τα οποία είναι υδρόφοβα μόρια αποτελούμενα από άτομα άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου. Μεταξύ των πολλών διαφορετικών κατηγοριών λιπιδίων που υπάρχουν στα φυτά, τα λιπαρά οξέα είναι τα πιο ενδιαφέροντα λόγω της μεγάλης μεταβολικής και δομικής σημασίας τους, παρότι υπάρχουν σε ένα γενικά μικρό ποσοστό σε αυτά (Jr et al. 2022). Μάλιστα, η σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σχετίζεται άμεσα με την θρεπτική τους αξία (Teixeira de Souza Sora et al. 2015). Τα λιπαρά οξέα είναι αλειφατικές αλυσίδες άνθρακα που μπορεί να είναι είτε γραμμικές είτε διακλαδισμένες, κορεσμένες ή ακόρεστες. Στα φυτά, τα περισσότερα λιπαρά οξέα εμφανίζονται ως αλυσίδες ακόρεστου άνθρακα με έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς. Συγκεκριμένα, οι πιπεριές *Capsicum* (και ιδιαίτερα οι σπόροι τους) είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και σχετικά φτωχές σε κορεσμένα (Dekebo 2020), ενώ τα χαρακτηριστικά λιπιδικά μόρια που καθιστούν το γένος μοναδικό βασίζονται στα διακλαδισμένα λιπαρά οξέα που αποτελούν μέρος της βιοσυνθετικής οδού των καψαϊκινοειδών (Jr et al. 2022). Επομένως, οι πιπεριές τσίλι χαρακτηρίζονται από υψηλή αναλογία πολυακόρεστων/κορεσμένων λιπαρών οξέων και θεωρούνται ευεργετικές για την υγεία (Teixeira de Souza Sora et al. 2015). Τα κύρια λιπαρά οξέα που έχουν βρεθεί σε αυτές είναι το παλμιτικό (C16:0), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), το λινολεϊκό (C18:2), και το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3). Σημειώνεται πως τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κατέχει το λινολεϊκό οξύ ( $\approx 70\%$ ) (Dekebo 2020), το οποίο είναι απαραίτητο στη διατροφή μας, αφού συνιστά σημαντικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και εμπλέκεται στη σύνθεση διαφόρων ουσιών με αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική και αντικαρκινική δράση. Ακόμη, το λινολεϊκό οξύ χρησιμοποιείται εκτενώς στη φαρμακοβιομηχανία για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του.

Επιπρόσθετα, οι σπόροι της πιπεριάς τσίλι περιέχουν και ενώσεις στερολών, μιας ακόμη κατηγορίας λιπιδίων. Ειδικότερα, έχουν ανιχνευτεί ενώσεις, όπως η  $\beta$ -σιτοστερόλη, η στιγμαστερόλη και η καμπεστερόλη, οι οποίες παρουσιάζουν αυξανόμενο διατροφικό ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να μειώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στο πλάσμα (Anaya-Esparza et al. 2021; Silva et al. 2013).

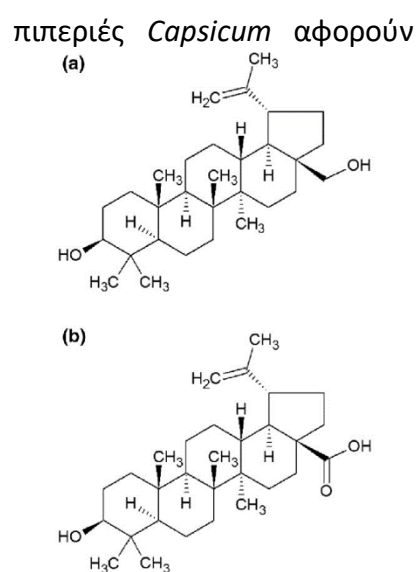
### 1.2.6. Υδατάνθρακες: ελεύθερα σάκχαρα και πολυσακχαρίτες

Ως πηγές υδατανθράκων των πιπεριών *Capsicum* θεωρούνται τα ελεύθερα σάκχαρα, οι πολυσακχαρίτες και τα υπολείμματα υδατανθράκων διαφόρων γλυκοζιτών. Όσον αφορά τα ελεύθερα σάκχαρα, αυτά βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού της πιπεριάς προσδίδοντάς της τα γευστικά της χαρακτηριστικά. Τα κύρια σάκχαρα που έχουν βρεθεί είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη, ενώ έρευνες αναφέρουν και την παρουσία ιχνών μαλτόζης. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως η περιεκτικότητα σε σάκχαρα στις γλυκιές πιπεριές του είδους *C. annuum* είναι υψηλότερη. Σχετικά με τους πολυσακχαρίτες, αυτοί χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες: τους αμυλούχους και τους μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες (Non-Starch Polysaccharides, NSPs) ή αλλιώς διαιτητικές ίνες. Οι ομάδες αυτές διαφοροποιούνται μεταξύ τους λόγω της διαφορετικής δομής των πολυμερικών αλυσίδων τους, της φύσης των συστατικών των σακχάρων και των ποικίλων τύπων γλυκοζιτικών δεσμών που υπάρχουν. Γενικώς, οι πολυσακχαρίτες συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον λόγω της διατροφικής τους αξίας και της αντιφλεγμονώδους δράσης των πηκτικών πολυσακχαριτών που απομονώνονται από τις γλυκιές πιπεριές. Αναφορικά δε με τους NSPs, συνήθως προέρχονται από υλικό του κυτταρικού τοιχώματος και αφορούν ενώσεις όπως η κυτταρίνη, οι πηκτίνες και οι ημικυτταρίνες (Asnin and Park 2015).

### 1.2.7. Άλλα φυτοχημικά που προσδιορίζονται σε καρπούς, σπόρους και φύλλα πιπεριών

Άλλες βιοδραστικές ενώσεις που έχουν βρεθεί στις πιπεριές *Capsicum* αφορούν τριτερπένια, οργανικά οξέα, αμινοξέα, καθώς και πτητικές ουσίες.

Από τα τριτερπένια, η βετουλίνη (Εικόνα 1.7 a) αποτελεί την κύρια ένωση που περιέχεται στους σπόρους των πιπεριών *Capsicum*. Ειδικότερα, η βετουλίνη χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολυμερών, αλλά και ως ενδιάμεσο παράγωγο της σύνθεσης άλλων βιοενεργών ουσιών. Μάλιστα, μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε βετουλινικό οξύ (Εικόνα 1.7 b) το οποίο διαθέτει αποδεδειγμένα αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και



Εικόνα 1.7 Χημικές δομές της βετουλίνης (α) και του βετουλινικού οξέος (b) (Hordyjewska et al. 2019)



αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Ακόμη, το βετουλινικό οξύ και τα παράγωγά του εμφανίζουν μια πολλά υποσχόμενη δράση κατά στον ίο της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας και μια κυτταροτοξική δράση ενάντια σε αρκετές κυτταρικές σειρές όγκου.

Από τα οργανικά οξέα, πέντε είναι αυτά που συναντώνται συνήθως στους σπόρους της πιπεριάς τσίλι: το οξαλικό, το κιτρικό, το ασκορβικό, το μηλικό και το φουμαρικό οξύ. Από αυτά το αφθονότερο στους σπόρους είναι το οξαλικό οξύ, το οποίο είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ με αρκετές σημαντικές λειτουργίες στα φυτά, αφού συμμετέχει στην άμυνά τους έναντι φυτοφάγων, εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, έχει θεωρηθεί ως αντιθρεπτικό λόγω του ότι παρεμποδίζει την απορρόφηση και το μεταβολισμό του ασβεστίου, του σιδήρου, του μαγνησίου και του χαλκού. Επομένως, τα αποτελέσματα της μεγάλης κατανάλωσής του για μεγάλα χρονικά διαστήματα κρίνονται επιζήμια (Silva et al. 2013).

Παράλληλα, τα αμινοξέα (δομικοί λίθοι πρωτεϊνών) που έχουν βρεθεί τόσο στη σάρκα όσο και στους σπόρους των κόκκινων πιπεριών τσίλι αριθμούνται σε 18 (Πίνακας 1.1), εκ των οποίων τα 8 χαρακτηρίζονται ως μη απαραίτητα (μπορούν και συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό) και τα υπόλοιπα 9 ως απαραίτητα (προσλαμβάνονται αποκλειστικά από τις τροφές) (E 2022).

Τέλος, 17 πτητικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στους σπόρους της πιπεριάς *Capsicum annuum*, εκ των οποίων οι περισσότερες ανήκαν στην ομάδα των αλδεϋδών με χαρακτηριστικότερες την εξανάλη και τη βενζαλδεϋδη. Οι υπόλοιπες ενώσεις αφορούν κετόνες, αλκοόλες, εστέρες, τερπένια και μεθοξυπυραζίνες (Silva et al. 2013).

Πίνακας 1.1 Ταυτοποιημένα αμινοξέα σε σάρκα και σπόρους κόκκινων πιπεριών *Capsicum* (E 2022)

Αμινοξύ	Κατάταξη αμινοξέος
Γλυκίνη	Μη απαραίτητο
Αλανίνη	Μη απαραίτητο
Προλίνη	Μη απαραίτητο
Βαλίνη	Απαραίτητο
Θρεονίνη	Απαραίτητο
Κυστεΐνη	Μη απαραίτητο
Ισολευκίνη	Απαραίτητο
Ασπαρτικό οξύ	Μη απαραίτητο
Λυσίνη	Απαραίτητο
Γλουταμινικό οξύ	Μη απαραίτητο
Ιστιδίνη	Απαραίτητο
Μεθειονίνη	Απαραίτητο
Φαινυλαλανίνη	Απαραίτητο
Αργινίνη	Μη απαραίτητο
Τυροσίνη	Μη απαραίτητο
Τρυπτοφάνη	Απαραίτητο
Λευκίνη	Απαραίτητο

### 1.2.8. Συγκεντρωτικός πίνακας βιοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχονται στους σπόρους της κόκκινης πιπεριάς *Capsicum annuum*

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 1.2) παρουσιάζονται συνολικά οι κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στους σπόρους της κόκκινης πιπεριάς.

Πίνακας 1.2 Συγκεντρωτικός πίνακας εμπεριεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων στους σπόρους της κόκκινης πιπεριάς *Capsicum annuum* (Carvalho Lemos, Reimer and Wormit 2019, Silva et al. 2013, Dekebo 2020)

Χημική κατηγορία	Βιοδραστική ένωση
<b>Βιταμίνες</b>	Βιταμίνη C, βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)
<b>Φαινολικά οξέα</b>	2-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, π-κουμαροϋλομηλικό οξύ, κινναμικό οξύ, καφεοϋλογλυκόζη, 3-φερουλοϋλκινικό οξύ, ισοφερουλικό οξύ, 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, 3-διυδροξυ-3-(3-υδροξυφαινυλ)-προπιονικό οξύ
<b>Φλαβονοειδή</b>	Φλαβονόλες: επιγαλλοκατεχίνη, κατεχίνη-3-O-γαλλική, επικατεχίνη, κερσετίνη Φλαβανόνες: ναριγίνη, απιγενίνη Ισοφλαβονοειδή: 7-O-γλυκουρονίδιο φορμονονετίνης, 2'-O-γλυκοζίτης 3-υδροξυφλορετίνης
<b>Άλλες πολυφαινόλες</b>	Κουρκουμινοειδή: δεμεθοξυκουρκουμίνη Φουρανοκουμαρίνες: ισοπιπινελίνη, 5-θεική 2-υδροξυ-4-μεθοξυακετοφαινόνη Τυροσόλες: 3,4-DHPEA-AC, 3,4-DHPEA-EDA, υδροξυτυροσόλη 4-γλυκοσίδη Λιγνάνες: σχισανδρίνη C, τοδολακτόλη A Στιλβένια: ρεσβερατρόλη 3-O-γλυκοσίδη
<b>Καροτενοειδή</b>	β-καροτένιο, καψανθίνη, καψορουβίνη, λουτεΐνη, βιολαξανθίνη, ζεαξανθίνη, β-κρυπτοξανθίνη
<b>Καψαϊκινοειδή</b>	καψαϊκίνη (C), διυδροκαψαϊκίνη (DHC), νορ-διυδροκαψαϊκίνη (NHC), ομοκαψαϊκίνη, ομοδιυδροκαψαϊκίνη

<b>Λιπαρά οξέα</b>	μυριστικό, πενταδεκανοϊκό, παλμιτικό, παλμιτολεϊκό, επταδεκανοϊκό, στεατικό, ολεϊκό, ελαϊκό, λινολεϊκό, αραχιδονικό, βεχενικό οξύ
<b>Στερόλες</b>	καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη
<b>Σάκχαρα</b>	γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη
<b>Τριτερπένια</b>	βετουλίνη
<b>Οργανικά οξέα</b>	οξαλικό, μηλικό, φουμαρικό, κιτρικό, ασκορβικό οξύ
<b>Αμινοξέα</b>	γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη, βαλίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, ισολευκίνη, ασπαρτικό οξύ, λυσίνη, γλουταμινικό οξύ, ιστιδίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, λευκίνη

### 1.3. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, οι τσίλι πιπεριές κατέχουν πλήθος βιοδραστικών ενώσεων με σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των καταναλωτών. Συνεπώς, ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων κρίνεται επιτακτικός, καθώς επιτρέπει την κατανόηση της σύστασης της ποιότητας και των βιολογικών ιδιοτήτων των πιπεριών, προσφέροντας πληροφορίες για την ασφάλεια και τη δυνητική χρήση τους σε διαφορετικούς τομείς, όπως η διατροφή, η υγεία και η φαρμακευτική βιομηχανία. Αναλυτικότερα, οι κυριότεροι μέθοδοι προσδιορισμού των βιοδραστικών ενώσεων πρόκειται να παρουσιαστούν στη συνέχεια. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες: τις φασματοφωτομετρικές και τις χρωματογραφικές μεθόδους. Οι τελευταίες διακρίνονται επιπλέον στις μεθόδους υγρής και αέριας χρωματογραφίας.

### 1.3.1. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.3) παρουσιάζονται οι κυριότερες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων σε διάφορα τμήματα της πιπεριάς τσίλι.

Πίνακας 1.3 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων

	<b>Φασματοφωτομετρικές Μέθοδοι</b>			
	Φασματοφωτομετρία UV-Vis	Folin-Ciocalteu	Aluminum Chloride	Zou method
<b>Παραπροϊόν πιπεριάς (προέλευση δείγματος)</b>	Βρώσιμο μέρος πιπεριάς	Περικάρπιο, σπόροι και πλακούντας	Σπόροι και πούλπα	Σπόροι και πούλπα
<b>Μέθοδος εκχύλισης</b>	Εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα	Εκχύλιση με 4 ml μεθανόλης 80% σε νερό	Εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης 80%	Εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης 80%
<b>Φασματοφωτόμετρο</b>	Φασματοφωτόμετρο UV-ορατού	Lambda Bio 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο	Multiskan Go microplate φωτόμετρο	Multiskan Go microplate φωτόμετρο
<b>Μήκος κύματος</b>	450 nm	765 nm	440 nm	500 nm
<b>Προσδιοριζόμενες ενώσεις</b>	Καροτενοειδή	Φαινολικές ενώσεις	Φλαβονοειδή	Ταννίνες
<b>Ποσότητες</b>	1 – 10,4 ppm beta-carotene	TPC ολόκληρου φρούτου: 10,76 ± 0,06 g GAE/kg DW	Σπόροι: 0,54 ± 0,01 µg QE/g FW Πούλπα: 137,43 ± 6,35 µg QE/g FW	Σπόροι: 0,12 ± 0,00 µg QE/g FW Πούλπα: 0,22 ± 0,01 µg QE/g FW
<b>Αναφορά</b>	(Tejeda et al. 2022)	(Zamljen et al. 2022)	(Leng et al. 2022)	(Leng et al. 2022)

\*Φασματοφωτομετρία UV-Vis (Ultraviolet-Visible): Φασματοφωτομετρία ορατού υπεριώδους

\*Aluminum Chloride: Μέθοδος Χλωριούχου αργιλίου

Με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 1.3), οι συνηθέστερες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων είναι η φασματοφωτομετρία UV-Vis, η Folin-Ciocalteu, η μέθοδος του χλωριούχου αργιλίου και η μέθοδος Ζου, οι οποίες προσδιορίζουν αντίστοιχα καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και ταννίνες.

### 1.3.2. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1.4 και 1.5) παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων σε διάφορα τμήματα της πιπεριάς τσίλι.

Πίνακας 1.4 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων (I) σε διάφορα τμήματα της πιπεριάς

	Χρωματογραφικές μέθοδοι (LC) I			
	HPTLC	HPLC-IR	HPLC-UV	HPLC-PDA
<b>Παραπροϊόν πιπεριάς (προέλευση δείγματος)</b>	Φλούδα, πούλπα και βρώσιμο μέρος πιπεριάς	Περικάρπιο και πλακούντας	① Βρώσιμο μέρος πιπεριάς ② Σπόροι	①, ② Περικάρπιο
<b>Μέθοδος εκχύλισης</b>	Εκχύλιση με αιθανόλη 70% v/v οξινισμένη με μυρμηκικό οξύ και κατεργασία με υπερήχους (30')	Εκχύλιση με 2ml απεσταγμένου νερού	① Εκχύλιση με 100ml αιθανόλης, μεθανόλης ή υδατικών διαλυμάτων ② Εκχύλιση 1g σπόρων με 50 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 N για 30 min	① Εκχύλιση 0,5g δείγματος με 62,5% μεθανόλη 40ml και μετέπειτα προσθήκη ασκορβικού οξέος ② Εκχύλιση 0,2g σαπωνοποιημένου δείγματος εκχυλίστηκαν με 70 ml εξανίου
<b>Ανιχνευτής</b>	TLC Visualizer	IR	① Shimadzu SPD-10A UV detector ② UV detector	①, ② Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδου
<b>Στήλη</b>	C18 αντίστροφης φάσης στήλη (4.6 x 150mm, 5μm)	Rezex RCM monosaccharide 30x0,78 cm	① Zorbax SB-C18 250x4,6mm, 5μm ② Nucleogel Ion 300 OA 300x7,7mm	① Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6mmx12,5mm,5μm ② VYDAC 201TP54-C18 4,6mmx250mm, 5μm
<b>Κινητή φάση</b>	Μείγμα οξικού αιθυλεστέρα, διχλωρομεθανίου, μυρμηκικού και οξικού οξέος,	Απεσταγμένο νερό	① A: Milli Q water (οξικό οξύ) B: μεθανόλη ② H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01 N	① A: Milli Q water με TFA 0,05% w/w B: μεθανόλη με TFA 0,05% w/w

	νερού 100:25:10:10:11 (v/v)			Γ: ακετονιτρίλιο με TFA 0,05% w/w ② ακετονιτρίλιο: μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο 80:11:9 v/v/v
<b>Προσδιοριζόμενες ενώσεις</b>	Φαινολικές ενώσεις	Σάκχαρα: φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη	① Φαινολικές ενώσεις ② Οργανικά οξέα	① Φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα ② Καροτενοειδή
<b>Ποσότητες</b>	13,80 ± 0,02 μg TAE	Ολικά σάκχαρα: Περικάρπιο: 308,12 ± 13,22 g/kg DW Πλακούντας: 96,18 ± 8,34 g/kg DW	① TPC: Εκχυλίσματα: νερού 28,73, μεθανόλης 22,76 και αιθανόλης 17,1 mg GAE/g DW ② Οργανικά οξέα: οξαλικό 3517,9 ± 1,6, μηλικό 2969,6 ± 34,5, φουμαρικό 252,2 ± 0,4, κιτρικό 1408,3 ± 3,0, ακονιτικό 3,6 ± 0,1, ασκορβικό 66,6 ± 3,3 mg/kg	① Ολικά φλαβονοειδή: 160,41 ± 3,03 μg/g DW, ολικά φαινολικά οξέα: 37,63 ± 0,21 μg/g DW ② Ολικά καροτενοειδή: 365,40 ± 11,78 μg/g DW
<b>Αναφορά</b>	(Sobolev et al. 2018)	(Zamljen et al. 2022)	① (Mohammad Salamatullah et al. 2022) ② (Silva et al. 2013)	①, ② (Thuphairo, Sornchan, and Suttisansanee 2019)

\* HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Λεπτής Στοιβάδας

\* HPLC-IR (High Performance Liquid Chromatography-Infrared Spectroscopy): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης - Υπέρυθρη Φασματοσκοπία

\* HPLC-UV (High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Υπεριώδη Ανίχνευση

\* HPLC-PDA (High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανίχνευση Συστοιχίας Φωτοδιόδου

Πίνακας 1.5 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων στα διάφορα τμήματα της πιπεριάς (II)

	<b>Χρωματογραφικές μέθοδοι (LC) II</b>		
	UHPLC-ESI-MS/MS	LC-ESI-QTOF-MS/MS	HPLC- DAD
<b>Παραπροϊόν πιπεριάς (προέλευση δείγματος)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Βρώσιμο μέρος πιπεριάς</li> <li>② Περικάρπιο, σπόροι και πλακούντας</li> </ul>	Πούλπα και σπόροι	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Σπόροι</li> <li>② Βρώσιμο μέρος πιπεριάς</li> </ul>
<b>Μέθοδος εκχύλισης</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Εκχύλιση 0,3g δείγματος με 3ml διαλύματος νερού:ακετονιτρίλιου (20:80 v/v)</li> <li>② Εκχύλιση με 4 ml μεθανόλης 80% σε νερό</li> </ul>	Εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης 80%	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Αλκαλική υδρόλυση και σαπωνοποίηση των ελεύθερων ενώσεων 0,5g σπόρων με 20 ml αιθανολικού KOH 1M</li> <li>② Εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα</li> </ul>
<b>Ανιχνευτής</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Tandem-MS φασματόμετρο</li> <li>② TSQ Quantum Access Max quadrupole mass φασματόμετρο</li> </ul>	Agilent 6520i Accurate-Mass Q-TOF detector	①, ② Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
<b>Στήλη</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Ascentis Express C18 fused core 100x2,1mm, 2,7μm partially porous</li> <li>② Gemini C18 150x4,60mm</li> </ul>	Synergi Hydro 80 A LC column 250nm x 4,6nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Reverse phase Hypersil ODS column 4,0x200mm, 5μm</li> <li>② Kromasil C18 3,5x150mm</li> </ul>
<b>Κινητή φάση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο</li> <li>② A: 0,1% μυρμηκικό οξύ και 3% ακετονιτρίλιο σε δισαποσταγμένο νερό B: 0,1% μυρμηκικό οξύ και 3% δισαποσταγμένο νερό σε ακετονιτρίλιο</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A: οξικό οξύ και νερό 0,5:99,5 v/v</li> <li>B: ακετονιτρίλιο, οξικό οξύ και νερό 50:49,5:0,5 v/v/v</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① μεθανόλη: ακετονιτρίλιο 30:70</li> <li>② A: 1% οξικού οξέος/ νερού B: μεθανόλη</li> </ul>
<b>Αναλυόμενες ενώσεις</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>① 36 φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις</li> <li>② Καψαϊκινοειδή: καψαϊκίνη, διυδροκαψαϊκίνη, νορ-</li> </ul>	59 φαινολικές ενώσεις: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια, λιγνάνες,	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Στερόλες και τριτερπένια</li> <li>② Καψαϊκινοειδή</li> </ul>

	διϋδροκαψαϊκίνη, ομοκαψαϊκίνη, ομοδιδροκαψαϊκίνη	φουρανοκουμαρίνες, κουρκουμνοειδή, υδρόξυ- βενζαλδεΐδες, τυροσόλες	
<b>Ποσότητες</b>	① 146 – 352 mg GAE/g DW ② Περικάρπιο: 0,90±0,32g/kg DW Πλακούντας: 16,15 ± 0,70 g/kg DW Σπόροι: 0,91 ± 0,07 g/kg DW	135,0452 – 741,2273 m/z	① Βετουλίνη: 138,2 ± 3,3, καμπεστερόλη: 42,3 ± 3,5, στιγμαστερόλη: 6,3 ± 1,2, σιτοστερόλη 46,1 ± 1,5 mg/kg ② 5,696–103,764 SHUg DW
<b>Αναφορά</b>	① (Tejeda et al. 2022) ② (Zamljen et al. 2022)	(Leng et al. 2022)	① (Silva et al. 2013) ② (Tejeda et al. 2022)

\* UHPLC-ESI-MS/MS (Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry): Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Απόδοσης με Ιοντισμό Ηλεκτροϋψηλής Εντοπισμού και Φασματοσκοπία Μάζας/Μάζας

\* LC-ESI-QTOF-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry): Υγρή Χρωματογραφία-Ιοντισμός Ηλεκτροψεκασμού-Τετραπολική Φασματομετρία Μάζας Διαδοχικού Χρόνου Πτήσης

\* HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης - Ανίχνευση Διοδίων

Σύμφωνα με τα στοιχεία των παραπάνω Πινάκων (Πίνακας 1.4, Πίνακας 1.5) , διάφορες παραλλαγές της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται ευρύτατα προκειμένου να επιτευχθεί τόσο ο ποιοτικός όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχονται στις πιπεριές τσίλι. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια των μεθόδων HPTLC, HPLC-UV, HPLC-PDA, και UHPLC-ESI-MS/MS έχει ανιχνευτεί πλήθος φαινολικών ενώσεων, ενώ με τη βοήθεια της HPLC-IR έχουν προσδιοριστεί τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Ακόμη, οι τεχνικές HPLC-UV, HPLC-PDA και UHPLC-ESI-MS/MS έχουν ταυτοποιήσει επιπλέον οργανικά οξέα, καρτενοειδή και καψαϊκίνοειδή, αντίστοιχα, πέρα των φαινολικών ενώσεων. Τέλος, η HPLC-DAD έχει καταφέρει να ανιχνεύσει στερόλες, τριτερπένια, καθώς και καψαϊκίνοειδή.



### 1.3.3. Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.6) παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων σε διάφορα τμήματα της πιπεριάς τσίλι.

Πίνακας 1.6 Μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων στα διάφορα τμήματα της πιπεριάς

	Χρωματογραφικές μέθοδοι (GC)	
	GC-MS	GC-IT/MS
<b>Παραπροϊόν πιπεριάς (προέλευση δείγματος)</b>	Περικάρπιο	Σπόροι
<b>Μέθοδος εκχύλισης</b>	Bligh Dyer	Υδρόλυση εστεροποιημένων λιπαρών οξέων με 11g/l μεθανολικού διαλύματος KOH
<b>Ανιχνευτής</b>	QP2010 SE- GS-MS φασματοφωτόμετρο	Varian Saturn 4000 mass elective detector
<b>Στήλη</b>	Rxi-5Sil 30m x 250µm id x 0,25µm film	VF-5 MS 30 x 0,25mm, 0,25µm
<b>Φέρον αέριο</b>	Ήλιο	Ήλιο
<b>Προσδιοριζόμενες ενώσεις</b>	17 λιπαρά οξέα	Λιπαρά οξέα και πτητικές ενώσεις
<b>Ποσότητες</b>	Κυριότερα λιπαρά οξέα: λινολεϊκό οξύ 36,74–57,83%, παλμιτικό οξύ 14.82–24.35%, α-λινολεϊκό οξύ 12.34–22.54%, στεατικό οξύ 4.67–13.37%	Κυριότερα λιπαρά οξέα: λινολεϊκό οξύ 22646,0 ± 1355,2, παλμιτικό οξύ 13691,3 ± 762,8, ολεϊκό οξύ 3930,7 ± 76,9, στεατικό οξύ 10789,2 ± 427,0, ελαϊκό οξύ 1573.0 ± 32.4, αραχιδονικό οξύ 2105,1 ± 177,7 (mg/kg) Πτητικές ενώσεις: αλδεΐδες 375,7, κετόνες 158,2, εστέρες 2218,2, μονοτερπένια 394,1, σεσκιτερπένια 5,2 (εκφράζονται ως η τυπική απόκλιση τριών προσδιορισμών)
<b>Αναφορά</b>	(Saini and Keum 2016)	(Silva et al. 2013)

\*GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry): Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας

\*GC-IT/MS (Gas Chromatography-Ion Trap/Mass Spectrometry): Αέρια Χρωματογραφία-Παγίδα Ιόντων/Φασματομετρία Μάζας

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 1.6), οι μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων με χρήση αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταυτοποίηση και την ποσοτική εκτίμηση λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η GC-IT/MS περιέχει επιπρόσθετα έναν αναλυτή μάζας παγίδευσης ιόντων και μπορεί να ανιχνεύσει αλλά και να ποσοτικοποιήσει πλήθος πτητικών ενώσεων που περιέχονται στις πιπεριές *Capsicum* και συνεισφέρουν στην ιδιαίτερη γεύση και το άρωμά τους.

#### **1.4. Παραπροϊόντα τροφίμων: Γενικά στοιχεία**

Οι βιομηχανίες τροφίμων δημιουργούν μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων σε όλα τα βήματα της παραγωγικής τους διαδικασίας. Ως παραπροϊόν χαρακτηρίζεται «κάθε ουσία ή αντικείμενο που προκύπτει από διαδικασία παραγωγής, πρωταρχικός σκοπός της οποίας δεν είναι η παραγωγή της εν λόγω ουσίας ή του εν λόγω αντικειμένου και δε θεωρείται απόβλητο». Ωστόσο, στην Ευρώπη ο παραπάνω ορισμός δεν έχει κάποια νομική αξία, καθότι δεν υπάρχει εναρμονισμένη νομοθεσία σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης που να καθορίζει ξεκάθαρα τον ορισμό και την κατηγοριοποίηση των παραπροϊόντων ('European Commission, Official Website' n.d.).

Κατά την επεξεργασία των τροφίμων, προκύπτει ένα μεγάλο ποσοστό αποβλήτων ή και παραπροϊόντων που αγγίζει το 38% περίπου της συνολικής παραγωγής (Helkar and Sahoo 2016). Η μη αξιοποίηση τους επιφέρει περιβαλλοντικές, κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις. Όσον αφορά το περιβάλλον, οι βιομάζες που παράγονται και δεν χρησιμοποιούνται καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής, δημιουργώντας σοβαρά προβλήματα εξαιτίας της μικροβιακής αποσύνθεσης και της απελευθέρωσης τοξικών ουσιών, οι οποίες μπορούν να διαρρεύσουν στο έδαφος, τα υπόγεια νερά ή τα υδάτινα συστήματα, απειλώντας την υγεία των οργανισμών και των οικοσυστημάτων. Επίσης, προκαλούνται πολλές εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ενώ υψηλός είναι ο κίνδυνος πρόκλησης πυρκαγιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζεται η διαδικασία της καύσης για να αφαιρεθούν οι μύκητες και τα παράσιτα (Torres-León et al. 2018). Στον οικονομικό τομέα, παρατηρούνται οικονομικές απώλειες για τις επιχειρήσεις που σχετίζονται με την διαχείριση των στερεών αποβλήτων, σε χώρους υγειονομικής ταφής, καθώς επίσης και των μεγάλων ποσοτήτων διαφορετικών αποικοδομήσιμων υλικών. Τα παραπροϊόντα από την στιγμή που δε θα αξιοποιηθούν, αναγκάζουν τις βιομηχανίες να αναζητήσουν τρόπους απόρριψής τους. Αυτό συνεπάγεται, επιπρόσθετα έξοδα και απώλεια οικονομικών πόρων που θα μπορούσαν

να διοχετευτούν σε άλλες δραστηριότητες. Επιπλέον, χάνονται πολύτιμες πρώτες ύλες (π.χ. πούλπες, σπόροι, φλούδες) που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν και να οδηγήσουν στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. ζωοτροφές και βιοκαύσιμα). Ακόμη, σε μια εποχή που η βιωσιμότητα και η αειφορία γίνονται όλο και πιο σημαντικές για τους καταναλωτές, οι επιχειρήσεις που εκμεταλλεύονται τα παραπροϊόντα και προσφέρουν προϊόντα με μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα μπορούν να έχουν πλεονέκτημα έναντι των ανταγωνιστών τους. Σε κοινωνικό επίπεδο, οι συνέπειες λαμβάνουν μια ηθική διάσταση στο πλαίσιο της παγκόσμιας επισιτιστικής ασφάλειας, αφού 805 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο υποφέρουν από πείνα. Η αξιοποίηση των παραπροϊόντων μπορεί να αποτελέσει μια λύση για τη μείωση των απωλειών τροφίμων (food loss) και την αύξηση της διαθεσιμότητας τροφής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι φλοιοί και οι σπόροι. Αντί να απορρίπτονται ή να εκλύονται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή άλλων τροφίμων ή προϊόντων (π.χ. λάδι και αλεύρι) (Torres-León et al. 2018).

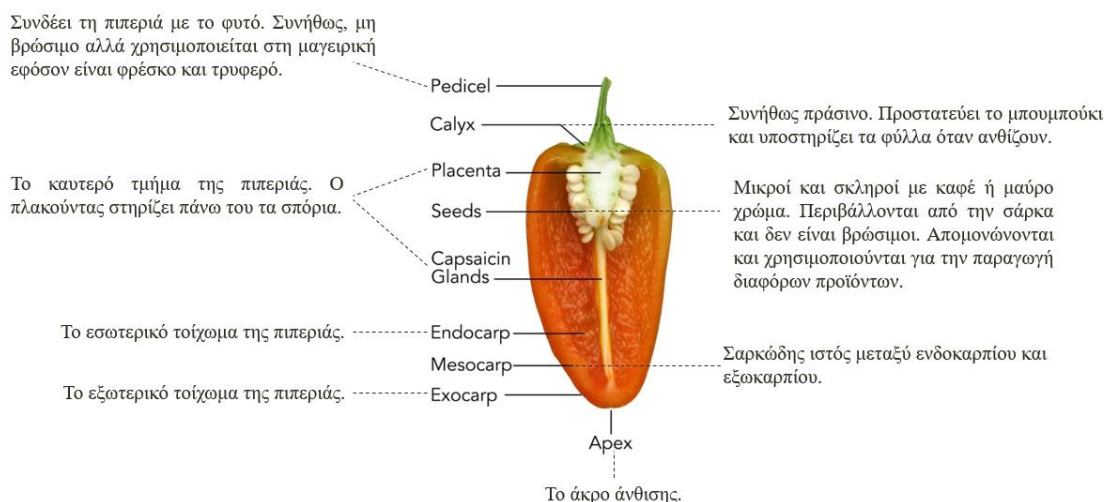
Τα παραπάνω μειονεκτήματα μπορούν να περιοριστούν ή και να εξαλειφθούν με την εκμετάλλευση των παραπροϊόντων τροφίμων και να προσφέρουν οφέλη στους προαναφερόμενους τομείς. Αρχικά, η μείωση στις ποσότητες απορριμμάτων που καταλήγουν σε χωματερές (φλούδες, πούλπες, σπόροι) και η χρήση τους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή νέων προϊόντων θα συνεισφέρει αποτελεσματικά στον περιορισμό της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Με αυτόν τον τρόπο, οι επιχειρήσεις αποκτούν μια ανεξάντλητη πρώτη ύλη στο πλαίσιο της παραγωγικής διαδικασίας ελαχιστοποιώντας το κόστος για την απόκτηση της. Ακόμη, τα συστατικά που εμπεριέχονται στα διάφορα παραπροϊόντα (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, βιοδραστικές ενώσεις) είναι ευεργετικά για την υγεία (Torres-León et al. 2018).

Στις μέρες μας, οι καταναλωτές στρέφονται σε έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής, που φαίνεται και από την τάση των καταναλωτών να μην επιλέγουν τρόφιμα που περιέχουν χημικά συντηρητικά, αλλά φυσικά συστατικά. Πλέον, οι καταναλωτές δεν αρέσκονται μόνο σε ασφαλή ή θρεπτικά προϊόντα αλλά αποζητούν να είναι βιολογικά και υγιεινά. Όλα τα παραπάνω, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον στα λειτουργικά τρόφιμα, αυξάνοντας την ζήτηση στη παγκόσμια αγορά. Η ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων περιλαμβάνει την ενσωμάτωση συγκεκριμένων ενώσεων που ωφελούν την υγεία. Τα παραπροϊόντα των βιομηχανιών τροφίμων είναι άριστη πηγή των εν λόγω ενώσεων, επομένως η εκμετάλλευση και μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας αποτελεί ένα νέο στοίχημα στον

κλάδο των τροφίμων, ικανό να προσδώσει μεγάλα έσοδα στις επιχειρήσεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το παγκόσμιο μέγεθος της αγοράς λειτουργικών συστατικών αποτιμήθηκε σε 98,9 δισεκατομμύρια δολάρια το 2021 και προβλέπεται ότι θα φτάσει τα 137,1 δισεκατομμύρια δολάρια έως το 2026 (Helkar and Sahoo 2016; ‘Functional Food Ingredients Market Size, Trends, Analysis by 2026’ n.d.).

### 1.5. Παραπροϊόντα πιπεριάς (*Capsicum annuum*)

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν, διαπιστώνουμε ότι η διαχείριση και η αξιοποίηση των παραπροϊόντων αποτελεί έναν δολοαστικό και ταυτόχρονα κερδοφόρο τομέα στον οποίο οι βιομηχανίες τροφίμων αρχίζουν και στρέφουν την προσοχή τους τα τελευταία χρόνια. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εστιάζεται στην κατηγορία των φρούτων και των λαχανικών. Τα συγκεκριμένα τρόφιμα υπάρχουν σχεδόν σε κάθε διατροφή επειδή είναι καλές πηγές αμύλου, διαιτητικών ινών, πρωτεϊνών, λιπιδίων και μετάλλων. Εκτός από τη θρεπτική τους αξία, περιέχουν ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή, οι οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία. Η πιπεριά (*Capsicum annuum* L.) βρίσκει πολλές εφαρμογές στο τομέα της μαγειρικής και θεωρείται ως ένα από τα πιο σημαντικά τρόφιμα της κατηγορίας φρούτων-λαχανικών (Silva et al. 2013).



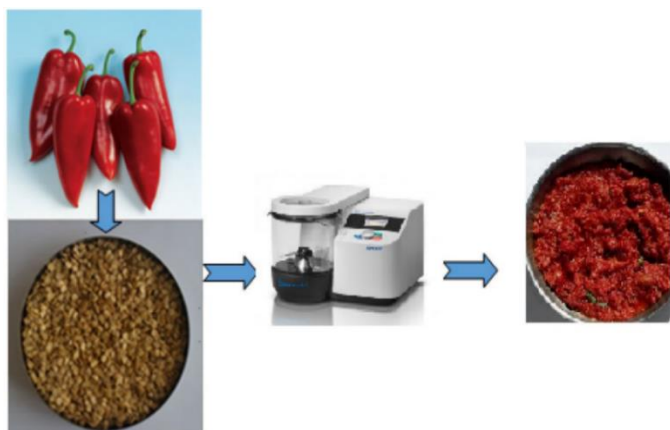
Εικόνα 1.8 Μέρη Πιπεριάς (Diane 2018)

Η Εικόνα 1.8 απεικονίζει τα διαφορετικά μέρη της πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.). Από αυτά, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι σπόροι της όσον αφορά στη δευτερογενή εκμετάλλευσή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το έλαιο από τους σπόρους της πιπεριάς που λαμβάνεται με ψυχρή σύνθλιψη (cold pressing), η διατροφική ποιότητα του οποίου μπορεί να συγκριθεί με τα ακριβότερα φυτικά έλαια στην αγορά (έλαιο καρύδας και

έλαιο άγριας τριανταφυλλιάς) (Cvetkonić, Ranilović, and Jokić 2022). Πέρα από το λάδι, μεγάλη εφαρμογή στην ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων βρίσκει και το αλεύρι από τους σπόρους της πιπεριάς. Το συγκεκριμένο προϊόν διατίθεται σε μορφή σκόνης έχοντας υποστεί άλεσμα. Η χημική του σύνθεση καταδεικνύει υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες, πρωτεΐνη και λιπίδια.

Επιπροσθέτως, καινοτόμες προσπάθειες έχουν γίνει στη παραγωγή διαφόρων ειδών σάλτσας (spreadable paste) με βάση το συγκεκριμένο αλεύρι (Cvetkonić, Ranilović, and Jokić 2022). Η σάλτσα από σοκολάτα και η σάλτσα από μελάσα σταφυλιού αποτελούν δύο καινοτόμα παραδείγματα. Η διαδικασία παραγωγής τους είναι αρκετά εύκολη και δεν απαιτείται μεγάλη προετοιμασία. Οι σπόροι συλλέγονται και έπειτα ξηραίνονται για δύο μέρες στον ήλιο. Ακολουθεί άλεσμα και στη συνέχεια η παραγωγή της επιθυμητής σάλτσας.

Χημικές αναλύσεις κατέδειξαν μεγάλη περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ και σε σημαντικότερα αντιοξειδωτικά, όπως στερόλες και τοκοφερόλες. Ακόμη, παρατηρήθηκε υψηλή αναλογία διαιτητικών ινών σε σχέση με τα υπάρχοντα διαθέσιμα εμπορικά προϊόντα. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα καινοτόμα προϊόντα προσφέρουν πλούσια διατροφικά συστατικά με πολλαπλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (Bostanci, Ok, and Yilmaz 2019). Στην ίδια φιλοσοφία, έχουν κυκλοφορήσει παρόμοιες σάλτσες οι οποίες προσφέρονται ως συνοδευτικά σε πρωινά γεύματα (breakfast sauces, Εικόνα 1.9). Οι περισσότερες έχουν ως βάση ένα μείγμα λαχανικών (μελιτζάνα, άνηθο, κρεμμύδι, πιπεριά). Ωστόσο, υπάρχουν και καυτερές σάλτσες που προκύπτουν από ανάμειξη μπαχαρικών (θυμάρι, μέντα, κύμινο, σουμάκ, κόλιανδρο, σκόρδο) σε ίση αναλογία. Σύμφωνα με μελέτες, τα παραπάνω παρασκευάσματα αποτελούν πηγή καροτενοειδών, φαινολικών, αμινοξέων, διαιτητικών ινών και μετάλλων (Bostanci, Ok, and Yilmaz 2019). (Dekebo 2020; Anaya-Esparza et al. 2021)



Εικόνα 1.9 Παραγωγή σάλτσας (breakfast sauce) από παραπροϊόντα πιπεριάς (*Capsicum annuum L.*) (Bostanci, Ok, and Yilmaz 2019)

Application	Color	Source	Bioactive Extracts or Compounds	Dose	Model Assay	Effect
Food preservation	NI	Fruit pulp	Ethanollic extract	1.5 mg/100 g	Raw beef meat	Extract help to extend the shelf life of beef meat.
	NI	Fruit pulp	NI	5% v/v	Grounded meat	Extract help to extend the shelf life of ground meat.
Natural colorant	Red	Fruit pulp	Ethanollic extract	NI	Yogurt	Capsules improve color of yogurt.
	Red	Fruit pulp	Ethanollic extract	10% w/v	Yogurt	Capsules improve sensory attributes of yogurt.
	Yellow	Fruit pulp	Ethanollic extract	0.6 g/L	Isotonic drink	Compounds improve the drink color.

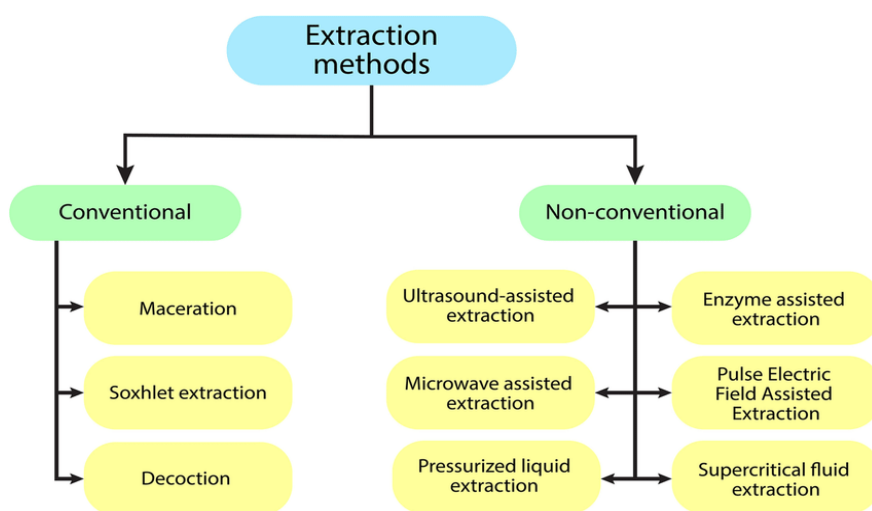
NI: no information.

Εικόνα 1.10 Εφαρμογές εκχυλισμάτων πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.) στη βιομηχανία τροφίμων (Anaya-Esparza et al. 2021)

Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν τις πολυάριθμες καινοτομίες από την χρήση διαφόρων τμημάτων της πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.) στο τομέα της βιομηχανίας τροφίμων. Η πιο σημαντική εντοπίζεται στο τομέα της συντήρησης τροφίμων. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.10. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα από τους σπόρους (εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά) χρησιμοποιούνται ως επικάλυψη (food coating) στη επιφάνεια των τροφίμων προκειμένου να αυξήσουν την διάρκεια ζωής τους (shelf-life) και κατ' επέκταση την διατηρησιμότητα τους. Η αντιμικροβιακή τους δράση εντοπίζεται στην αποτροπή ανάπτυξης της *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* και *E. coli* O157H:7 (βακτηριοκτόνος δράση των εκχυλισμάτων). Χαρακτηριστική εφαρμογή αποτελεί η προσθήκη τους σε ωμό βοδινό κρέας καθώς επίσης και σε μοσχαρίσιο κιμά (Dekebo 2020; Anaya-Esparza et al. 2021). Ακόμη, η χρήση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων ως φυσικές χρωστικές στο γιαούρτι και στα ισοτονικά ποτά βελτίωσε τη λειτουργικότητα των συγκεκριμένων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, οι βιοδραστικές ενώσεις των εκχυλισμάτων ενσωματώθηκαν στο προϊόν με την μέθοδο της ενθυλάκωσης για τη βελτίωση του χρώματος και της διατροφικής αξίας του γιαουρτιού. Ο εμπλουτισμός του με τις εν λόγω χρωστικές επηρέασε θετικά τη βιωσιμότητα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Lactic acid bacteria) κατά την αποθήκευση (Anaya-Esparza et al. 2021). Τέλος, η δημιουργία λειτουργικών ζωοτροφών από εκχυλίσματα πιπεριάς ως πρώτη ύλη ανοίγει νέους ορίζοντες στο συγκεκριμένο κλάδο. (Dekebo 2020).

## 1.6. Μέθοδοι εκχύλισης

Η εκχύλιση αποτελεί μια μέθοδο προκατεργασίας για την παραλαβή μιας ή περισσότερων ενώσεων από ένα μίγμα και την απομάκρυνση προσμίξεων. Βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Οι μέθοδοι εκχύλισης έχουν τεράστια επίδραση στον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχονται στα τρόφιμα. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.11: τις συμβατικές (conventional extraction methods) και τις μη συμβατικές (non-conventional extraction methods) μεθόδους εκχύλισης (Ligor et al. 2018).

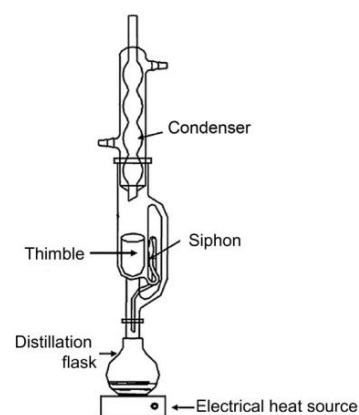


Εικόνα 1.11 Μέθοδοι εκχύλισης (Pai, Hebbar, and Selvaraj 2022)

### 1.6.1. Συμβατικές μέθοδοι (Conventional methods)

#### 1.6.1.1. Μέθοδος Soxhlet

Το δείγμα τοποθετείται σε μια δακτυλήθρα η οποία σταδιακά γεμίζει με το συμπύκνωμα φρέσκου διαλύτη που προέρχεται από μία φιάλη στην οποία βράζει. Όταν το υγρό φτάσει το επίπεδο υπερχείλισης αναρροφάται από ένα σιφώνιο και αδειάζεται πίσω στη φιάλη απόσταξης, μεταφέροντας έτσι τις εξαγόμενες αναλυόμενες ουσίες στο χύμα υγρό (Εικόνα 1.12). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί πλήρης εξαγωγή. Η συγκεκριμένη τεχνική βρίσκει εφαρμογή στην εκχύλιση λίπους από διαφορετικά

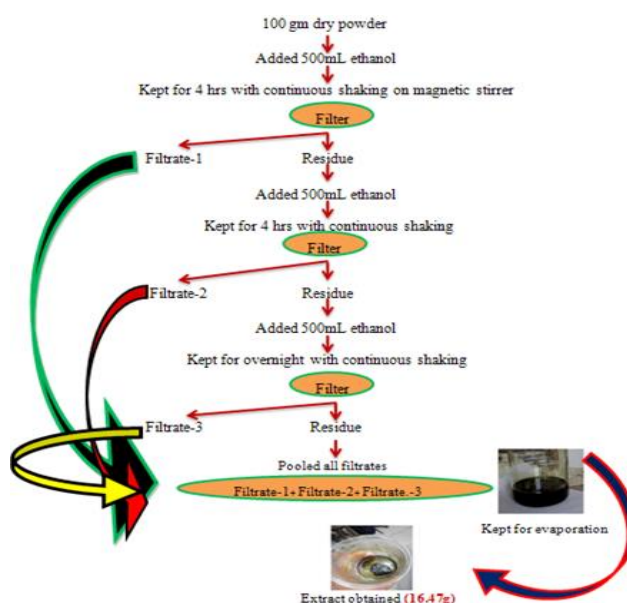


Εικόνα 1.12 Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet (Lopez-Bascon and Luque de Castro 2020)

τρόφιμα και φυσικά υποστρώματα (López-Bascón and Luque de Castro 2020).

### 1.6.1.2. Μέθοδος της διαβροχής (Maceration extraction method)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο (Εικόνα 1.13), το κονιοποιημένο στερεό υλικό ομογενοποιείται και τοποθετείται μέσα σε ένα κλειστό δοχείο. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύτη. Οι συνηθέστεροι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη. Συνήθως, προτιμάται η αιθανόλη έναντι της μεθανόλης λόγω της μικρότερης τοξικότητας. Αφήνεται επαρκής χρόνος για τη διάχυση του διαλύτη και τη πλήρη διαλυτοποίηση του προσδιοριζόμενου



Εικόνα 1.13 Μέθοδος της διαβροχής (Ayoub, Malik, and Mehta 2020)

συστατικού. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα μόνο με μοριακή διάχυση. Μετά τον επιθυμητό χρόνο, το υγρό διηθείται και το στερεό υπόλειμμα υφίσταται πίεση για να ανακτηθεί όσο το δυνατόν περισσότερος διαλύτης. Η μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων (Sridhar et al. 2021; Rasul 2018; Ligor et al. 2018).

### 1.6.1.3. Μέθοδος βρασμού (Decoction extraction method)

Η εν λόγω διαδικασία (Εικόνα 1.14) περιλαμβάνει το τεμαχισμό του δείγματος σε μικρά κομμάτια ή την κονιοποίηση του σε μορφή σκόνης και την μετέπειτα προσθήκη του σε δοχεία κονσερβών. Ακολούθως, προστίθεται νερό και η κονσέρβα υφίσταται θέρμανση. Εδώ να σημειωθεί ότι η μέθοδος δεν ενδείκνυται για ενώσεις ευαίσθητες στη θερμότητα και στο φως και η εφαρμογή της είναι αποτελεσματική σε συστατικά διαλυτά στο νερό. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται βρασμός σε χαμηλή φωτιά. Τέλος το εκχύλισμα ψύχεται και διηθείται σε καθαρά δοχεία (Rasul 2018; Sridhar et al. 2021).



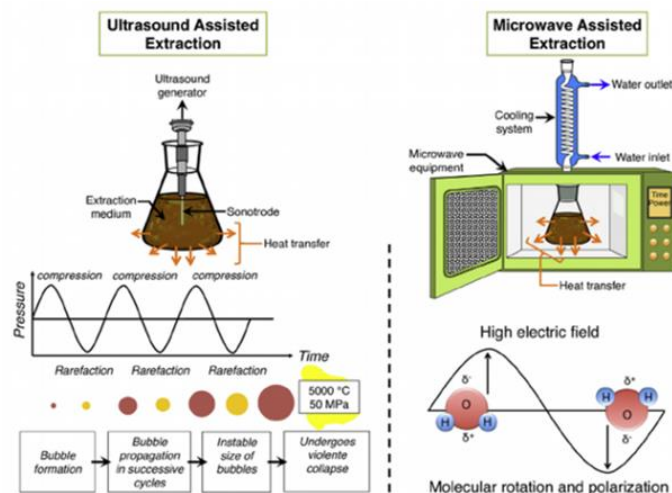
Εικόνα 1.14 Μέθοδος βρασμού (Rasul 2018)



## 1.6.2. Μη-συμβατικές μέθοδοι (Non-conventional methods)

### 1.6.2.1. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound assisted method)

Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης τεχνικής (Εικόνα 1.15) συνοψίζεται στη παρακάτω πορεία. Αρχικά, εφαρμόζονται δονήσεις μέσω υπερήχων, δημιουργώντας φυσαλίδες (φαινόμενο σπηλαιώσης) οι οποίες προκαλούν διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Με αυτόν τον τρόπο, επιταχύνεται η διείσδυση του διαλύτη στο προσδιοριζόμενο συστατικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, άμεση επαφή μεταξύ διαλύτη και ενεργών συστατικών του κυττάρου διευκολύνοντας την απελευθέρωση των τελευταίων και τη μεταφορά τους στο μέσο διάλυσης. Παραδείγματα χρήσης της εν λόγω μεθόδου συναντάμε στο βρώσιμο λάδι για την εκχύλιση των πολυφαινολών του, καθώς επίσης και σε διάφορα μέρη των φρούτων-λαχανικών (σπόροι, πούλπα, δέρμα) για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων (Sridhar et al. 2021; Geow et al. 2021; Ligor et al. 2018; Marić et al. 2018; Panja 2018; Gao et al. 2021).



Εικόνα 1.15 Εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα (Chemat et al, 2017)

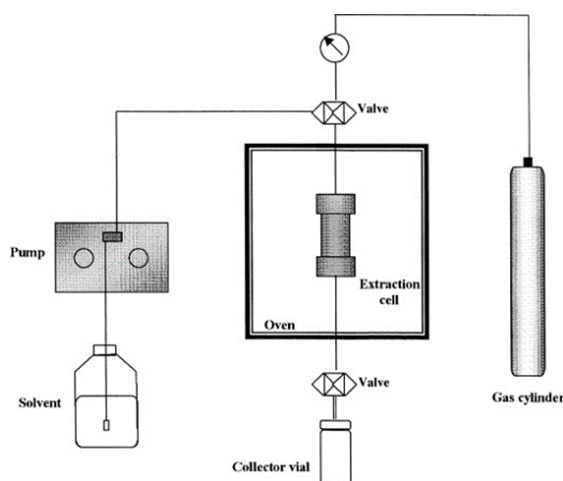
### 1.6.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction)

Όπως μαρτυρά και η ονομασία της, η συγκεκριμένη εκχύλιση βασίζεται στη χρήση μικροκυμάτων με εύρος συχνοτήτων από 300MHz έως 300 GHz (Εικόνα 1.15). Η εφαρμογή ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου οδηγεί σε μεταφορά θερμότητας και δημιουργία αγωγιμότητας, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διπολικής ροπής στα μόρια του διαλύτη ή του δείγματος. Εξαιτίας της θέρμανσης (θερμαίνεται πλήρως ολόκληρο το δείγμα) που λαμβάνει χώρα σε κλειστό δοχείο μέσω εφαρμογής ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, το παραπάνω φαινόμενο εξελίσσεται ταχύτατα. Η διαδικασία έχει μικρότερο χρόνο εκχύλισης, ελάχιστη απαίτηση διαλύτη, αυξημένη καθαρότητα εκχυλίσματος και είναι οικονομικά αποδοτικότερη

σε σχέση με τις υπόλοιπες παραδοσιακές μεθόδους. Η χρήση της έγκειται στον προσδιορισμό πολυφαινόλων, φλαβονοειδών και στεροειδών σαπώνων (Ligor et al. 2018; Panja 2018; Sridhar et al. 2021; Marić et al. 2018).

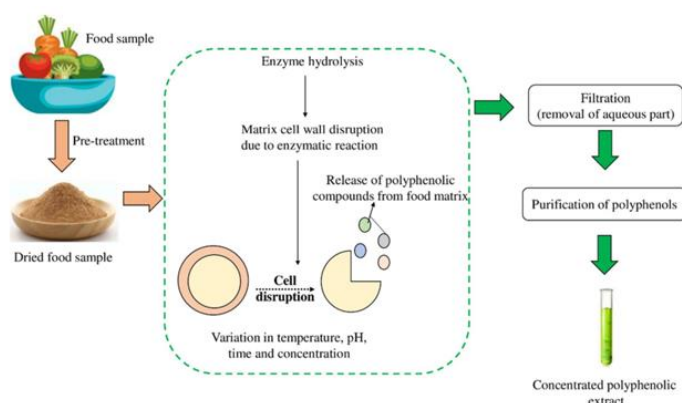
### 1.6.2.3. Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση

Η μέθοδος λειτουργεί με βάση την αρχή ότι η θερμοκρασία του σημείου βρασμού είναι ανάλογη της πίεσης (Εικόνα 1.16). Επομένως χρησιμοποιούνται διαλύτες σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, πάντα κάτω από τα αντίστοιχα κρίσιμα σημεία, ώστε ο διαλύτης να διατηρείται σε υγρή κατάσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης υπό πίεση (Pressurized liquid extraction). Η θερμοκρασία του συστήματος κυμαίνεται από 50-200°C. Υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να αποικοδομήσουν τα ενεργά βιοδραστικά συστατικά και να καταστρέψουν τις προς ανάλυση ενώσεις. Οι περισσότερες εφαρμογές της μεθόδου εστιάζουν στην ανάλυση οργανικών ρύπων στα ιζήματα και στη λυματολάσπη (Alvarez-Rivera et al. 2020; Panja 2018).



Εικόνα 1.16 Εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Alvarez-Rivera et al. 2020)

### 1.6.2.4. Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme assisted extraction)



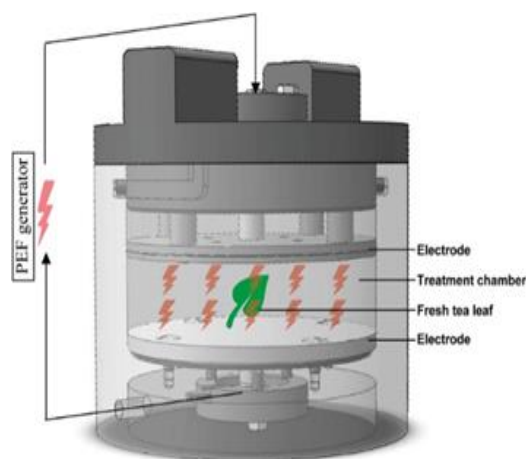
Εικόνα 1.17 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Sridhar et al. 2021)

Ο βασικός μηχανισμός της μεθόδου περιλαμβάνει τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος του υπό εξέταση συστατικού μέσω υδρόλυσης, με τη βοήθεια ενζύμου ως καταλύτη (Εικόνα 1.17). Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι οι

κυτταρινάσες, οι πηκτινάσες και συνδυασμό τους. Το ένζυμο εστιάζει στο μαλάκωμα του κυτταρικού τοιχώματος διευκολύνοντας την πρόσβαση στο μέσο διάλυσης (συνήθως νερό). Σημαντική παράμετρος είναι η θερμοκρασία η οποία πρέπει να διατηρείται χαμηλή (35-50°C). Επιπλέον, απαιτείται μεγάλη προσοχή όσον αφορά τη διατήρηση όξινου περιβάλλοντος(έλεγχος pH) καθότι η λειτουργία του ενζύμου είναι βέλτιστη σε τιμές pH<7. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της παραπάνω μεθόδου είναι η εξαγωγή πολυφαινολών που συνδέονται με πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες από τα κυτταρικά τοιχώματα (Sridhar et al. 2021; Panja 2018; Marić et al. 2018; Nadar, Rao, and Rathod 2018).

#### 1.6.2.5. Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Pulsed electric field extraction)

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση ηλεκτρικών παλμών μέτριας έντασης που οδηγεί σε ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών. Το δείγμα τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο έντασης 5-50 kV/cm μερικών μs (micro seconds) έως ms (millise seconds). Η απελευθέρωση των ενώσεων οφείλεται στους διακοπτόμενους παλμούς ηλεκτρικής ενέργειας που παράγονται κατά τη διαδικασία (Εικόνα 1.18). Χαρακτηριστική εφαρμογή της εν λόγω διαδικασίας βρίσκει η εκχύλιση πολυφαινολών και ανθοκυανινών (Panja 2018; Sridhar et al. 2021).

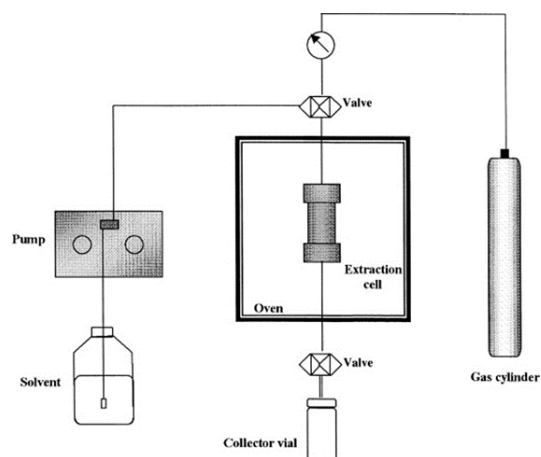


Εικόνα 1.18 Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (Liu et al. 2019)

#### 1.6.2.6. Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical fluid extraction)

Πρόκειται για μια καινοτόμα και περιβαλλοντικά φιλική τεχνική που αφορά τα υπερκρίσιμα ρευστά τα οποία έχουν χαρακτηριστικά τόσο υγρού όσο και ρευστού πάνω από την χαρακτηριστική για αυτά κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συμπεριφέρονται σαν μία ενιαία φάση διατηρώντας ταυτόχρονα τις ιδιότητες τόσο του αερίου όσο και του υγρού. Με αυτόν τον τρόπο διαχέονται στη στερεή επιφάνεια του προς εκχύλιση δείγματος σαν αέρια και απελευθερώνουν τα ενεργά συστατικά του (βιοδραστικές ενώσεις) σαν υγρά (Εικόνα 1.19). Η συγκεκριμένη μέθοδος αφορά την εκχύλιση

πολυφαινολών, καροτενοειδών και ανθοκυανινών. Συνηθέστερος διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το διοξείδιο του άνθρακα, που αποτελεί ένα μέσο αδρανές, μη εύφλεκτο και μη τοξικό) (Geow et al. 2021; Ligor et al. 2018; Panja 2018; Sridhar et al. 2021).



Εικόνα 1.19 Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (Chiew Wei et al. 2005)

### 1.6.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων εκχύλισης

Οι δύο κατηγορίες εκχυλίσεων (συμβατικές και μη), που αναφέρθηκαν, παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές. Η πρώτη εντοπίζεται στους διαλύτες. Οι μη συμβατικές τεχνικές πλεονεκτούν, καθώς οι διαλύτες που χρησιμοποιούν (νερό και υδατοαλκοολικά διαλύματα) είναι ευρέως αναγνωρισμένοι ως GRAS (Generally Recognized As Safe) χωρίς τοξική δράση και απαιτούνται μικρότεροι όγκοι τους για να επιτευχθεί η ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Αυτό σημαίνει ότι είναι αυτές οι τεχνικές είναι περιβαλλοντικά φιλικότερες περιορίζοντας τα προβλήματα των συμβατικών τεχνικών οι οποίες επιβαρύνουν το περιβάλλον αρκετές φορές εξαιτίας της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων επιβλαβών οργανικών διαλυτών. Επιπλέον, οι συμβατικές τεχνικές έχουν δύο ακόμη σημαντικά μειονεκτήματα. Το πρώτο αφορά την χρήση υψηλής θερμοκρασίας και το δεύτερο τους μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Και οι δύο αυτές παράμετροι μπορεί να οδηγήσουν σε υποβάθμιση των διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. φαινολικές ενώσεις) μέσα στο δείγμα που εξετάζεται. Για παράδειγμα, στην μέθοδο Soxhlet ο διαλύτης και το εκχύλισμα θερμαίνονται συνεχώς μέχρι το σημείο βρασμού τους απαιτώντας μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται να έχουν λιγότερες φαινολικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, οι συμβατικές τεχνικές συνεχίζουν να βρίσκουν εφαρμογή διότι είναι αναγνωρισμένες εδώ και πολλά χρόνια και έχουν αποδειχθεί αξιόπιστες και αποτελεσματικές. Επιπλέον, ο εξοπλισμός τους είναι ευρέως διαθέσιμος και λιγότερο ακριβός σε σχέση με τις εναλλακτικές μεθόδους εκχύλισης. Βέβαια, οι μη συμβατικές τεχνικές προσφέρουν υψηλότερες αποδόσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. εκχύλιση βιομάζας ή φαρμακευτικών προϊόντων) αποτελούν την μοναδική επιλογή.

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται πως οι μη συμβατικές τεχνικές αρχίζουν και κερδίζουν μεγάλο έδαφος όσον αφορά την εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα και πιθανώς στο άμεσο μέλλον να πάρουν τη θέση των συμβατικών αφού ξεπεραστούν ορισμένα μειονεκτήματα (π.χ. υψηλό κόστος εξοπλισμού και πιο πολύπλοκες διαδικασίες όσον αφορά την εκχύλιση) (Panja 2018; Osorio-Tobón 2020).

#### 1.6.4. Μέθοδοι εκχύλισης σπόρων πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.)

Οι μέθοδοι εκχύλισης που αναλύθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, βρίσκουν εφαρμογή στην ανάκτηση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων των σπόρων της πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν πολλές τεχνικές με διαφορετικά χαρακτηριστικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να τροποποιηθούν ανάλογα με τις ανάγκες και τις αναλυόμενες ενώσεις της εκάστοτε ερευνητικής μελέτης. Επιπλέον, σε κάθε μέθοδο εκχύλισης πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν οι παράμετροι οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της. Οι κυριότεροι είναι: ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, και ο διαλύτης. Ειδικότερα, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία παίζουν ίσως το πιο σημαντικό ρόλο σε μια διαδικασία εκχύλισης καθώς επηρεάζουν τη σταθερότητα μιας ένωσης. Ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης καθώς επιτρέπει την επαρκή επαφή ανάμεσα στο υλικό που εξάγεται και τον διαλύτη. Αυτό έχει αντίκτυπο στη διάχυση των επιθυμητών ουσιών από το υλικό στο διαλύτη. Μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης συνήθως οδηγεί σε αυξημένη αποδοτικότητα, ενώ μικρότερος χρόνος μπορεί να επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα. Αντίστοιχα και η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα των ουσιών στο διαλύτη. Συνήθως, η άνοδος της θερμοκρασίας αυξάνει τη διαλυτότητα, καθώς προκαλεί αύξηση της κινητικής ενέργειας των μορίων και επιτρέπει την καλύτερη αλληλεπίδρασή τους. Ακόμη, η επιλογή του διαλύτη συμβάλλει καθοριστικά στη διαδικασία της εκχύλισης. Κριτήριο επιλογής είναι η πολικότητα των εκχυλιζόμενων ενώσεων που έχουμε κάθε φορά. Έτσι, υπάρχουν διαλύτες πολικοί (π.χ. αιθανόλη) καθώς επίσης και μη πολικοί (π.χ. εξάνιο). Οι πολικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση πολικών ενώσεων όπως αμινοξέα, αλκοόλες και φαινόλες. Αντίθετα, οι μη πολικοί διαλύτες εκχυλίζουν μη πολικές ενώσεις όπως αιθέρες και αλκάνια (Osorio-Tobón 2020).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.7) παρουσιάζονται οι κυριότεροι μέθοδοι εκχύλισης σπόρων της πιπεριάς *Capsicum annuum*.

Πίνακας 1.7 Μέθοδοι εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων σπόρων πιπεριάς *Capsicum annuum* L. (Geow et al. 2021, Rasul 2018, Ligor et al. 2018, Panja 2018, Sridhar et al. 2021)

Μέθοδος Εκχύλισης	Παράμετροι	Εκχυλιζόμενες ενώσεις
Soxhlet	- Ποσότητα δείγματος - Χρόνος εκχύλισης - Ποσότητα διαλύτη - Θερμότητα	- Λιπίδια
Διαβροχή	- Ταχύτητα ανάδευσης - Χρόνος εκχύλισης	- Πολυφαινόλες
Βρασμού	- Αναλογία νερού στο δείγμα - Θερμότητα	- Υδατοδιαλυτές ενώσεις
Υπερκρίσιμων ρευστών	- Κρίσιμη θερμοκρασία - Κρίσιμη πίεση - Είδος διαλύτη	- Πτητικές ενώσεις
Υγρό υπό πίεση	- Θερμοκρασία - Διαλύτης	- Πολυφαινόλες
Μικροκύματα	- Διαλύτης - Συχνότητες μικροκυμάτων	- Πολυφαινόλες - Φλαβονοειδή
Υπέρηχοι	- Συχνότητα υπερήχων - Γεωμετρία συστήματος	- Φαινόλες - Λιπίδια - Χλωροφύλλες - Καροτενοειδή
Ενζυμικά υποβοηθούμενη	- Είδος, συγκέντρωση, αναλογία ενζύμου - Θερμοκρασία - Μέγεθος σωματιδίων - pH - Διαλύτης	- Πολυφαινόλες - Πρωτεΐνες - Πολυσακχαρίτες - Χρωστικές
Παλμικών ηλεκτρικών πεδίων	- Ένταση ηλεκτρικού πεδίου - Διάρκεια και αριθμός παλμών	- Φυτοστερόλες - Πολυφαινόλες - Ανθοκυανίνες

## 1.7. Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού (Design Of Experiments)

Τα μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiments, DOE) αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο στατιστικής που χρησιμοποιείται σε διάφορες περιπτώσεις. Ειδικότερα, συμβάλουν στη βελτιστοποίηση διαδικασιών, όπως η εκχύλιση, μέσω της ανάλυσης και της αξιολόγησης διαφορετικών παραγόντων επίδρασης σε αυτή. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει πρόβλεψη της απόδοσης μιας διαδικασίας καθώς και εύρεση των πιθανών βέλτιστων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση του επιθυμητού αποτελέσματος. Επιπροσθέτως, ο πειραματικός σχεδιασμός μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων προϊόντων (π.χ. σχεδιασμός αντλίας για χορήγηση φαρμάκου) μέσω της αξιολόγησης διαφόρων παραμέτρων, όπως η διάμετρος του κυλίνδρου και το μήκος του εμβόλου. Ακόμη, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διάφορων παραγόντων που επηρεάζουν μια διαδικασία. Αυτό μπορεί να αποκαλύψει πολύπλοκες συσχετίσεις και να βοηθήσει στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών που τη διέπουν. Τέλος, στον ερευνητικό κυρίως κλάδο μπορεί να γίνει εξοικονόμηση χρόνου και πόρων καθότι μειώνεται ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων για την αξιολόγηση διαφόρων παραμέτρων και έτσι δύναται να προσδιοριστούν και να εκτιμηθούν ταχύτερα οι επιδράσεις τους στο τελικό αποτέλεσμα μια διαδικασίας. Τα πιο γνωστά πειραματικά μοντέλα με ευρεία χρήση είναι τα μοντέλα μερικού παραγοντικού σχεδιασμού (Fractional Factorial Design) και τα μοντέλα πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού (Full Factorial Design). Για την ανάλυση και την σχεδίαση ενός πειραματικού μοντέλου απαιτείται κατάλληλο στατιστικό λογισμικό. Για το σκοπό αυτό, υπάρχουν ορισμένα εμπορικά πακέτα στατιστικών λογισμικών. Τα πιο συνηθισμένα είναι το Minitab, Statistica, SPSS, SAS, Design-Expert, Statgraphics, Prisma (Durakovic 2017; Jankovic, Chaudhary, and Goia 2021).

Ας υποθέσουμε ότι ένας βιοϊατρικός μηχανικός σχεδιάζει μια αντλία για ενδοφλέβια χορήγηση ενός φαρμάκου. Η αντλία θα πρέπει να παρέχει σταθερή δόση από το εν λόγω φάρμακο σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο. Για τον σκοπό αυτό πρέπει να καθοριστεί ένας αριθμός μεταβλητών ή παραμέτρων. Μερικές από αυτές είναι η διάμετρος και το μήκος του κυλίνδρου, η εφαρμογή μεταξύ κυλίνδρου και εμβόλου, το μήκος του εμβόλου, η διάμετρος και το πάχος τοιχώματος του σωλήνα που συνδέει την αντλία κ.α. Η επίδραση των συγκεκριμένων παραμέτρων στον σχεδιασμό της αντλίας μπορεί να αξιολογηθεί με την δημιουργία προτύπων στα οποία οι παραπάνω παράγοντες μπορεί να ποικίλουν σε διάφορα

εύρη. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται πειράματα και τα πρότυπα δοκιμάζονται προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες παράμετροι για την μεγαλύτερη απόδοση της αντλίας. Τέλος, ο μηχανικός αναλύει τις πληροφορίες που προέκυψαν προκειμένου να κατασκευάσει μια συνεπή και αξιόπιστη αντλία (Montgomery 2017).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.8) παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα εφαρμογής πειραματικών μοντέλων για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα διαφόρων τροφίμων.

Πίνακας 1.8 Παραδείγματα εφαρμογής μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού σε παραπροϊόντα τροφίμων

Παραπροϊόν	Μέθοδος εκχύλισης	Εκχυλιζόμενες ενώσεις	Μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού	Αναφορά
<b>Φλούδα μάνγκο</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>① Διαβροχή</li> <li>② Εκχύλιση με υπερήχους</li> </ol>	Φαινολικές ενώσεις με κυριότερες: γαλλικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, επικατεχίνες	Μοντέλο ελαχίστου τετραγώνου (least square design)	(Safdar, Kausar, and Nadeem 2017) (Sridhar et al. 2021)
<b>Σπόροι μύλου</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>① Soxhlet</li> <li>② Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών</li> </ol>	Φαινολικές ενώσεις με κυριότερες: trans φερουλικό οξύ, ναρινγκινίνη, αμυγδαλίνη	Μοντέλο επιφανειακής απόκρισης (response surface Design Expert 8.0.4)	(Ferrentino et al. 2020) (Sridhar et al. 2021)
<b>Πράσινο τσάι</b>	Εκχύλιση με μικροκύματα	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, ολική περιεκτικότητα φλαβονοειδών, συμπυκνωμένη περιεκτικότητα ταννινών	Face-centered central composite design (CCD)	(Sridhar et al. 2021) (Taşkın and Aksoylu Özbek 2020)
<b>Φλούδα πορτοκαλιού και λεμονιού</b>	Εκχύλιση με διαβροχή	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, ολική περιεκτικότητα φλαβονοειδών	Factorial design	(Sridhar et al. 2021) (Gómez-Mejía et al. 2019)



<b>Φύλλο δυόσμου</b>	Εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών	Φλαβονοειδή με κυριότερα: κατεχίνη, ρουτίνη, απιγενίνη	Complete randomized design (CRD) full factorial	(Sridhar et al. 2021)  (Bimakr et al. 2011)
--------------------------	-------------------------------------	--	--	---

### 1.8. Αλκοολούχα ποτά ως διαλύτες/εκχυλιστικά μέσα

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τροφίμων στρέφεται στη χρήση βρώσιμων διαλυτών (edible solvents) στις διάφορες μεθόδους εκχύλισης. Παρότι δεν έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς έρευνες, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αξιοποίηση τους αποφέρει σημαντικά οφέλη. Το πιο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα σε σχέση με τους κλασικούς οργανικούς διαλύτες εντοπίζεται στο γεγονός ότι δεν απαιτούνται περαιτέρω επεξεργασίες (π.χ. απομάκρυνση διαλύτη λόγω τοξικότητας) αν τα εκχυλίσματα προορίζονται να προστεθούν στα τρόφιμα (Ortinero et al. 2021).

Τα αλκοολούχα ποτά περιέχουν μεγάλες ποσότητες αιθανόλης (40-50%). Έχοντας αυτό ως δεδομένο και γνωρίζοντας ο ένας από τους πιο διαδεδομένους διαλύτες για εκχύλιση είναι η αιθανόλη, εγείρεται ένα σημαντικό ερώτημα. Θα μπορούσαν άραγε τα αλκοολούχα αποστάγματα να χρησιμοποιηθούν ως βρώσιμοι διαλύτες αντικαθιστώντας τους συμβατικούς που μέχρι σήμερα γνωρίζαμε; Για να δοθεί απάντηση θα πρέπει να εξεταστούν κάποια δεδομένα. Η αιθανόλη ή αλλιώς αιθυλική αλκοόλη έχει υψηλή διαλυτική ικανότητα για πολλές χημικές ενώσεις, όπως αλδεΐδες, αιθέρες και αμίνες, και όταν η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη από 20%, αποτρέπει την ανάπτυξη μούχλας και βακτηρίων. Συνεπώς, διαθέτει αντιμικροβιακή δράση και είναι ασφαλής για χρήση σε τρόφιμα (food grade) ('Different Methods of Extraction Pharmaceuticals Notes | The Pharmapedia' 2022). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, η αντιοξειδωτική δράση της αιθανόλης βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με άλλους ευρέως χρησιμοποιούμενους διαλύτες (μεθανόλη και ακετόνη) (Sharif and Bennett 2016; Mohammad Salamatullah et al. 2022).

Τα αλκοολούχα αποστάγματα αποτελούν υδατοαιθανολικά διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (40%). Έρευνες έχουν δείξει ότι τέτοιου είδους δυαδικά μείγματα (αιθανόλης-νερού) έχουν συνεργιστική δράση και μεγιστοποιούν την απόδοση της εκχύλισης. Το νερό διαλύει τις πολικές ενώσεις και ο οργανικός διαλύτης ανακτά τα λιγότερο πολικά συστατικά. Επιπροσθέτως, η δράση τους δεν είναι τοξική και ενδείκνυται για

εφαρμογές σε τρόφιμα (Lim et al. 2019). Η μελέτη των C. Ortinero et al. σε οινοπνευματώδη ποτά, όπως η βότκα, το τζιν και η τεκίλα, έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική δράση. Τα εν λόγω αποστάγματα φάνηκαν να έχουν την ίδια ή και ακόμη καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με καθαρή αιθανόλη για την εκχύλιση των παραπάνω βιοδραστικών ενώσεων. Αυτό μπορεί να οφείλεται και σε άλλα συστατικά που περιέχουν. Ακόμη, βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση αιθανόλης για μέγιστη απόδοση εκχύλισης είναι μεταξύ 45-50% (w/w). Με δεδομένο ότι τα διάφορα αποστάγματα (τσίπουρο, ούζο, βότκα, κτλ.) περιέχουν παρόμοιους αλκοολικούς βαθμούς αλλά και με όσα προαναφέρθηκαν, συμπεραίνουμε ότι η χρήση τους ως διαλύτες αποτελεί ένα νέο στοίχημα για την επιστήμη των τροφίμων (Ortinero et al. 2021). Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής έγινε προσπάθεια αξιοποίησης του τσίπουρου ως διαλύτη για την μελέτη του φαινολικού περιεχομένου και της αντιμικροβιακής δράσης των σπόρων της πιπεριάς (*Capsicum annuum*).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1. Υγεία και τρόφιμο

Η μικροβιολογία τροφίμων αποτελεί έναν σημαντικό κλάδο μελέτης της επίδρασης των διαφόρων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Η γνώση και η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους αυτοί αλληλοεπιδρούν στα τρόφιμα είναι πολύ σημαντική όσον αφορά τον τομέα της ασφάλειας και της καταλληλότητας ενός προϊόντος που διατίθεται προς κατανάλωση στο ευρύ κοινό. Επομένως, ανάλογα με τη δράση τους μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: τους αλλοιογόνους, τους παθογόνους και τους ωφέλιμους. Αναλυτικά, οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (π.χ. *Pseudomonas spp*, *Psychrobacter spp*) μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα τρόφιμα ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, επηρεάζοντας την ποιότητα των τροφίμων και προκαλώντας τους διάφορες αλλοιώσεις. Τα αλλοιωμένα τρόφιμα χαρακτηρίζονται από αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, οι οποίες τα καθιστούν μη αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς όμως να προξενούν τυχόν ασθένειες. Ωστόσο, στην περίπτωση των παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, διαπιστώνουμε σοβαρές ασθένειες που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στο θάνατο. Τέλος, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί (π.χ. οξυγαλακτικά βακτήρια, *S. cerevisiae*) παράγουν χρήσιμες ουσίες π.χ. αιθυλική αλκοόλη, βύνη) σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες, όπως η ζύμωση (Sevindik and Uysal 2021).

### 2.2. Κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών στα τρόφιμα

#### 2.2.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία που ευθύνεται για την αλλοίωση των τροφίμων. Παρότι εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι αδρανοποίησης τους (π.χ. θέρμανση), τα βακτήρια διαθέτουν σπόρια που τους επιτρέπουν να αντέχουν σε αντίξοες συνθήκες. Για παράδειγμα, τα Gram θετικά βακτήρια (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) μπορούν να αναπτύσσονται τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες, και μάλιστα μερικά από αυτά, μπορούν να αντέξουν και σε υψηλές θερμοκρασίες (55°C). Επιπλέον, πολλά αναερόβια βακτήρια μπορούν να παράγουν υδρόθειο (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) κατά την ανάπτυξη τους σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα που αποθηκεύονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Βακτήρια που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος προκαλούν διαφορετικές

αλλοιώσεις, όπως πρόωρο φούσκωμα τυριού (*Clostridium spp.*) ή παραγωγή βουτυρικού οξέος σε κονσέρβες φρούτων και λαχανικών (*Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*). Αντίθετα, βακτήρια που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες παράγουν αέρια με δυσώδεις οσμές και αλλοιώνουν προϊόντα κρέατος, τουρσιά και αποξηραμένα τρόφιμα (*Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus spp.*). Τα κυριότερα γένη που συμβάλουν στην αλλοίωση των προϊόντων είναι: *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia spp.* (Sevindik and Uysal 2021).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) παρατίθενται τα κυριότερα γένη βακτηρίων που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων.

Πίνακας 2.1 Κυριότερα γένη βακτηρίων που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016)

Γένος	Τρόφιμο	Χαρακτηριστικά	Πηγές
<b>Staphylococcus</b>	- Κρεατοσκευάσματα - Πουλερικά - Ψάρια - Γαλακτοκομικά - Μαγιονέζα	- Gram+ - Κόκκος - Δυνητικά αναερόβιο	- Προσωπικό
<b>Clostridium</b>	- Sous-vide - Κονσερβοποιημένα και συσκευασμένα σε κενό τρόφιμα (χαμηλής και μέσης οξύτητας)	- Gram+ - Αναερόβιο σπορογόνο ραβδίο	- Έδαφος - Αέρας-Σκόνη
<b>Bacillus</b>	-Κρεατοσκευάσματα -Ρύζι -Γαλακτοκομικά -Καρυκεύματα	- Gram+ - Αερόβιο σπορογόνο ραβδίο	- Έδαφος - Αέρας-Σκόνη
<b>Listeria</b>	- Μαλακά τυριά - Νωπό και παστεριωμένο γάλα - Νωπά λαχανικά - Πουλερικά - Αλιεύματα	- Gram+ - Μη σπορογόνο ραβδίο - Αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο	- Φυτά - Φυτικά προϊόντα
<b>Salmonella</b>	- Κρέας - Αυγά - Πουλερικά	- Gram - - Μη σπορογόνο ραβδίο	- Εντερική οδός - Ζωοτροφές

		- Αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο	
<b>Campylobacter</b>	- Νωπό γάλα - Κοτόπουλο	- Gram – - Ελικοειδή ραβδίο - Αναερόβιο	- Εντερική οδός
<b>Escherichia</b>	- Βοδινός κιμάς - Γάλα	- Gram – - Ραβδόμορφο	- Εντερική οδός

### 2.2.2 Ζύμες - Μύκητες

Οι μύκητες αναπτύσσονται με τη μορφή νηματοειδούς μάζας που εξαπλώνεται αρκετά γρήγορα. Η συνολική μάζα ή το μεγαλύτερο τμήμα της που παράγεται από έναν μύκητα ονομάζεται μυκήλιο, το οποίο αποτελείται από διακλαδώσεις ή νημάτια (υφές). Οι μύκητες που αναπαράγονται με σπόρια αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα αλλοίωσης των τροφίμων, καθώς η ικανότητα τους να απλώνονται σε οποιαδήποτε επιφάνεια κάτω από διαφορετικές συνθήκες εντείνει τον κίνδυνο υποβάθμισης ενός προϊόντος. Μάλιστα, εκτός από αλλοιώσεις, ορισμένα είδη μυκήτων (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) παράγουν μυκοτοξίνες που μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες (εντερικές διαταραχές, αλλεργίες, ανοσοκαταστολή, καρκίνος). Πιο συγκεκριμένα, οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων και αν καταναλωθούν από τον άνθρωπο ή τα ζώα παρουσιάζουν τοξική δράση. Ωστόσο, αρκετοί μύκητες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για διάφορες διεργασίες τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και σε αυτήν των φαρμάκων. Για παράδειγμα, ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί έναν ευρέως γνωστό μύκητα ο οποίος χρησιμοποιείται στις διαδικασίες αρτοποιήσεως (π.χ. παραγωγή άρτου) (Sevindik and Uysal 2021; Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2) παρατίθενται τα κυριότερα γένη ζυμών και μυκήτων που συμμετέχουν στην αλλοίωση των τροφίμων.

Πίνακας 2.2 Κυριότερα γένη ζυμών-μυκήτων που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016)

Γένος	Τρόφιμο	Χαρακτηριστικά	Τύπος Αλλοίωσης
<b>Botrytis</b>	-Φρούτα (μήλα, αχλάδια, φράουλες)	-Γκρίζα κονίδια που φέρουν διαφράγματα	-Γκρίζα σήψη
<b>Penicillium</b>	-Φρούτα -Συμπυκνωμένοι χυμοί	-Ασκοσπόρια -Παραγωγή γαλαζοπράσινων χρωστικών στα τρόφιμα	-Γαλάζια ή Πράσινη σήψη
<b>Fusarium</b>	-Εσπεριδοειδή -Κριθάρι, Σιτάρι	-Παραγωγή ροζ, κόκκινου ή καφέ μυκηλίου -Κονίδια που φέρουν διαφράγματα -Ορισμένα είδη παράγουν μυκοτοξίνες	-Καφέ σήψη
<b>Geotrichum</b>	-Εσπεριδοειδή -Κρέμα γάλακτος	-Υφές που φέρουν διαφράγματα -Προσδίδει αρωματικές ουσίες σε πολλά είδη τυριών	-Σήψη
<b>Aspergillus</b>	-Μπέικον -Εσπεριδοειδή -Αραβοσιτέλαιο	-Παράγει αλυσίδες κονιδίων -Κίτρινα, Πράσινα ή μαύρα μυκήλια	-Μαύρη σήψη
<b>Debaryomyces</b>	-Γαλακτοκομικά προϊόντα	-Μερικές φορές παράγει ψευδομυκήλιο -Αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl 24% και $a_w \geq 0,65$	-Σχηματισμός γλοιώδους ουσίας
<b>Zygosaccharomyces</b>	-Διάφορες σάλτσες (μαγιονέζα)	-Αναπαράγεται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις και ασκοσπόρια -Ζυμώνει σάκχαρα	-Αλλοίωση στη μαγιονέζα

### 2.2.3 Ιοί

Οι ιοί είναι μια ομάδα μικροοργανισμών με πολύπλοκες δομές, των οποίων η παρουσία στα τρόφιμα συνδέεται με διάφορες ασθένειες. Μερικές μπορεί να είναι απλές (π.χ. διάρροια), ενώ άλλες μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα και να απειλήσουν την υγεία ή και τη ζωή του ανθρώπου (π.χ. ηπατικές νόσοι). Η ανάπτυξη τους γίνεται μέσα στα κύτταρα του εντέρου και στη συνέχεια απελευθερώνονται μέσω των κοπράνων. Η μόλυνση σε άτομα μέσω κατανάλωσης τροφίμων οφείλεται συνήθως σε κακές πρακτικές υγιεινής μέσω των χειριστών. Για παράδειγμα, ένας χειριστής σε μια διεργασία μεταχειρίζεται ένα τρόφιμο χωρίς να έχει πλύνει τα χέρια του μετά τη χρήση της τουαλέτας. Εάν αυτό το άτομο έχει κάποιο ιικό φορτίο θα μεταδοθεί στο προϊόν και μετέπειτα στον άνθρωπο που θα το καταναλώσει. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιοί ως παρασιτικοί οργανισμοί δεν αναπτύσσονται στα τρόφιμα αλλά τα χρησιμοποιούν ως φορέα (Sevindik and Uysal 2021; Κουτζεκιδου-Ρούκα Π. 2016)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3) παρατίθενται οι κυριότεροι τύποι ιών που συμμετέχουν στην αλλοίωση τροφίμων.

Πίνακας 2.3 Κυριότεροι τύποι ιών που συμμετέχουν στην παθογένεια των τροφίμων (Lorenzo et al. 2018)

Τύπος	Τρόφιμο	Χαρακτηριστικά	Συμπτώματα
<b>Norwalk</b>	-Φυλλώδη λαχανικά -Φρέσκα φρούτα -Οστρακόδερμα	-Ανήκει στην οικογένεια των calicivirus -Χρόνος επώασης: 48 ώρες -Σχήμα: Κυανή σφαίρα	-Ναυτία -Εμετός -Διάρροια -Στομαχόπονος
<b>Hepatitis A</b>	-Φρούτα -Λαχανικά -Οστρακόδερμα -Νερό	-Ανήκει στην οικογένεια των picornaviridae -Αποτελείται από ένα μόριο RNA -Χρόνος επώασης: 15 με 50 μέρες μετά την επαφή με τον ιό	-Πυρετός -Διάρροια -Ναυτία -Εμετός -Πόνος στην άνω δεξιά περιοχή της κοιλίας
<b>Hepatitis E</b>	-Νερό -Ωμό χοιρινό -Κρέας από ελάφι -Οστρακόδερμα	-Χρόνος επώασης: 15 με 60 μέρες	-Εμετός -Πυρετός -Διάρροια

### 2.3. Προβλήματα αλλοίωσης τροφίμων και τρόποι αντιμετώπισης

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί το μεγαλύτερο στοίχημα για κάθε βιομηχανία. Η νομοθεσία που αφορά στον συγκεκριμένο κλάδο είναι πολύ αυστηρή σε τέτοια ζητήματα και απαιτεί ανάλογη συμμόρφωση από οποιαδήποτε εταιρεία που δραστηριοποιείται με την παραγωγή, μεταποίηση και διανομή τροφίμων. Παρόλα αυτά, μερικές φορές παρατηρούνται φαινόμενα αλλοίωσης τα οποία, όπως είναι αναμενόμενο, έχουν δυσμενείς συνέπειες τόσο για τους καταναλωτές όσο και για τις βιομηχανίες. Ένα τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο όταν έχει υποστεί μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και ως εκ τούτου χαρακτηρίζεται μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση. Πρόκειται κυρίως για αλλαγές στην εμφάνιση, γεύση, όσφρηση και υφή που οφείλονται σε μεταβολικές διεργασίες και γίνονται εύκολα αντιληπτές με τις ανθρώπινες αισθήσεις. Ωστόσο, η κατανάλωση τους δεν οδηγεί σε ασθένειες καθότι η αλλοίωση δεν οφείλεται σε παθογόνους μικροοργανισμούς και, συνεπώς, δεν παράγονται τοξίνες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας (Sahu and Bala 2017; P. Zhao et al. 2022).

Η αλλοίωση των τροφίμων επηρεάζει μια σημαντική παράμετρο γνωστή και ως διάρκεια ζωής του προϊόντος (shelf-life). Ο ορισμός αυτός αναφέρεται στη χρονική περίοδο κατά την οποία ένα τρόφιμο παραμένει σταθερό και διατηρεί τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Πολλά προϊόντα διατροφής είναι ευπαθή από την φύση τους και χρειάζονται προστασία από φαινόμενα αλλοίωσης τόσο κατά την διάρκεια της παρασκευής, αποθήκευσης αλλά και διανομής τους. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις η μονάδα παραγωγής βρίσκεται μακριά από τον τόπο διάθεσης και πώλησης. Για αυτό τον λόγο, η ανάγκη για εκτεταμένη διάρκεια ζωής ενός τροφίμου έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ως εκ τούτου, πολλές μέθοδοι συντήρησης προϊόντων έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να εξυπηρετηθεί η παραπάνω ανάγκη. Ενδεικτικά παραδείγματα συστημάτων συντήρησης που θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο τροφικής υποβάθμισης ή δηλητηρίασης είναι: η θερμική επεξεργασία, η ψύξη και η κατάψυξη. Ωστόσο, χρειάζεται μεγάλη προσοχή καθότι οι εν λόγω τεχνικές έχουν συσχετισθεί με ανεπιθύμητες μεταβολές στα τρόφιμα, όπως αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και απώλεια των θρεπτικών συστατικών. Η απαίτηση των καταναλωτών για ασφαλή, εύγευστα και φυσικά προϊόντα έχει ωθήσει τις βιομηχανίες στην αντικατάσταση των παραδοσιακών τεχνικών συντήρησης με νέες καινοτόμες (π.χ. τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ακτινοβολήση) (Sahu and Bala 2017).



Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.4) παρατίθενται οι κυριότερες μέθοδοι συντήρησης τροφίμων.

Πίνακας 2.4 Κυριότερες μέθοδοι συντήρησης τροφίμων (Zhao et al. 2022, Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016, Petruzzi et al. 2017)

Μέθοδος	Χαρακτηριστικά
<b>Παστερίωση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Όξινα τρόφιμα (pH&lt;4,6) και χαμηλής οξύτητας (pH&gt;4,6) που ακολουθούνται από ψύξη</li> <li>-Επέκταση διάρκεια ζωής για λίγες εβδομάδες</li> <li>-Απενεργοποίηση παθογόνων βακτηρίων</li> <li>-Εφαρμογή HTST* ( 72°C για 15 δευτερόλεπτα)</li> <li>-Διατήρηση παστεριωμένων τροφίμων σε χαμηλές θερμοκρασίες</li> </ul>
<b>Αποστείρωση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Χαμηλής οξύτητας τρόφιμα (pH&gt;4,6)</li> <li>-Απενεργοποίηση σπόρων</li> <li>-Επέκταση διάρκειας ζωής για μήνες</li> <li>- Εφαρμογή 121°C για 15 λεπτά</li> </ul>
<b>Κονσερβοποίηση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Όξινα τρόφιμα (pH&lt;4,6) και χαμηλής οξύτητας (pH&gt;4,6)</li> <li>-"Εμπορική αποστείρωση"*</li> <li>-Καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών</li> <li>-Σπόρια που επιβιώνουν δεν αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες αποθήκευσης</li> <li>- Θέρμανση στους 121°C για 3-6 λεπτά</li> </ul>
<b>Αφυδάτωση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Μείωση υγρασίας του τροφίμου (aw*) μέχρι του σημείου στο οποίο αναστέλλεται η δράση των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών</li> <li>-Κυριότερη μέθοδος: ξήρανση</li> <li>-Συντήρηση αφυδατωμένων προϊόντων* για μεγάλο χρονικό διάστημα (εφόσον θερμοκρασία και aw παραμένουν σταθερά)</li> </ul>
<b>Ζύμωση</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών (LAB*) να αναστέλλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών</li> <li>-Η συντήρηση βασίζεται στα τελικά προϊόντα της οξειδωσης των υδατανθράκων (πχ αλκοόλη) τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη ορισμένων αλλοιογόνων μικροοργανισμών</li> <li>-Ικανότητα συντήρησης: Πλήρης μετατροπή σακχάρων σε γαλακτικό οξύ δίνει δυνατότητα συντήρησης για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς ανάγκη για θερμική επεξεργασία</li> </ul>
<b>Τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Συντήρηση τροφίμων σε περιβάλλον ελεγχόμενης ατμόσφαιρας με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αερίων (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>)</li> <li>-O<sub>2</sub>: Σημαντική επίδραση σε οξειδωτικές μεταβολές, ο περιορισμός οξυγόνου αποτρέπει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών</li> </ul>

	<p>-CO<sub>2</sub>: Αντιμικροβιακή δράση (προσρόφηση CO<sub>2</sub> στην επιφάνεια του τροφίμου, σχηματισμός ανθρακικού οξέος με αποτέλεσμα την μείωση του pH), ανασταλτική δράση( παράταση της φάσης προσαρμογής και του χρόνου κυτταρικής διαίρεσης των μικροοργανισμών)</p> <p>-N<sub>2</sub>: Αδρανές αέριο (χρήση ως γεμιστικό αέριο)</p>
<b>Ακτινοβολία</b>	<p>-Ακτινοβολίες για τρόφιμα: Υπεριώδης (240-280 nm), Μικροκύματα (915 και 2450 MHz), Ιονισμού (ακτίνες γ, Χ, κοσμικές, ηλεκτρονίων)</p> <p>-Χρήση: Έλεγχος προσβολής από έντομα-παράσιτα, αποστείρωση υλικών συσκευασίας, καταστροφή μικροοργανισμών</p> <p>-Μικροβιοκτόνος δράση (διάσπαση DNA μικροοργανισμών προκαλώντας κυτταρικό θάνατο)</p> <p>-Θερμική μετουσίωση πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων των μικροοργανισμών</p> <p>-Βακτήρια ανθεκτικότερα από τις ζύμες και μύκητες στα μικροκύματα</p>
<b>Χημικά συντηρητικά</b>	<p>-Αναστολή ανάπτυξης ή καταστροφή μικροοργανισμών</p> <p>-Επηρεάζουν το γενετικό σύστημα των μικροοργανισμών (προσβολή ριβοσωμάτων και αναστολή σύνθεσης πρωτεϊνών</p> <p>- Προκαλούν μεταβολές στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών</p> <p>-Αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων των μικροοργανισμών</p> <p>-Κυριότερα χημικά συντηρητικά: Οργανικά οξέα, NaCl, Νιτρικά άλατα, Αντιβιοτικά, Αντιοξειδωτικά</p>

\*HTST (High Temperature Short Time): Υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα

\* “Εμπορική αποστείρωση”: Η αποστείρωση που εξασφαλίζει ότι το κονσερβοποιημένο προϊόν δεν αλλοιώνεται ούτε είναι επικίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή σε κανονικές συνθήκες αποθήκευσης

\*aw: Ενεργότητα ύδατος

\*Αφυδατωμένα προϊόντα: Τρόφιμα που έχουν υγρασία μέχρι 25% και aw μεταξύ 0,00-0,60

\*LAB: Οξυγαλακτικά βακτήρια

### 2.3.1 Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τρεις συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*) οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των Gram+ βακτηρίων. Η επιλογή τους βασίστηκε στο γεγονός ότι συναντώνται πιο συχνά στα τρόφιμα και έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές αλλοιώσεις τους και προβλήματα παθογενικής φύσεως που προκαλούνται με την κατανάλωση τους. Επιπλέον, ο *Bacillus cereus* και η *Listeria monocytogenes* βρίσκονται ως επί το πλείστον στο έδαφος όπως ακριβώς και τα λαχανικά που καλλιεργούνται (π.χ. πιπεριά). Αυτό σημαίνει πως η συχνότητα εμφάνισης τους στις

πιπεριές είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς. Ακόμη, ο *Staphylococcus aureus* και ο *Bacillus cereus* παράγουν τοξίνες οι οποίες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες για τον άνθρωπο και ως εκ τούτου η μελέτη τους κρίνεται επιτακτική (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.5) απεικονίζονται οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή.

Πίνακας 2.5 Βακτήρια που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016)

Γένος	Τρόφιμο	Τύπος αλλοίωσης	Συνθήκες ανάπτυξης	Μέτρα πρόληψης
<b>Staphylococcus aureus</b>	-Κρεατοσκευάσματα -Πουλερικά -Ψάρια -Γαλακτοκομικά -Μαγιονέζα	-Παραγωγή διαφόρων εντεροτοξινών που διαφέρουν ως προς την τοξικότητα τους -Μολυσματική δόση: $>10^5$ cfu/gr	-Θερμοκρασία: 7°C έως 46°C -pH: 4,0 έως 9,8 -aw: έως 0,86 σε αερόβιο περιβάλλον και έως 0,90 σε αναερόβιο περιβάλλον	-Θέρμανση στους 66°C για 12 min ή στους 60°C για 78-83 min -Τήρηση κανόνων υγιεινής από τους χειριστές τροφίμων -Για αποφυγή παραγωγής εντεροτοξίνης: Διατήρηση σε θερμοκρασίες ψύξης (<5°C) ή θερμοθαλάμου (>60°C)
<b>Bacillus cereus</b>	-Κρεατοσκευάσματα -Γαλακτοκομικά -Καρυκεύματα -Ρύζι -Κοτόπουλο	-Παραγωγή διαφόρων τοξινών αλλά τροφική δηλητηρίαση προκαλεί η εμετική και διαρροϊκή εντεροτοξίνη -Μολυσματική δόση:	-Θερμοκρασία: 4°C έως 50°C -pH: 4,9 έως 9,3 -aw: κάτω από 0,90 δεν αναπτύσσεται -Παραγωγή τοξίνης στο τέλος της λογαριθμικής	-Ταχεία ψύξη μετά τη θερμική επεξεργασία ή διατήρηση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 65°C

		α)Εμετικός τύπος: $10^5$ με $10^8$ κύτταρα/g τροφής β)Διαρροϊκός τύπος: $10^5$ κύτταρα / g ή / ml	φάσης ή στη φάση του σταθερού ρυθμού	
<b>Listeria monocytogenes</b>	-Μαλακά τυριά -Νωπό και Παστεριωμένο γάλα -Νωπά λαχανικά -Πουλερικά -Αλιεύματα	-Παραγωγή τοξίνης -Εισβολή μέσω των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου	-Θερμοκρασία: 1°C έως 45°C -pH: 4,0 έως 9,5 -aw: 0,90 έως 0,92	-Καταστροφή σε θερμοκρασίες 50°C έως 60°C

#### 2.4. Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης των πιπεριών τσίλι (*Capsicum annuum*)

Η αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, όπως οι πιπεριές τσίλι, συνήθως οφείλεται στην ύπαρξη φαινολικών ενώσεων. Μάλιστα, οι φαινολικές ενώσεις συνδέονται συχνά με την αντιμικροβιακή δράση, καθώς μπορούν να εμποδίσουν την επιβίωση και την ανάπτυξη μικροβίων όπως βακτηρίων και μυκήτων. Αναλυτικότερα, αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις βιολογικές μεμβράνες των μικροοργανισμών, προκαλώντας την αποτροπή της μεταφοράς θρεπτικών ουσιών ή την απελευθέρωση τοξικών ουσιών από και προς το κύτταρο ξενιστή. Ακόμη, μπορούν να εμποδίσουν την αναπαραγωγή των μικροοργανισμών με την αναστολή της μιτωτικής διαίρεσης.

Πέρα από την ανασταλτική δράση, έρευνες έχουν φανερώσει την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών πολλών ειδών πιπεριάς έναντι διαφόρων εκφυλιστικών, μεταλλαξιογόνων και χρόνιων ασθενειών. Ειδικότερα, η καψαϊκίνη, ο κύριος εκπρόσωπος των πικάντικων συστατικών, λόγω της αναλγητικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της έχει χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Με λίγα λόγια, οι πιπεριές κατέχουν μεγάλο αντιοξειδωτικό δυναμικό και μπορούν να αποτελέσουν ένα εξαιρετικό φυσικό αντιοξειδωτικό

για συμπληρώματα διατροφής, πρόσθετα, ή λειτουργικά συστατικά (Mohammad Salamatullah et al. 2022; Hernández-Pérez et al. 2020).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.6) παρουσιάζονται οι μέθοδοι οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να μετρήσουν την αντιοξειδωτική αυτή δράση των διαφόρων παραπροϊόντων της πιπεριάς *Capsicum*.

Πίνακας 2.6 Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης πιπεριών *Capsicum*

Όνομα μεθόδου	Παραπροϊόν πιπεριάς	Αποτελέσματα	Μονάδες αποτελεσμάτων	Αναφορά
<b>DPPH*</b> <b>scavenging assay</b>	Πούλπα και σπόροι πιπεριάς	Πούλπα: 0,89 ± 0,01 Σπόροι: 0,11 ± 0,00	mg AAE/g FW	(Leng et al. 2022)
<b>FRAP*</b>	Πούλπα και σπόροι πιπεριάς	Πούλπα: 0,15 ± 0,01 Σπόροι: 0,02 ± 0,00	mg AAE/g FW	(Leng et al. 2022)
<b>ABTS*</b> <b>scavenging ability assay</b>	Πούλπα και σπόροι πιπεριάς	Πούλπα: 1,36 ± 0,12 Σπόροι: 0,56 ± 0,03	mg AAE/g FW	(Leng et al. 2022)
<b>TAC*</b>	Πούλπα και σπόροι πιπεριάς	Πούλπα: 3,56 ± 0,01 Σπόροι: 0,58 ± 0,03	mg AAE/g FW	(Leng et al. 2022)
<b>ORAC*</b>	Περικάρπιο πιπεριάς	Εκχυλίσματα εξανίου: 142,4±7,4 Εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα: 2271,5±47,6 70% (v/v) υδατικά εκχυλίσματα αιθανόλης: 5482,1±78,0	μmol TE/100 g DW	(Montoya-Ballesteros et al. 2014)
<b>Δοκιμή δέσμησης νιτρικού οξειδίου</b>	Σπόροι πιπεριάς	IC <sub>25</sub> = 0,108	IC <sub>25</sub> mg/mL	(Silva et al. 2013)
<b>Δοκιμή δέσμησης ριζών υπεροξειδίου</b>	Σπόροι πιπεριάς	Μείωση ριζών υπεροξειδίου κατά 47%	Ποσοστό αναστολής	(Silva et al. 2013)

<p style="text-align: center;"><b>Δοκιμή λεύκανσης β- καροτένιου</b></p>	<p style="text-align: center;">Βρώσιμο μέρος 16 ειδών πιπεριών <i>Capsicum annuum</i></p>	<p style="text-align: center;">Εκχυλίσματα από φρέσκιες πιπεριές: 3,7-46,1 Εκχυλίσματα από βρασμένες πιπεριές: 3,1-37,1 Εκχυλίσματα από κατεψυγμένες πιπεριές: 3,2-34,5</p>	<p style="text-align: center;">IC<sub>50</sub> mg/mL</p>	<p style="text-align: center;">(Loizzo et al. 2015)</p>
--	---	---	--	---

\*DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay: δοκιμή ανίχνευσης απομάκρυνσης ριζοειδούς DPPH

\*FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος/αντιοξειδωτικής ικανότητας

\*ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) scavenging ability assay: εκτίμηση της ικανότητας δέσμωσης/ ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS

\*TAC (Total Antioxidant Capacity): συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα

\*ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): Ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου

\*IC<sub>25</sub> = Συγκέντρωση της ένωσης που αναστέλλει το 25% του σχηματισμού ριζών

\*IC<sub>50</sub> = Συγκέντρωση της ένωσης που αναστέλλει το 50% του σχηματισμού ριζών

Επομένως, οι μέθοδοι οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να μετρήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των πιπεριών *Capsicum* είναι οι DPPH, FRAP, ABTS, TAC, ORAC, η δοκιμή δέσμωσης νιτρικού οξειδίου, η δοκιμή δέσμωσης ριζών υπεροξειδίου και η δοκιμή λεύκανσης β-καροτένιου. Μάλιστα, από τα στοιχεία του πίνακα για τις DPPH, FRAP, ABTS και TAC διαπιστώνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της πούλπας των πιπεριών είναι μεγαλύτερη από αυτή των εκχυλισμάτων των σπόρων (Leng et al. 2022; Silva et al. 2013). Ακόμη, ο διαλύτης με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής ORAC (Thuphairo, Sornchan, and Suttisansanee 2019). Τέλος, κατά τη δοκιμή λεύκανσης β-καροτένιου υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα κατεψυγμένων πιπεριών (Loizzo et al. 2015).

## 2.5. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των πιπεριών τσίλι (*Capsicum annuum*)

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμακολογικά δραστικών ενώσεων, αποδείχθηκε πως οι φυσικοί πόροι φυτικής προέλευσης μπορούν να αποτελέσουν μια σημαντική πηγή φαρμάκων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πιπεριά τσίλι περιέχει μια ευρεία ποικιλία βιταμινών και αντιοξειδωτικών συστατικών εκ των οποίων η καψαϊκίνη και τα συνθετικά της παράγωγα έχουν διερευνηθεί εκτενώς στη βιομηχανία φαρμάκων. Επιπλέον, αρκετές επιστημονικές δημοσιεύσεις καταδεικνύουν την αντιμικροβιακή δράση της

καψαϊκίνης έναντι των θετικών και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως και έναντι των μυκήτων. Μάλιστα, η χρήση των προϊόντων της πιπεριάς έχει προταθεί για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων στη συντήρηση τροφίμων και στον έλεγχο των τροφιμογενών παθογόνων ή αλλοιογόνων μικροοργανισμών, με σκοπό την αποφυγή της χρήσης των υπάρχοντων συνθετικών συντηρητικών. Επομένως, η διερεύνηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων χαρακτηρίζεται ως βαρύνουσας σημασίας (Hernández-Pérez et al. 2020; Mohammad Salamatullah et al. 2022; Hleba et al. 2015).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.7) παρουσιάζονται οι μέθοδοι οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να προσδιοριστεί η αντιμικροβιακή δράση των διαφόρων παραπροϊόντων της πιπεριάς *Capsicum*.

Πίνακας 2.7 Μέθοδοι μέτρησης αντιμικροβιακής δράσης πιπεριών *Capsicum*

Όνομα μεθόδου	Παραπροϊόν πιπεριάς	Εξεταζόμενος μικροοργανισμός	Αποτελέσματα		Αναφορά
Μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ (agar well diffusion method)	Σπόροι πιπεριάς		Ζώνη αναστολής		(Gurnani et al. 2016)
			Εκχυλίσματα εξανίου	Εκχυλίσματα χλωροφορμίου	
		<i>Escherichia coli</i>	10 ± 0,52 mm	08 ± 1,32 mm	
		<i>Salmonella typhi</i>	5 ± 0,81 mm	06 ± 0,95 mm	
		<i>Proteus vulgaris</i>	5,5 ± 1,0 mm	7 ± 0,5 mm	
		<i>P. aeruginosa</i>	14 ± 1,3 mm	13 ± 1,7 mm	
		<i>K. pneumoniae</i>	12 ± 0,5 mm	13 ± 2,0 mm	
		<i>Bacillus cereus</i>	10 ± 1,0 mm	10 ± 1,8 mm	
<i>S. aureus</i>	14 ± 0,5 mm	15 ± 1,32 mm			
<i>S. aureus MRSA</i>	5 ± 0,2 mm	0			
Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (agar disk diffusion method)	Σπόροι πιπεριάς		Ζώνη αναστολής		(Gurnani et al. 2016)
			Εκχυλίσματα εξανίου	Εκχυλίσματα χλωροφορμίου	
		<i>Candida albicans</i>	13 ± 1,74 mm	20 ± 0,43 mm	
		<i>Candida krusei</i>	12 ± 1,03 mm	14 ± 1.51 mm	
		<i>Alternaria alternata</i>	11 ± 0,62 mm	0	
		<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	
<i>Aspergillus niger</i>	16 ± 1,0 mm	0			

<b>MIC*</b>	Βρώσιμο μέρος πιπεριάς <i>C.annuum</i> var. <i>tatashi</i>	MDR L. <i>monocytogenes</i>	9,4 ± 3,1 mg/ml	(LU et al. 2017)
		MDS L. <i>monocytogenes</i>	31,3 ± 18,8 mg/ml	
		MDR* <i>E. coli</i> 1	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDR <i>E. coli</i> 2	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDR <i>E. coli</i> 3	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDS* <i>E. coli</i> 1	7,8 ± 4,7 mg/ml	
		MDS <i>E. coli</i> 2	7,8 ± 4,7 mg/ml	
		MDS <i>E. coli</i> 3	12,5 ± 0,0 mg/ml	
		<i>C. albicans</i>	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		<i>C. neoformans</i>	9,375 ± 3,1 mg/ml	
<i>A. flavus</i>	18,8 ± 6,3 mg/ml			
<b>MBC*</b>	Βρώσιμο μέρος πιπεριάς <i>C.annuum</i> var. <i>tatashi</i>	MDR L. <i>monocytogenes</i>	18,8 ± 6,3 mg/ml	(LU et al. 2017)
		MDS L. <i>monocytogenes</i>	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDR <i>E. coli</i> 1	37,5 ± 12,5 mg/ml	
		MDR <i>E. coli</i> 2	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDR <i>E. coli</i> 3	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDS <i>E. coli</i> 1	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		MDS <i>E. coli</i> 2	31,25 ± 6,3 mg/ml	
		MDS <i>E. coli</i> 3	18,8 ± 6,3 mg/ml	
		<i>C. albicans</i>	37,5 ± 12,5 mg/ml	
		<i>C. neoformans</i>	31,25 ± 18,8 mg/ml	
<i>A. flavus</i>	31,25 ± 18,8 mg/ml			

\* MIC (Minimum Inhibitory Concentration) = Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση

\* MBC (Minimum Bactericidal Concentration) = Ελάχιστη Βακτηριδιακή Συγκέντρωση

\* MDR (multidrug-resistant) = πολύ ανθεκτικός μικροοργανισμός στα αντιβιοτικά

\* MDS (multidrug-susceptible) = πολύ ευαίσθητος μικροοργανισμός στα αντιβιοτικά

Συνεπώς, οι συνηθέστερες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για να μετρήσουν την αντιμικροβιακή ικανότητα των πιπεριών *Capsicum* είναι η μέθοδος διάχυσης φρεατίου σε άγαρ, η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση και η ελάχιστη βακτηριδιακή συγκέντρωση. Αναλυτικότερα, οι δύο πρώτες φαίνεται πως αφορούν βακτήρια και μύκητες αντίστοιχα, και τα αποτελέσματά τους δείχνουν να εξαρτώνται από τον διαλύτη με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του δείγματος. Ειδικότερα, τόσο τα εκχυλίσματα εξανίου όσο και τα εκχυλίσματα χλωροφορμίου έδειξαν σημαντική δράση (>10 mm) έναντι των *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, και *S. aureus*. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα εξανίου ανέστειλαν επίσης τους *C. albicans*, *C. krusei*, *A. alternata* και *A. niger* σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα χλωροφορμίου. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως και τα δύο εκχυλίσματα ήταν λιγότερο δραστικά απέναντι στους *S. typhi*, *P. vulgaris* και *S. aureus* MRSA



(Gurnani et al. 2016). Όσον αφορά τα αποτελέσματα των τεχνικών MIC και MBC, και οι δύο διακρίβωσαν την αντιμικροβιακή δράση των πιπεριών *C. annuum* var. *tatashi*. Γενικά, μια χαμηλή τιμή MIC ή MBC φανερώνει υψηλή δραστικότητα, ενώ μια μεγάλη τιμή φανερώνει χαμηλή δραστικότητα (LU et al. 2017). Επομένως, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, ενάντια στις MDS (πολύ ευαίσθητες στα αντιβιοτικά) *E. coli* 1 και 2 παρουσιάζεται η υψηλότερη δραστικότητα των εκχυλισμάτων παραπροϊόντων πιπεριάς (ακολουθούμενη από την MDR (πολύ ανθεκτική σε αντιβιοτικά) *L. monocytogenes*), ενώ ενάντια στον *A. flavus* και στην MDS *L. monocytogenes* παρουσιάζεται η μικρότερη.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum* με εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού (Design Of Experiments, DOE) για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης, καθώς και ο χαρακτηρισμός των περιεχόμενων ενώσεων με φασματοσκοπία υπερύθρου (infrared spectroscopy, IR).

Οι βιομηχανίες τροφίμων δημιουργούν μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων σε όλα τα βήματα της παραγωγικής τους διαδικασίας. Με αυτόν τον τρόπο, αποκτούν μια πολύτιμη και ταυτόχρονα ανεξάντλητη πρώτη ύλη από την οποία μπορεί να προκύψουν διάφορα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Εκτός αυτού, πολλά παραπροϊόντα τροφίμων όπως οι σπόροι, οι φλούδες και οι πούλπες περιέχουν πλήθος βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. φαινόλες, ταννίνες, φλαβονοειδή) που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικοί παράγοντες στην βιομηχανία τροφίμων. Η πιπεριά και κατ' επέκταση τα παραπροϊόντα της (π.χ. σπόροι και φλούδες) διαθέτουν όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και η δευτερογενή αξιοποίηση τους για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων αλλά και ο προσδιορισμός διαφόρων ιδιοτήτων τους (π.χ. αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση) αποτελούν μία μεγάλη πρόκληση.

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος της εργασίας, για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Έτσι, μετρήθηκε η απορρόφηση για κάθε εκχύλιμα στα 750 nm και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος (GAE)/g σπόρου. Σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση, προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα των εκχυλισμάτων σε τρεις μικροοργανισμούς (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*) με τη βοήθεια του οργάνου Bioscreen C και, κατόπιν, υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής των εκχυλισμάτων έναντι των προαναφερθέντων μικροοργανισμών. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλιση (ATR-FTIR) σε έξι επιλεγμένα εκχυλίσματα με σκοπό την κατηγοριοποίηση των χαρακτηριστικότερων βιοδραστικών ουσιών των σπόρων της πιπεριάς και το χαρακτηρισμό του φυτοχημικού τους προφίλ. Σημειώνεται πως μετά την προετοιμασία των εκχυλισμάτων, ακολουθήθηκε η μέθοδος της λυοφιλίωσης, κατά την οποία η θερμοκρασία του προϊόντος διατηρείται χαμηλή με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά και βιοδραστικά συστατικά του ξηρού προϊόντος.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων και τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης στους επιλεγμένους μικροοργανισμούς ήταν το τσίπουρο. Το τσίπουρο (μίγμα νερού-αιθανόλης) διαθέτει παρόμοια χαρακτηριστικά με έναν κλασικό οργανικό διαλύτη, την αιθανόλη, η οποία θα χρησιμοποιούνταν σε διαφορετική περίπτωση. Επιπλέον, είναι βρώσιμος και δεν απαιτεί περαιτέρω διεργασίες για την απομάκρυνση του από το προϊόν. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται να έχει μεγαλύτερες αποδόσεις στην εκχύλιση σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες όσον αφορά το φαινολικό περιεχόμενο. Μάλιστα, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η βέλτιστη συγκέντρωση αιθανόλης για μεγιστοποίηση της εκχύλισης βρίσκεται μεταξύ 45-50% (w/w) όση δηλαδή και του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Εξαιτίας του μεγάλου φαινολικού περιεχομένου που διαθέτουν οι σπόροι της πιπεριάς *Capsicum* σε συνδυασμό με τις υψηλές αποδόσεις εκχύλισης που προσφέρουν οι διαλύτες με βάση την αιθανόλη, φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων (Ortínero et al. 2021; Gonelimali et al. 2018).

Επομένως, βασικοί στόχοι είναι: (α) ο έλεγχος τόσο της αντιοξειδωτικής όσο και της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων πιπεριών *Capsicum* ώστε να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικοί/αντιμικροβιακοί παράγοντες, (β) η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικότερων κατηγοριών βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και (γ) η αξιολόγηση των αλκοολούχων αποσταγμάτων ως βρώσιμοι διαλύτες εκχύλισης για μελλοντική αξιοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Πειραματικό μέρος

#### 3.1. Προετοιμασία δείγματος

Δέκα κόκκινες πιπεριές τσίλι του είδους *Capsicum annuum* ισπανικής προέλευσης (περίπου 150 γραμμάρια) αγοράστηκαν από τοπική υπεραγορά. Οι πιπεριές καθαρίστηκαν με νερό, τεμαχίστηκαν και λήφθηκαν οι σπόροι τους. Στη συνέχεια, οι σπόροι κονιοποιήθηκαν με τη βοήθεια ενός γουδιού έτσι ώστε να σπάσει το περίβλημά τους και να ομογενοποιηθούν. Έπειτα, οι κονιοποιημένοι σπόροι τοποθετήθηκαν μέσα σε σωλήνες Falcon και προστέθηκαν 8 mL τσίπουρο, που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης. Έτσι, παρασκευάστηκαν 15 διαφορετικά εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς με βάση τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης στερεού-υγρού. Οι συνθήκες των πειραμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 3.1. Σημειώνεται πως η ρύθμιση του pH στις επιθυμητές τιμές έγινε με τη χρήση διαλυμάτων υδροχλωρίου (HCl) 0,1N και καυστικού νατρίου (NaOH) 0,1N. Μετά την ολοκλήρωση των εκχυλίσεων, τα εκχυλίσματα φυλάχθηκαν στους -20°C, για περαιτέρω χρήση.

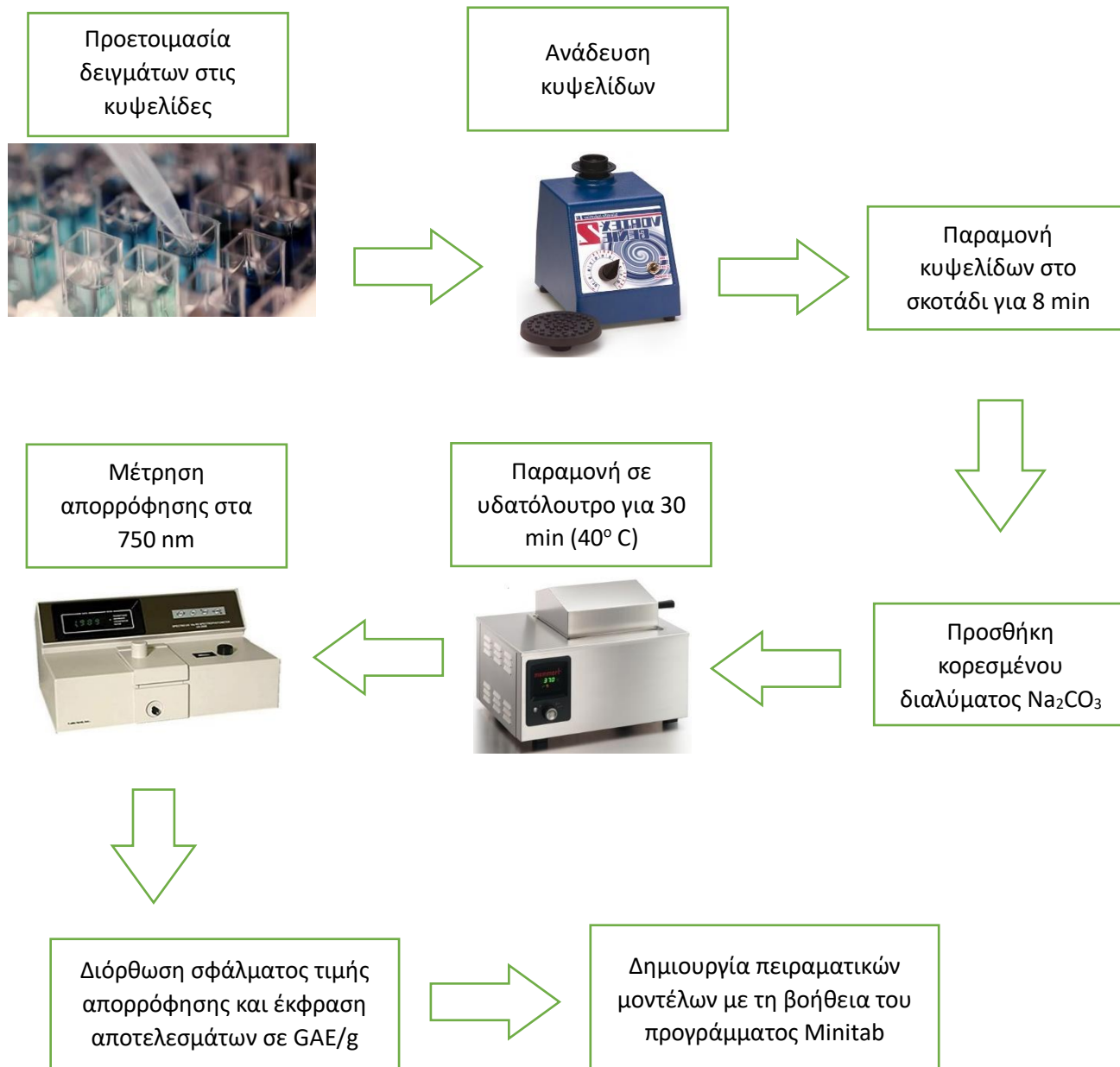
Πίνακας 3.1 Πειραματικές συνθήκες διεξαγωγής εκχυλίσεων

Τυχαιοποιημένη σειρά πειραμάτων	Σειρά εκτέλεσης πειραμάτων	Χρόνος εκχύλισης (h)	Αναλογία σπόροι/ διαλύτη (% w/v)	pH	Μάζα (g) σπόρων	Όγκος τσίπουρου (ml)
2	1	24	1,25	5,5	0,1	8
10	2	8	5,00	4,5	0,4	8
14	3	8	2,50	5,5	0,2	8
7	4	4	2,50	6,5	0,2	8
12	5	8	5,00	6,5	0,4	8
3	6	4	5,00	5,5	0,4	8
4	7	24	5,00	5,5	0,4	8
13	8	8	2,50	5,5	0,2	8
5	9	4	2,50	4,5	0,2	8
9	10	8	1,25	4,5	0,1	8
15	11	8	2,50	5,5	0,2	8
1	12	4	1,25	5,5	0,1	8
6	13	24	2,50	4,5	0,2	8
8	14	24	2,50	6,5	0,2	8

11	15	8	1,25	6,5	0,1	8
----	----	---	------	-----	-----	---

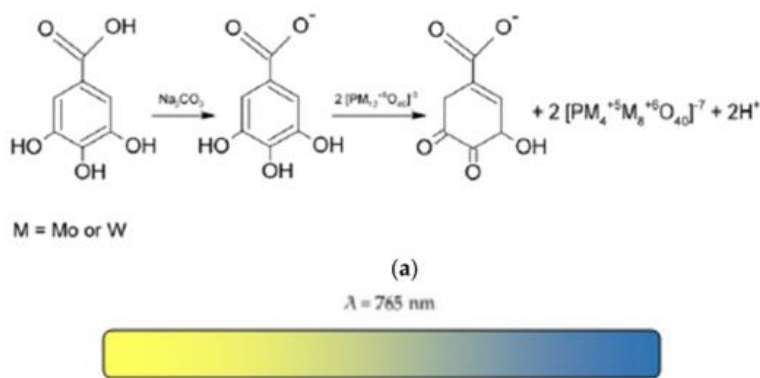
### 3.2. Πειραματική πορεία

#### 3.2.1. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου – Μέθοδος Folin Ciocalteu



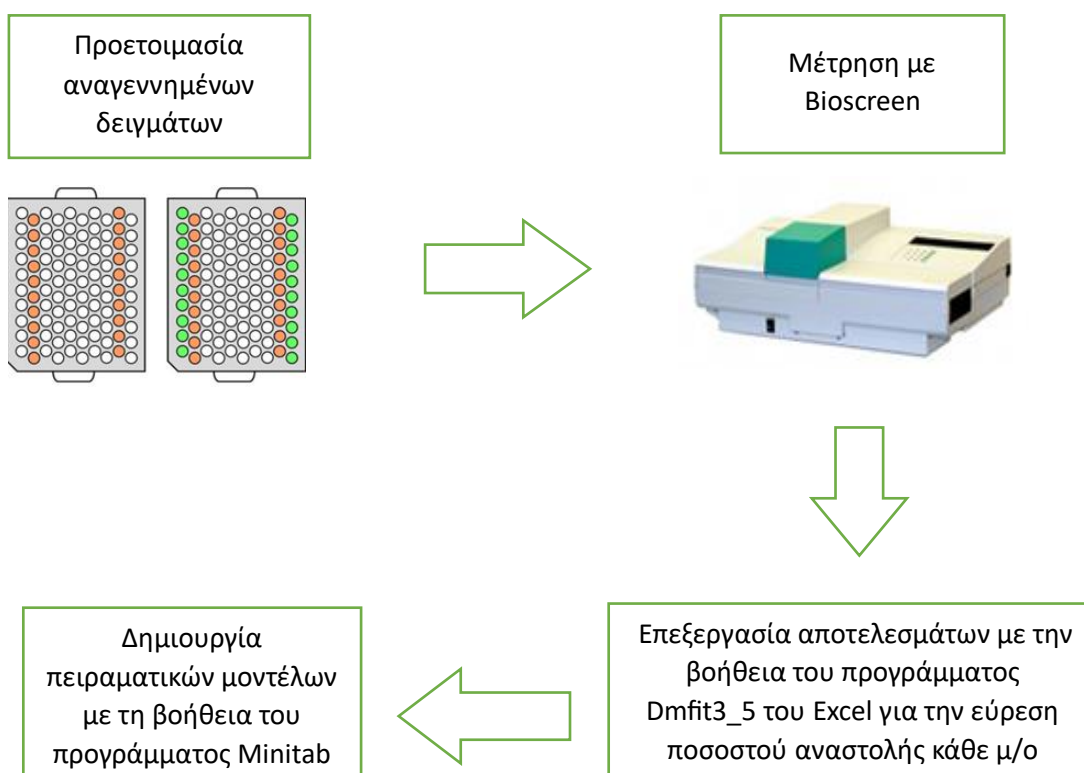
Εικόνα 3.1 Πειραματική πορεία προσδιορισμού φαινολικού περιεχομένου

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, μια πολύ γνωστή, ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών σε τρόφιμα, ποτά και βιολογικά δείγματα. Αναλυτικά, σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια μικροσύριγγας 400 μL δείγματος, 2500,0 μL απεσταγμένου νερού και 200,0 μL αντιδραστηρίου οξειδοαναγωγής Folin-Ciocalteu, το οποίο αποτελείται από άλατα μολυβδαινίου (Mo) και βολφραμίου (W). Το μείγμα αναδεύτηκε, παρέμεινε για 8 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και, έπειτα, προστέθηκαν σε αυτό 500,0 μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Στη συνέχεια, οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά μέσα σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας (40°C) σε συνθήκες σκότους, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση (Εικόνα 3.1.) και να αναπτυχθεί το επιθυμητό μπλε χρώμα. Μόλις τα δείγματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 750 nm με το φασματοφωτόμετρο Spectro 23 (Labomed, Inc. USA) βάσει της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης-συγκέντρωσης:  $A=0,0005C+0,00783$ ,  $R^2=0,9989$  η οποία κατασκευάστηκε από υδατικά διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων 25-2600 mg /L. Τέλος, το σφάλμα που μπορεί να προκύπτει στην τιμή της απορρόφησης (εξαιτίας των υπόλοιπων αντιδραστηρίων και του τσίπουρου), διορθώθηκε με τη χρήση τυφλού δείγματος. Σημειώνεται πως η παραπάνω πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για καθένα από τα 15 δείγματα και πως το τελικό ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά g δείγματος.



Εικόνα 3.2 Αντίδραση φαινολικών ενώσεων και αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (a), παρατηρούμενες χρωματικές αλλαγές (b) (Munteanu and Apetrei 2021)

### 3.2.2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης – Μέτρηση με Bioscreen



Εικόνα 3.3 Πειραματική πορεία προσδιορισμού αντιμικροβιακής δράσης

Μετά την προετοιμασία των εκχυλισμάτων, ακολούθησε η λυοφιλίωση συγκεκριμένου όγκου τους (1 ml). Η εν λόγω μέθοδος πλεονεκτεί έναντι άλλων διότι διατηρεί χαμηλή τη θερμοκρασία του δείγματος, και έτσι αποφεύγονται οι τυχόν μεταβολές στα βιοδραστικά συστατικά του. Επιπλέον, αφαιρείται το νερό ώστε να μην υπάρχει κάποια ποιοτική υποβάθμιση στο δείγμα λόγω υγρασίας. Κατόπιν, με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού ζυγίστηκε το ξηρό υπόλειμμα κάθε εκχυλίσματος, και στη συνέχεια έγινε επαναδιάλυσή τους με προσθήκη απιονισμένου νερού. Έπειτα, τα επαναδιαλυμένα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν και προετοιμάστηκαν καταλλήλως για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής ικανότητάς τους (οπτική πυκνότητα) με το μηχάνημα Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland). Συγκεκριμένα, ως υλικά χρησιμοποιήθηκαν: ένα θρεπτικό υπόστρωμα Broth, τα αναγεννημένα δείγματα και οι τρεις προς εξέταση μικροοργανισμοί (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*). Στην ειδική πλακέτα (template) του Bioscreen προετοιμάστηκαν τα δείγματα και δύο διαφορετικές κατηγορίες μαρτύρων. Όσον αφορά τα δείγματα, για τη δημιουργία τους χρειάστηκαν 300ml Broth, 30ml αναγεννημένου δείγματος και 20ml μικροοργανισμού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε ένα από τα 15 εκχυλίσματα. Στην πρώτη κατηγορία που χρησίμευσε ως μάρτυρας και ονομάστηκε

negative control προστέθηκαν 300 μl Broth και 30 μl αναγεννημένου δείγματος. Η διαδικασία έγινε μία φορά για κάθε εκχύλισμα. Στη δεύτερη κατηγορία (positive control) προστέθηκαν 300μl Broth και 20μl μικροοργανισμού. Συνολικά, παρασκευάστηκαν 3 positive control. Όλη η παραπάνω πορεία ακολουθήθηκε για κάθε ένα από τους τρεις μικροοργανισμούς ξεχωριστά. Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, η ειδική πλακέτα (template) τοποθετήθηκε στο μηχάνημα Bioscreen C και ρυθμίστηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας και του χρόνου. Ειδικότερα, η θερμοκρασία ορίστηκε στους 37°C καθότι αποτελεί τη βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης των βακτηρίων που εξετάστηκαν. Όσον αφορά τον χρόνο, η χρονική διάρκεια των μετρήσεων για κάθε μικροοργανισμό διέφερε. Για τον *Staphylococcus aureus* και την *Listeria monocytogenes* ορίστηκε στο μηχάνημα να λαμβάνει μετρήσεις για 48 ώρες καθότι αυτό αποτελεί ένα ικανοποιητικό χρονικό διάστημα ανάπτυξης για τα εν λόγω βακτήρια. Για τον *Bacillus cereus* απαιτήθηκε λιγότερος χρόνος (12 ώρες). Οι μετρήσεις που προέκυψαν, αφορούσαν την οπτική πυκνότητα και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της επέκτασης Dmfit3\_5 του Excel. Έτσι, κατόπιν υπολογισμών μέσω μαθηματικών τύπων προέκυψαν τελικά τα ποσοστά αναστολής (% inhibition) των εκχυλισμάτων για τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν.

### 3.2.3. Φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR)

Τα φάσματα FTIR λήφθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας την αποσβένουσα ολική ανάκλιση (ATR). Αρχικά, επιλέχθηκαν έξι λυοφιλωμένα δείγματα (από τα εκχυλίσματα 1, 3, 4, 8, 13, 14 (Πίνακας 3.1)) σπόρων της πιπεριάς *Capsicum*, τα οποία τοποθετήθηκαν ξεχωριστά στο φασματόμετρο FTIR (Shimadzu, IRAffinity-1S FTIR Spectrometer, Japan) και ρυθμίστηκε η τιμή αναφοράς της αποσβένουσας ολικής ανάκλισης στα 3284,77  $\text{cm}^{-1}$ . Τα φάσματα των δειγμάτων, όπως και το φάσμα με κενό το θάλαμο τοποθέτησης, που είχε ως σκοπό τη μείωση του θορύβου, καταγράφηκαν στην περιοχή μεταξύ 4.000-499  $\text{cm}^{-1}$  με την διακριτική ικανότητα του οργάνου στα 4  $\text{cm}^{-1}$ . Σημειώνεται πως κάθε τελικό φάσμα προέκυψε από το μέσο όρο 20 σαρώσεων. Τέλος, τα FTIR φάσματα των δειγμάτων διορθώθηκαν, κανονικοποιήθηκαν, επεξεργάστηκαν στατιστικά και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού LabSolutions IR.



### 3.3. Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken

Με τη βοήθεια του προγράμματος Minitab (έκδοση 21, free trial) εφαρμόστηκε το μοντέλο Box-Behnken, έτσι ώστε να προκύψουν οι διάφοροι συνδυασμοί συνθηκών εκχύλισης (Πίνακας 3.1), σύμφωνα με τους οποίους θα διεξαχθούν τα πειράματα για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων.

Στο πρώτο στάδιο έγινε:

- Καθορισμός παραγόντων:  $x_1$ : χρόνος εκχύλισης,  $x_2$ : pH,  $x_3$ : αναλογία σπόρων / διαλύτη
- Μετά τον καθορισμό των παραγόντων (χρόνος εκχύλισης, pH, αναλογία σπόρων/διαλύτη), επιλέχθηκαν τρεις τιμές για κάθε παράμετρο όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3). Το εύρος τιμών ορίστηκε βάσει της βιβλιογραφίας.

Πίνακας 3.2 Επίπεδα τιμών των τριών διαφορετικών παραγόντων του πειράματος

Παράγοντες	Ελάχιστη τιμή	Ενδιάμεση τιμή	Μέγιστη τιμή
Χρόνος εκχύλισης (h)	4	8	24
pH	4,5	5,5	6,5
Αναλογία σπόρων/διαλύτη (% w/v)	1,25	2,5	5,0

- Εφαρμογή συμμετρικού πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου βαθμού, Box-Behnken: Βάσει των τριών παραμέτρων που εισήχθησαν στο πρόγραμμα προέκυψε ένα μοντέλο Box-Behnken το οποίο οδήγησε στην διεξαγωγή 15 πειραμάτων οι συνθήκες των οποίων φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1.

Έπειτα στο δεύτερο στάδιο ακολούθησε:

- Διεξαγωγή των παραπάνω πειραμάτων που πρότεινε το πειραματικό μοντέλο και συλλογή αποτελεσμάτων με μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (έκφραση σε mg GAE/g σπόρου πιπεριάς) και της αντιμικροβιακής δράσης (έκφραση σε ποσοστό αναστολής)
- Επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων και αξιολόγηση του πειραματικού μοντέλου όσον αφορά την αξιοπιστία του, με βάση την τιμή του συντελεστή παλινδρόμησης ( $R^2$ ) και του διορθωμένου συντελεστή παλινδρόμησης ( $R^2_{adj}$ )
- Με βάση την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, το μοντέλο πρότεινε τρεις πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη λήψη των μέγιστων δυνατών

αποτελεσμάτων (μέγιστη ποσότητα φαινολικών και μέγιστο ποσοστό αναστολής δράσης μικροοργανισμών).

Από τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων προέκυψαν η εξίσωση πρόβλεψης του ολικού φαινολικού περιεχομένου, καθώς και οι τρεις εξισώσεις πρόβλεψης για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης του κάθε υπό εξέταση μικροοργανισμού. Επιπλέον, για κάθε πείραμα δημιουργήθηκαν πίνακες ανάλυσης διακύμανσης των παραγόντων (analysis of variance, ANOVA) με τα αντίστοιχα ραβδογράμματα Pareto, διαγράμματα επιδράσεων των παραμέτρων (Main Effects Plot και Interaction Plot) και διαγράμματα δύο διαστάσεων (Contour Plot). Μετά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα πειραματικά μοντέλα προέβλεψαν τους πιθανούς βέλτιστους συνδυασμούς προκειμένου να μεγιστοποιηθεί τόσο η συγκέντρωση των φαινολικών, όσο και το ποσοστό αναστολής των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.

### **3.4. Στατιστική ανάλυση δεδομένων**

Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και ορθότητας ενός μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού απαιτείται ανάλυση συγκεκριμένων στατιστικών δεικτών.

Η ανάλυση διακύμανσης ή διασποράς (Analysis of Variance-ANOVA) αποτελεί μια στατιστική μέθοδο με την οποία η μεταβλητότητα που υπάρχει σ' ένα σύνολο δεδομένων διασπάται στις επιμέρους συνιστώσες της με στόχο την κατανόηση της σημαντικότητας των διαφορετικών πηγών προέλευσης της. Η χρήση της στη παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την εκτίμηση της σημαντικότητας όλων των διαφορετικών συνιστωσών (παραμέτρων) που έχουν σημαντική επίδραση τόσο στο φαινολικό περιεχόμενο όσο και στο ποσοστό αναστολής δράσης των εκχυλισμάτων ενάντια στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό Minitab (έκδοση 21, free trial). Η αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων καθώς επίσης και της αξιοπιστίας του πειραματικού μοντέλου, βασίστηκε στους παρακάτω όρους:

- **p-value:** Για την αξιολόγηση της τιμής P, που αποτελεί δείκτη στατιστικής σημαντικότητας, είναι σημαντικό να έχει οριστεί το επίπεδο εμπιστοσύνης που θεωρείται αποδεκτό. Στην παρούσα μελέτη, το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε 95%. Επομένως, όταν δίνεται τιμή P ενός παράγοντα μικρότερη του 0,05 (5%), με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ο παράγοντας αυτός θεωρείται στατιστικά σημαντικός. Αυτό

σημαίνει ότι ασκεί σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα και πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψιν. Για την καλύτερη κατανόηση, οι διαφορετικοί παράγοντες απεικονίζονται σε ένα ραβδόγραμμα Pareto. Ειδικότερα, κάθε παράγοντας απεικονίζεται με μία ράβδο η οποία σε περίπτωση που ξεπερνά την τιμή επιπέδου σημαντικότητας 95% θεωρείται στατιστικά σημαντικός.

- $R^2$  (Determination Coefficient): Συντελεστής παλινδρόμησης ή Συντελεστής προσδιορισμού. Το  $R^2$  κυμαίνεται από  $0 \leq R^2 \leq 1$  ή  $0\% \leq R^2 \leq 100\%$  και εκφράζει το ποσοστό διασποράς που παρατηρείται στο μοντέλο. Σημειώνεται ότι όσο πιο κοντά στη μονάδα τείνει το  $R^2$  τόσο πιο αξιόπιστο και επαρκές θεωρείται το πειραματικό μοντέλο.
- $R^2_{adj}$  (Adjusted Determination Coefficient): Διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης ή προσδιορισμού. Ο ορισμός αυτός παραπέμπει στην πραγματική προσαρμογή των μεταβλητών ενός μοντέλου. Αν σε ένα μοντέλο περιέχονται αρκετές μη στατιστικά σημαντικές μεταβλητές, προκύπτει μείωση του  $R^2_{adj}$  το οποίο χαρακτηρίζει αναξιόπιστο το πειραματικό μοντέλο. Επομένως, με την εισαγωγή περισσότερων στατιστικά σημαντικών μεταβλητών η τιμή  $R^2_{adj}$  αυξάνεται και το μοντέλο γίνεται πιο επαρκές. Για να θεωρηθεί ένα μοντέλο αξιόπιστο απαιτούνται τιμές  $R^2_{adj} > 80\%$ . Επιπλέον, η διαφορά μεταξύ  $R^2$  και  $R^2_{adj}$  δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 20% ή 0,20. Σε αντίθετη περίπτωση το μοντέλο δεν θα έχει καλή προσαρμοστικότητα. Τέλος, απαιτείται  $R^2 > R^2_{adj}$  (ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΦΗ 2020; ΤΣΑΚΝΗΣ ΓΙΑΝΝΗΣ 2014).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1. Βελτιστοποίηση εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου στα διάφορα εκχυλίσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1). Σημειώνεται πως το φαινολικό περιεχόμενο (TPC) εκφράστηκε ως mg γαλλικού οξέος (GAE)/g σπόρου πιπεριάς (mg GAE/g seed).

Πίνακας 4.1 Πειραματικά δεδομένα για σχεδιασμό Box-Behnken και φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων

Σειρά εκτέλεσης πειραμάτων	TPC (mg GAE/g seed)
1	0,103
2	0,210
3	0,149
4	0,067
5	0,214
6	0,233
7	0,317
8	0,197
9	0,217
10	0,219
11	0,282
12	0,047
13	0,194
14	0,365
15	0,047

\*TPC: Total Phenolic Content

\* Με κόκκινο επισημαίνεται το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.1), το μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρατηρείται στο πείραμα 7 με τιμή TPC ίση με 0,317 (24h, 5,00% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=5,5) και στο πείραμα 14 με τιμή TPC ίση με 0,365 (24h, 2,50% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=6,5). Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι και οι δύο αυτοί συνδυασμοί παραμέτρων έχουν ως χρόνο εκχύλισης τις 24 ώρες, ενώ οι υπόλοιποι παράμετροι διαφέρουν μεταξύ τους. Επίσης, μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσίασε το πείραμα 15 (TPC=0,047- 8h, 1,25% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=6,5).

Βάσει των παραπάνω πειραματικών δεδομένων (Πίνακας 4.1), από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Minitab προέκυψαν: η εξίσωση για την εύρεση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Εξίσωση 4.1), ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων (Πίνακας 4.2), το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.1), τα διαγράμματα επιδράσεων παραμέτρων στο φαινολικό περιεχόμενο (Διάγραμμα 4.1 και 4.2), τα διάγραμμα δύο διαστάσεων (Contour Plot, διαγράμματα 4.3 και 4.4) και ο πίνακας βέλτιστων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Πίνακας 4.3).

Συγκεκριμένα, η εξίσωση που προέκυψε από το μοντέλο Box-Behnken είναι η εξής:

#### Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \ln(\text{TPC (mg GAE/g dry seed)}) = & 1,69 - 0,094 \text{ Extraction time (h)} + 0,142 \text{ Seed/solvent (\% w/v)} \\ & - 1,00 \text{ pH} - 0,00459 \text{ Extraction time (h)*Extraction time (h)} \\ & - 0,1507 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*Seed/solvent (\% w/v)} \\ & - 0,031 \text{ pH*pH} \\ & - 0,00199 \text{ Extraction time (h)*Seed/solvent (\% w/v)} \\ & + 0,0476 \text{ Extraction time (h)*pH} \\ & + 0,2005 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*pH} \end{aligned}$$

*Εξίσωση 4.1 Εξίσωση υπολογισμού TPC με βάση το μοντέλο Box-Behnken*

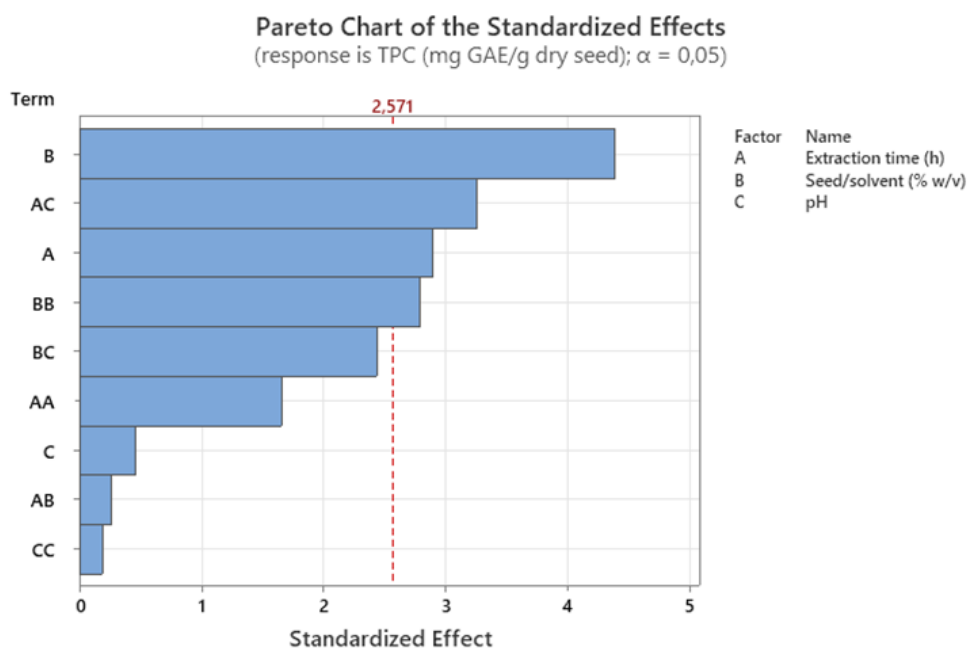
Όπου:

- Extraction time (h): ο γραμμικός όρος του χρόνου εκχύλισης σε ώρες
- Seed/solvent (% w/v): ο γραμμικός όρος της αναλογία σπόρων/διαλύτη
- Extraction time (h)\*Extraction time (h): ο τετραγωνικός όρος του χρόνου εκχύλισης
- Seed/solvent (% w/v)\*Seed/solvent (% w/v): ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας σπόρων/διαλύτη
- pH\*pH: ο τετραγωνικός όρος του pH
- Extraction time (h)\* Seed/solvent (% w/v): η αλληλεπίδραση του γραμμικού όρου του χρόνου εκχύλισης με το γραμμικό όρο της αναλογίας σπόρων/διαλύτη
- Extraction time (h)\*pH: η αλληλεπίδραση του γραμμικού όρου του χρόνου εκχύλισης με το γραμμικό όρο του pH
- Seed/solvent (% w/v)\*pH: η αλληλεπίδραση του γραμμικού όρου της αναλογίας σπόρων/διαλύτη με το γραμμικό όρο του pH

Πίνακας 4.2 Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο

### Analysis of Variance for Transformed Response

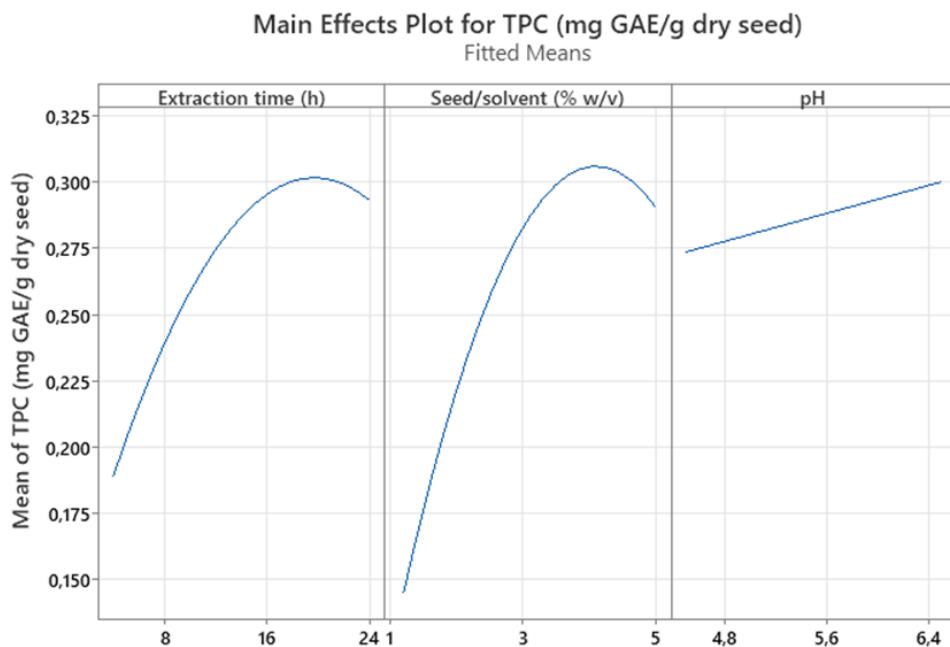
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	5,51420	0,61269	6,14	0,030
Linear	3	2,61731	0,87244	8,74	0,020
Extraction time (h)	1	0,83419	0,83419	8,36	0,034
Seed/solvent (% w/v)	1	1,92089	1,92089	19,24	0,007
pH	1	0,02157	0,02157	0,22	0,662
Square	3	0,99430	0,33143	3,32	0,115
Extraction time (h)*Extraction time (h)	1	0,27334	0,27334	2,74	0,159
Seed/solvent (% w/v)*Seed/solvent (% w/v)	1	0,77888	0,77888	7,80	0,038
pH*pH	1	0,00350	0,00350	0,04	0,859
2-Way Interaction	3	1,52849	0,50950	5,10	0,056
Extraction time (h)*Seed/solvent (% w/v)	1	0,00687	0,00687	0,07	0,804
Extraction time (h)*pH	1	1,05960	1,05960	10,61	0,022
Seed/solvent (% w/v)*pH	1	0,59170	0,59170	5,93	0,059
Error	5	0,49915	0,09983		
Lack-of-Fit	3	0,29266	0,09755	0,94	0,551
Pure Error	2	0,20649	0,10324		
Total	14	6,01335			



Ραβδόγραμμα 4.1 Ραβδόγραμμα Pareto για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Με βάση τον πίνακα ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων (ANOVA) (Πίνακας 4.2) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.1) συμπεραίνεται ότι ως σημαντικότερες παράμετροι θεωρούνται: α) η αναλογία σπόρων/διαλύτη B ( $p\text{-value}=0,007$ ), β) η αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης με το pH AC ( $p\text{-value}=0,022$ ), γ) ο γραμμικός χρόνος εκχύλισης A ( $p\text{-value}=0,034$ ), και δ) ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας σπόρων/διαλύτη BB ( $p\text{-value}=0,038$ ).

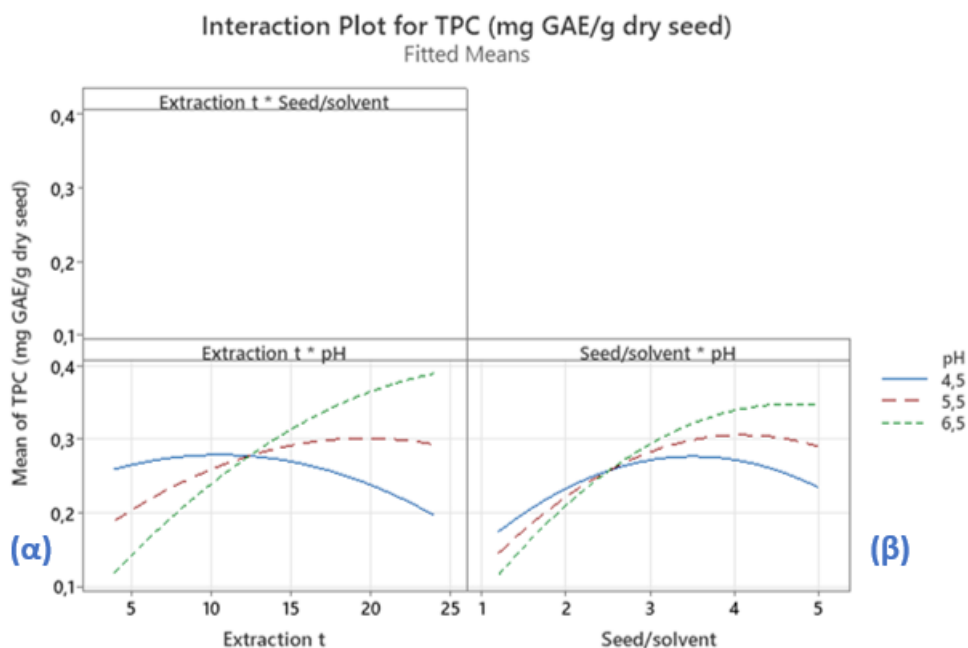
Λιγότερη αλλά ικανά σημαντική και ελάχιστα κάτω από το όριο  $p=0,05$ , θεωρείται και η αλληλεπίδραση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη με το pH (BC) ( $p\text{-value}= 0,059$ ). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να εξαχθεί η ακόλουθη παρατήρηση: Από τις τρεις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στο εν λόγω πείραμα, ο χρόνος εκχύλισης και η αναλογία σπόρων/διαλύτη θεωρούνται σημαντικές ( $p_1= 0,034$ ,  $p_2= 0,007$  αντίστοιχα). Αυτό σημαίνει ότι η μεταβολή των τιμών τους έχει σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα, στην εν λόγω περίπτωση στο φαινολικό περιεχόμενο. Αντίθετα, η παράμετρος του pH δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση αφού η τιμή  $p\text{-value}=0,662$  είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από  $p=0,05$  που είναι το αποδεκτό επίπεδο για τη στατιστική σημαντικότητα. Ο συντελεστής παλινδρόμησης ( $R^2$ ) είναι ίσος με 91,70% (αρκετά κοντά στο 100%) και σε συνδυασμό με τον διορθωμένο συντελεστή παλινδρόμησης ( $R^2_{\text{Adj}}=76,76\%$ ), ο οποίος δείχνει το ποσοστό των όρων των μεταβλητών της εκχύλισης που πραγματικά επηρεάζουν την απόδοση, αποδεικνύει την ικανοποιητική επάρκεια του μοντέλου. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το παρόν πειραματικό μοντέλο είναι ακριβές και αξιόπιστο, καθώς η απόκλιση στη διαφορά των δύο συντελεστών  $R^2$  και  $R_{\text{adj}}^2$  είναι μικρότερη του 20%.



Διάγραμμα 4.1 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.1) αναπαριστά την επίδραση των τριών παραμέτρων (κάθε μίας ξεχωριστά) στην ποσότητα των φαινολικών ενώσεων και έρχεται να επιβεβαιώσει τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Αρχικά, επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι η

αναλογία σπόρων/διαλύτη διαδραματίζει το σπουδαιότερο ρόλο στο σύνολο του φαινολικού περιεχομένου. Αναλυτικότερα, από την απεικόνιση (Διάγραμμα 4.1) φαίνεται πως η αύξηση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη, προκαλεί αντίστοιχη αύξηση στην ποσότητα των φαινολικών. Μάλιστα, σημειώνεται πως η μέγιστη συγκέντρωση (λίγο μεγαλύτερη από 0,300 mg GAE/g dry seed) επιτυγχάνεται σε αναλογία σπόρων/διαλύτη κοντά στο 4% w/v. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δεν είναι εκθετική και από ένα σημείο και μετά αρχίζει η πτώση της τιμής TPC. Ομοίως, ο χρόνος εκχύλισης ακολουθεί παρεμφερές μοτίβο με την αναλογία σπόρων/διαλύτη. Ειδικότερα, η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων μεγιστοποιείται κοντά στις 24 ώρες και από εκεί κι ύστερα αρχίζει πάλι να μειώνεται. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με την εν λόγω αναπαράσταση, η επίδραση του pH δείχνει να είναι γραμμική ως προς την ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου, χωρίς όμως να είναι σημαντική, καθώς οι τρεις τιμές που επιλέχθηκαν δεν διαφοροποιούν ιδιαίτερα το αποτέλεσμα. Έτσι, συγκρίνοντας την ελάχιστη (4,5) με την μέγιστη (6,5) τιμή pH δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στη συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.



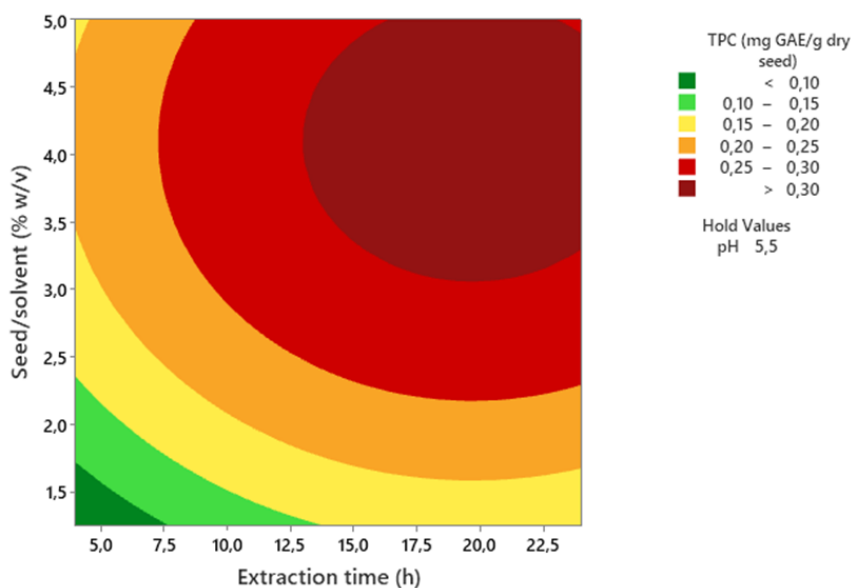
Διάγραμμα 4.2 Συνδυαστική επίδραση παραμέτρων στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.2) μελετά την επίδραση των τριών παραμέτρων της εκχύλισης ανά ζευγάρια στην ποσότητα των φαινολικών ενώσεων και, ειδικότερα, του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας των σπόρων προς τον διαλύτη, σε συνδυασμό με το pH. Συγκεκριμένα, η απεικόνιση (α) αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης μαζί με το pH. Παρατηρώντας το γράφημα προκύπτει η διαπίστωση πως αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης



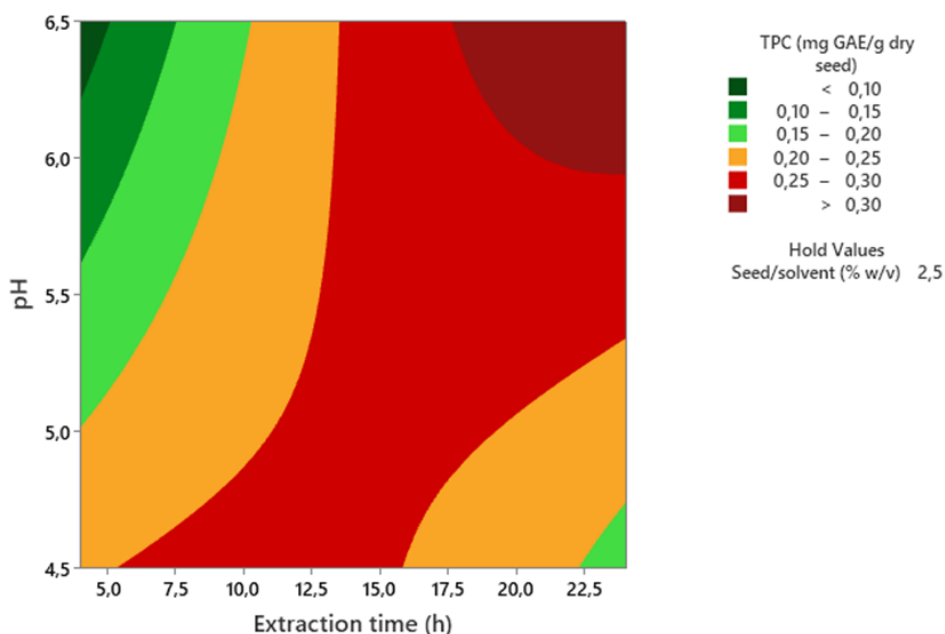
κοντά στις 24 ώρες καθώς επίσης και την τιμή του pH κοντά στο 6,5 μεγιστοποιείται η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με τον συνδυασμό της αναλογίας σπόρων/διαλύτη με το pH (απεικόνιση β). Αναλογίες κοντά στο 5% w/v με pH= 6,5 οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή, τη μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται και το γεγονός ότι το pH από μόνο του δεν έχει σημαντική επίδραση στο μετρούμενο μέγεθος.

Contour Plot of TPC (mg GAE/ vs Seed/solvent (% w/v); Extraction time



Διάγραμμα 4.4 Διάγραμμα Contour Plot (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Contour Plot of TPC (mg GAE/g dry seed) vs pH; Extraction time (h)



Διάγραμμα 3.4 Διάγραμμα Contour Plot (χρόνος εκχύλισης και pH) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Στα παραπάνω διαγράμματα, παρουσιάζονται οι διάφοροι συνδυασμοί παραγόντων εκχύλισης με τα αντίστοιχα αποτελέσματά τους όσον αφορά τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Γενικότερα, σε τέτοιου είδους διαγράμματα η περιοχή με το πιο σκούρο κόκκινο χρώμα θεωρείται η βέλτιστη, δηλώνοντας πως οι συνθήκες εκχύλισης που αντιστοιχούν σε αυτή μεγιστοποιούν το μετρούμενο μέγεθος. Συγκεκριμένα, στο πρώτο Contour Plot διάγραμμα (Διάγραμμα 4.3), όπου μελετάται ο συνδυασμός αναλογίας σπόρων/διαλύτη με τον χρόνο εκχύλισης, ως ιδανική φαίνεται η περιοχή με συνθήκες αναλογίας περίπου 4,7% w/v και χρόνου εκχύλισης περίπου 24 ώρες. Στο δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 4.4) απεικονίζεται ο συνδυασμός χρόνου εκχύλισης με το pH. Ειδικότερα, ο χρόνος εκχύλισης 24 ωρών με pH περίπου 6,5 είναι ο καταλληλότερος συνδυασμός συνθηκών. Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι για τη μεγιστοποίηση της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, υψηλές αναλογίες σπόρων/διαλύτη και υψηλές τιμές pH. Επιπλέον, καθίσταται σαφές ότι για να επιτευχθεί ο επιθυμητός στόχος απαιτείται κατάλληλος συνδυασμός των παραμέτρων. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.2 και το Ραβδόγραμμα 4.1, ο συνδυασμός χρόνου και pH έχει σημαντική επίδραση στο μετρούμενο μέγεθος καθώς η τιμή p-value του ισούται με 0,022 ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Ακόμη, λιγότερο αλλά ικανά σημαντικός κρίνεται ο συνδυασμός της αναλογίας σπόρων/διαλύτη και του pH με  $p\text{-value} = 0,059$ . Συνεπώς, μία παράμετρος από μόνη της δεν μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά τα αποτελέσματα. Επιπροσθέτως, παρατηρώντας τα διαγράμματα Contour Plot εξάγεται μια ενδιαφέρουσα διαπίστωση: Το διάγραμμα 4.3 ακολουθεί ένα αναλογικό μοτίβο, δηλαδή η ποσότητα των φαινολικών αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας σπόρων διαλύτη. Ωστόσο, το διάγραμμα 4.4 δεν ακολουθεί ακριβώς την ίδια πορεία. Παρόλο που τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονται σε υψηλές τιμές pH και χρόνου εκχύλισης, υπάρχει μια περιοχή στο μέσον που δίνουν εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πρόκειται για τιμές pH περίπου 6,5 και χρόνο εκχύλισης περίπου 14 ώρες.

Πίνακας 4.3 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικού περιεχομένου

Προτεινόμενη συνθήκη	Χρόνος εκχύλισης (h)	Αναλογία σπόρων/διαλύτη (% w/v)	pH	TPC (mg GAE/g dry seed) Fit	Πιθανότητα επιτυχίας
1	24	4,69697	6,5	0,437822	1,00000
2	24	2,71724	6,5	0,363663	0,99455
3	14	4,70226	6,5	0,348124	0,94577

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.3) παρουσιάζονται οι προτεινόμενες βέλτιστες συνθήκες για την καλύτερη παραλαβή των φαινολικών ενώσεων. Όσον αφορά τη πρώτη συνθήκη, απαιτείται χρόνος εκχύλισης περίπου 24 ώρες με αναλογία σπόρων/διαλύτη 4,70% w/v και pH 6,5. Σύμφωνα με το μοντέλο, με το συνδυασμό των συγκεκριμένων συνθηκών εκχύλισης είναι πιθανότερο (composite desirability) να επιτευχθεί πειραματικά, η προβλεπόμενη τιμή του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Ο δεύτερος συνδυασμός συνθηκών διατηρεί ίδιες τις τιμές στις παραμέτρους που προαναφέρθηκαν με μοναδική εξαίρεση την αναλογία σπόρων/διαλύτη (2,72% w/v). Παρά την ομολογουμένως μεγάλη τροποποίηση στην εν λόγω παράμετρο, το μοντέλο προβλέπει ικανοποιητικό αποτέλεσμα με πιθανότητα 99,46%. Ακόμη, ιδιαίτερη έμφαση αξίζει να δοθεί στην τελευταία συνθήκη η οποία επισημάνθηκε στα προηγούμενα διαγράμματα Contour Plot (Διάγραμμα 4.3 και 4.4). Ειδικότερα, ο προτεινόμενος χρόνος εκχύλισης (14 ώρες) αποκλίνει σημαντικά από τις δύο προηγούμενες συνθήκες (24 ώρες). Οι υπόλοιπες δύο παράμετροι κυμαίνονται στις ίδιες τιμές με αυτές της πρώτης συνθήκης (αναλογία σπόρων/διαλύτη=4,70% w/v, pH=6,5). Η απόκλιση στο χρόνο εκχύλισης της εν λόγω συνθήκης δεν φαίνεται να διαφοροποιεί ιδιαίτερα το προβλεπόμενο αποτέλεσμα (0,348 TPC με 94,58% πιθανότητα) σε σχέση με τις υπόλοιπες. Οι παραπάνω συνθήκες που αναλύθηκαν προσδοκούν να δώσουν τα παραπάνω αποτελέσματα με πιθανότητες 95% και άνω και στις τρεις περιπτώσεις. Ακόμη, παρατηρείται εύκολα πως το pH διατηρεί την ίδια τιμή σε όλες τις περιπτώσεις, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι δεν απαιτεί τροποποίηση κάθε φορά που αλλάζουν οι υπόλοιπες δύο παράμετροι άρα και η επίδραση του στο αποτέλεσμα θεωρείται μη σημαντική. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η δεύτερη προτεινόμενη συνθήκη του Πίνακα 4.3 συμπίπτει με την πειραματική συνθήκη εκχύλισης 14 του Πίνακα 3.4 και οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα. Για την ακρίβεια, η θεωρητική

τιμή που προβλέπει το μοντέλο ισούται με 0,364 mg GAE/g dry seed, ενώ η πειραματική πραγματική τιμή είναι ίση με 0,365 mg GAE/g dry seed.

## 4.2. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς τσίλι ενάντια σε επιλεγμένους μικροοργανισμούς

Τα ποσοστά αναστολής στα διάφορα εκχυλίσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4 Ποσοστά αναστολής μικροοργανισμών στα εκχυλίσματα πιπεριάς *Capsicum*

Σειρά εκτέλεσης πειραμάτων	% Αναστολή <i>B. cereus</i>	% Αναστολή <i>S. aureus</i>	% Αναστολή <i>L. monocytogenes</i>
1	-70,975	39,417	<b>52,6027</b>
2	-94,955	27,276	17,3154
3	-92,943	14,150	20,0757
4	-79,411	17,497	16,1377
5	<b>-105,044</b>	<b>100,000</b>	23,9307
6	-62,320	34,525	22,8956
7	-76,419	33,880	25,1795
8	-70,879	33,880	14,3110
9	-99,395	3,409	22,9422
10	-60,020	19,565	17,7189
11	-87,949	59,478	30,6481
12	-55,926	33,880	18,4332
13	-81,626	4,405	24,9320
14	-75,040	<b>100,000</b>	25,5869
15	-89,244	20,716	22,0123

\*Με κόκκινο επισημαίνονται τα μέγιστα ποσοστά αναστολής για τον *S. aureus* και την *L. monocytogenes* και με κίτρινο επισημαίνεται το χειρίστο ποσοστό αναστολής για τον *B. cereus* ο οποίος καταφέρνει και αναπτύσσεται στα εκχυλίσματα (αρνητικό ποσοστό αναστολής)

### 4.2.1. *Bacillus cereus*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.4 προκύπτει πως οι τιμές του ποσοστού αναστολής για το βακτήριο *Bacillus cereus* είναι αρνητικές σε όλες τις περιπτώσεις. Το αρνητικό πρόσημο φανερώνει ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση. Αντιθέτως, τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα δρουν βοηθητικά στην ανάπτυξη του *Bacillus cereus*. Υπάρχουν μάλιστα και δύο συνθήκες εκχύλισης (πειράματα 5 και 9, Πίνακας 4.4) που πιθανώς δρουν ευεργετικά στην ανάπτυξη

του βακτηρίου σε ποσοστό έως και -100%. Ειδικότερα, ο συνδυασμός παραμέτρων που επιτρέπει την καλύτερη ανάπτυξη του *Bacillus cereus* είναι αυτός με χρόνο εκχύλισης 8 ώρες, pH= 6,5 και αναλογία σπόρων/διαλύτη 5% w/v. Γενικότερα, αξίζει να σημειωθεί πως τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση μόνο έναντι του *B. cereus* από τους τρεις μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν.

Με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 4.4) και της στατιστικής ανάλυσης προέκυψαν: η εξίσωση για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης (Εξίσωση 4.2), ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων (Πίνακας 4.5) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.2).

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, όπως ειπώθηκε προηγουμένως, δεν εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση και, επομένως, παρουσιάζει ένα μη ικανοποιητικό μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού ως προς την ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριών, μιας και το εκχύλισμα της πιπεριάς φαίνεται να συμβάλλει θετικά στην ανάπτυξη του. Ο συντελεστής παλινδρόμησης ( $R^2$ ) είναι ίσος με 52,79% και σε συνδυασμό με τον διορθωμένο συντελεστή παλινδρόμησης ( $R^2_{Adj}=0,00\%$ ) επιβεβαιώνουν την παραπάνω διαπίστωση. Αναλυτικά, ένα αξιόπιστο μοντέλο απαιτεί τιμές  $R^2$  κοντά στην μονάδα ( $R^2=1$  ή 100%) και διαφορά με τον συντελεστή παλινδρόμησης  $R^2_{Adj}$  μικρότερη του 0,2 με  $R^2 > R^2_{Adj}$ . Παρακάτω, παρατίθεται η εξίσωση (Εξίσωση 4.2) όπως υπολογίστηκε από το μοντέλο Box-Behnken με τα δεδομένα του πίνακα ANOVA. Ωστόσο, επειδή το μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο, η επίλυση της εξίσωσης αυτής δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή πρόβλεψη της ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων πιπεριών.

#### Regression Equation in Uncoded Units

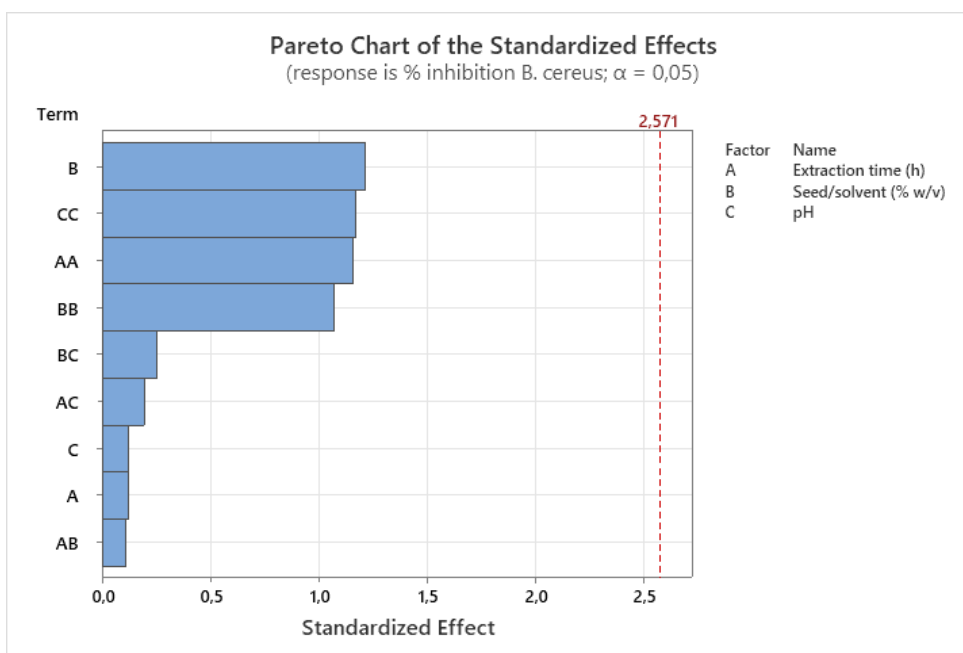
$$\begin{aligned} \% \text{ inhibition } B. \text{ cereus} = & -293 - 5,87 \text{ Extraction time (h)} - 30,0 \text{ Seed/solvent (\% w/v)} \\ & + 107,4 \text{ pH} + 0,172 \text{ Extraction time (h)*Extraction time (h)} \\ & + 3,08 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*Seed/solvent (\% w/v)} - 10,34 \text{ pH*pH} \\ & + 0,044 \text{ Extraction time (h)*Seed/solvent (\% w/v)} \\ & + 0,152 \text{ Extraction time (h)*pH} + 1,11 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*pH} \end{aligned}$$

Εξίσωση 4.2 Εξίσωση ποσοστού αναστολής ενάντια στον *B. cereus* με βάση το μοντέλο Box-Behnken

Πίνακας 4.5 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στον *B. cereus*

## Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	1604,43	178,270	0,62	0,748
Linear	3	428,53	142,845	0,50	0,700
Extraction time (h)	1	4,33	4,333	0,02	0,907
Seed/solvent (% w/v)	1	423,65	423,655	1,48	0,279
pH	1	4,40	4,402	0,02	0,906
Square	3	1169,08	389,693	1,36	0,356
Extraction time (h)*Extraction time (h)	1	383,55	383,546	1,34	0,300
Seed/solvent (% w/v)*Seed/solvent (% w/v)	1	326,40	326,396	1,14	0,335
pH*pH	1	392,06	392,063	1,37	0,295
2-Way Interaction	3	29,99	9,997	0,03	0,990
Extraction time (h)*Seed/solvent (% w/v)	1	3,35	3,352	0,01	0,918
Extraction time (h)*pH	1	10,89	10,888	0,04	0,853
Seed/solvent (% w/v)*pH	1	18,05	18,050	0,06	0,812
Error	5	1434,88	286,975		
Lack-of-Fit	3	1167,15	389,051	2,91	0,266
Pure Error	2	267,72	133,862		
Total	14	3039,31			



Ραβδόγραμμα 4.2 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής κατά του *B. cereus*

Σύμφωνα με τον πίνακα ανάλυσης διακύμανσης (Πίνακας 4.5) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.2) διαπιστώνεται ξεκάθαρα πως το εν λόγω μοντέλο είναι μη αξιόπιστο για την πρόβλεψη της αναστολής του *B. cereus* από τα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς. Όλοι οι όροι της εξίσωσης 4.2 δεν είναι σημαντικοί και δεν έχουν επίδραση στο αποτέλεσμα αφού δεν υπάρχει ούτε ένας που να έχει ξεπεράσει το επίπεδο εμπιστοσύνης που έχει τεθεί ( $p \leq 0,05$ ). Αυτό είναι

επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν έναντι του *Bacillus cereus*. Συνεπώς, απαιτείται εκ νέου προσαρμογή των υπάρχοντων παραμέτρων ή εξέταση επιπρόσθετων για τη μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων έναντι ή υπέρ του εν λόγω μικροοργανισμού.

#### 4.2.1.1. *Bacillus cereus* και πιπεριά *Capsicum*

Γενικά, τα λαχανικά, όπως οι πιπεριές *Capsicum*, αποτελούν πηγή πολύτιμων θρεπτικών συστατικών. Για αυτό τον λόγο, οι επιστήμονες συνιστούν την καθημερινή τους πρόσληψη. Ωστόσο, το γεγονός ότι πολλές φορές καταναλώνονται ωμά, δηλαδή χωρίς να έχουν υποστεί κάποιου είδους θερμικής επεξεργασίας, τα καθιστά επιρρεπή σε μόλυνση από διάφορα βακτήρια. Ένα από αυτά, και ίσως το πιο σημαντικό, είναι ο *Bacillus cereus*. Πρόκειται για έναν σπορογόνο, gram θετικό βάκιλο που βρίσκεται σε αφθονία στο έδαφος, και διαθέτει τους απαραίτητους μηχανισμούς που του επιτρέπουν να συμβιώνει μαζί με διάφορα λαχανικά. Μάλιστα, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί το πιο συχνό τροφιμογενές παθογόνο που βρίσκεται στα λαχανικά με ποσοστό μόλυνσης 37,5%. Επιπροσθέτως, παράγει διάφορες τοξίνες, αλλά τροφικές δηλητηριάσεις προκαλούν μόνο η εμετική και η διαρροϊκή εντεροτοξίνη (Park et al. 2018; Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).

Η διαρροϊκή εντεροτοξίνη σχηματίζεται κατά την βλαστική ανάπτυξη του βακτηρίου στο λεπτό έντερο. Οι σημαντικότερες εντεροτοξίνες αυτού του τύπου (διαρροϊκός τύπος) είναι η κυτοτοξίνη (cytotoxin K), η αιμόλυση BL (HBL) και η μη-αιμολυτική (NHE). Οι δύο τελευταίες θεωρούνται οι κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες του *Bacillus cereus*. Τα γονίδια τους (HBL και NHE) είναι τριπλέτες και απαιτούνται και τα τρία συστατικά για την δημιουργία της τοξίνης. Έρευνες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα πιπεριών διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν και ενεργοποιούν τα σύμπλοκα HBL και NHE, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των τοξινών του *B. cereus*. Το εύρημα αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς δείχνει πως το προς εξέταση βακτήριο ευνοείται από την συνύπαρξη του με τις πιπεριές και οδηγείται σε παραγωγή τοξίνης (Park et al. 2018; Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).

Τα πειραματικά αποτελέσματα (Πίνακας 4.4), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα πιπεριάς ευνόησαν την ανάπτυξη του *B. cereus*. Μάλιστα, το πείραμα 5 με χρόνο εκχύλισης 8h, αναλογία σπόρων/διαλύτη 5,0% w/v και pH 6,5 κατείχε τη χειρότερη αναστολή και, άρα, την καλύτερη ανάπτυξη. Έτσι, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη των συνθηκών

ανάπτυξης του βακτηρίου. Πιο συγκεκριμένα: Η θερμοκρασία ανάπτυξης του εν λόγω βακτηρίου είναι μεταξύ 4°-50 °C με άριστη τους 30°-37°C. Το pH έχει ένα εύρος μεταξύ 4,9-9,3 και η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη του είναι 0,85. Επιπροσθέτως, η πιπεριά αποτελεί πηγή πλούσια σε υδατάνθρακες οι οποίοι είναι άριστο υπόστρωμα για το προς εξέταση βακτήριο. Οι παραπάνω πληροφορίες πιθανώς να εξηγούν τον λόγο για τον οποίο τα εκχυλίσματα των πιπεριών *Capsicum* δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση στον εν λόγω μικροοργανισμό, καθώς η θερμοκρασία επώασης των δειγμάτων (37°C) συμπίπτει με το άριστο εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης του. (Park et al. 2018; Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016).

#### 4.2.2. *Staphylococcus aureus*

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.4, οι τιμές του ποσοστού αναστολής για τον *Staphylococcus aureus* είναι σε κάθε περίπτωση θετικές, υποδεικνύοντας ότι τα εκχυλίσματα των πιπεριών παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον μικροοργανισμό αυτό. Μάλιστα, οι τιμές μεγιστοποιούνται στο 100% για τα πειράματα εκχύλισης 5 (8h, 5,00% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=6,5) και 14 (24h, 2,50% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=6,5), αποδεικνύοντας πως οι συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης φαίνεται να είναι και οι βέλτιστες για τη μέτρηση της ικανότητας των εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *S. aureus*.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα (Πίνακας 4.4) δημιουργήθηκαν με χρήση του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης Minitab: η εξίσωση για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης ενάντια στον *S. aureus* (Εξίσωση 4.3), ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης των παραγόντων (Πίνακας 4.6), το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.3), τα διαγράμματα επιδράσεων των παραγόντων στην αντιμικροβιακή ικανότητα (Διάγραμμα 4.5 και 4.6), δύο διαγράμματα δύο διαστάσεων (Contour Plot, Διάγραμμα 4.7 και 4.8), καθώς και ένας πίνακας προτεινόμενων βέλτιστων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του συγκεκριμένου μικροβίου (Πίνακας 4.7). Αναλυτικότερα, η εξίσωση του ποσοστού αναστολής για τον *S. aureus* που προέκυψε από το μοντέλο Box-Behnken είναι η εξής:

#### Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibition } S. \text{ aureus} = & 114 - 3,69 \text{ Extraction time (h)} - 40,3 \text{ Seed/solvent (\% w/v)} - 26,5 \text{ pH} \\ & - 0,191 \text{ Extraction time (h)*Extraction time (h)} \\ & - 0,505 \text{ Extraction time (h)*Seed/solvent (\% w/v)} \\ & + 2,103 \text{ Extraction time (h)*pH} + 9,35 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*pH} \end{aligned}$$

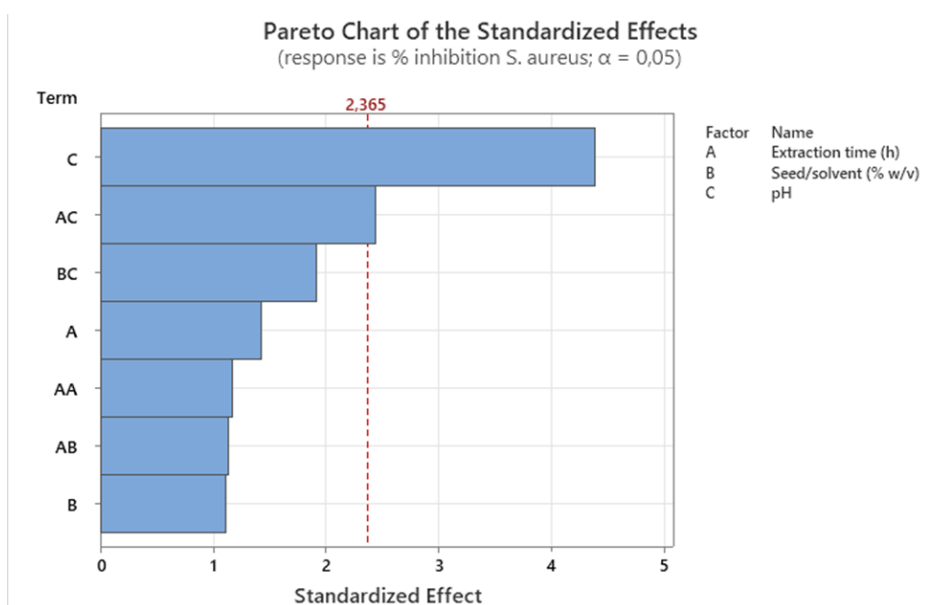
Εξίσωση 4.3 Εξίσωση υπολογισμού του ποσοστού αναστολής ενάντια στον *S. aureus* με βάση το μοντέλο Box-Behnken



Πίνακας 4.6 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στον *S. aureus*

### Analysis of Variance

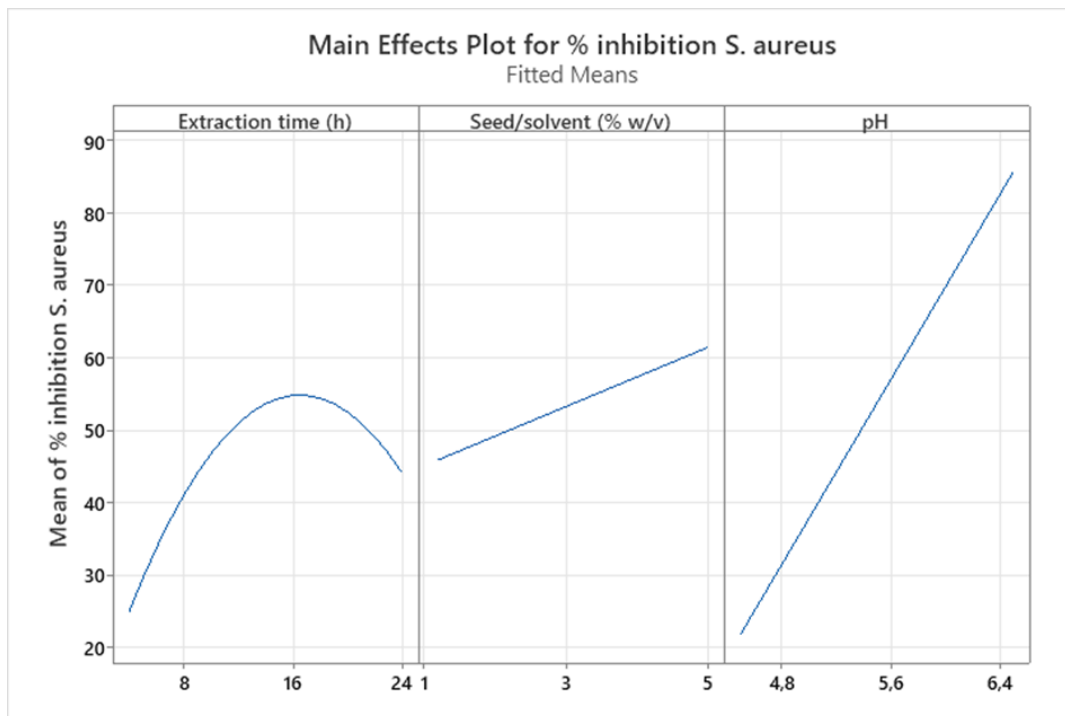
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	9782,7	1397,5	4,00	0,044
Linear	3	7793,8	2597,9	7,43	0,014
Extraction time (h)	1	709,9	709,9	2,03	0,197
Seed/solvent (% w/v)	1	429,4	429,4	1,23	0,304
pH	1	6725,7	6725,7	19,23	0,003
Square	1	478,0	478,0	1,37	0,281
Extraction time (h)*Extraction time (h)	1	478,0	478,0	1,37	0,281
2-Way Interaction	3	3536,9	1179,0	3,37	0,084
Extraction time (h)*Seed/solvent (% w/v)	1	446,8	446,8	1,28	0,296
Extraction time (h)*pH	1	2070,7	2070,7	5,92	0,045
Seed/solvent (% w/v)*pH	1	1287,1	1287,1	3,68	0,097
Error	7	2447,6	349,7		
Lack-of-Fit	5	1414,6	282,9	0,55	0,746
Pure Error	2	1033,1	516,5		
Total	14	12230,3			



Ραβδόγραμμα 4.3 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια του *S.aureus*

Σύμφωνα με τον πίνακα διακύμανσης παραγόντων (Πίνακας 4.6) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.3) συνοψίζεται ότι οι σημαντικότερες παράμετροι για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στον *S. aureus* είναι: α) ο γραμμικός όρος του pH (C,  $p=0,003$ ) και β) η αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου εκχύλισης και του pH (AC,  $p=0,045$ ). Οι παράμετροι αυτοί παρουσίασαν  $p\text{-value}<0,05$  ενώ οι υπόλοιποι με  $p\text{-value}>0,05$  θεωρήθηκαν ως μη σημαντικοί. Επομένως, από τις τρεις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ως κυριότερη χαρακτηρίζεται το pH. Επιπλέον, από τις τιμές του στατιστικού ελέγχου ( $R^2=79,99\%$

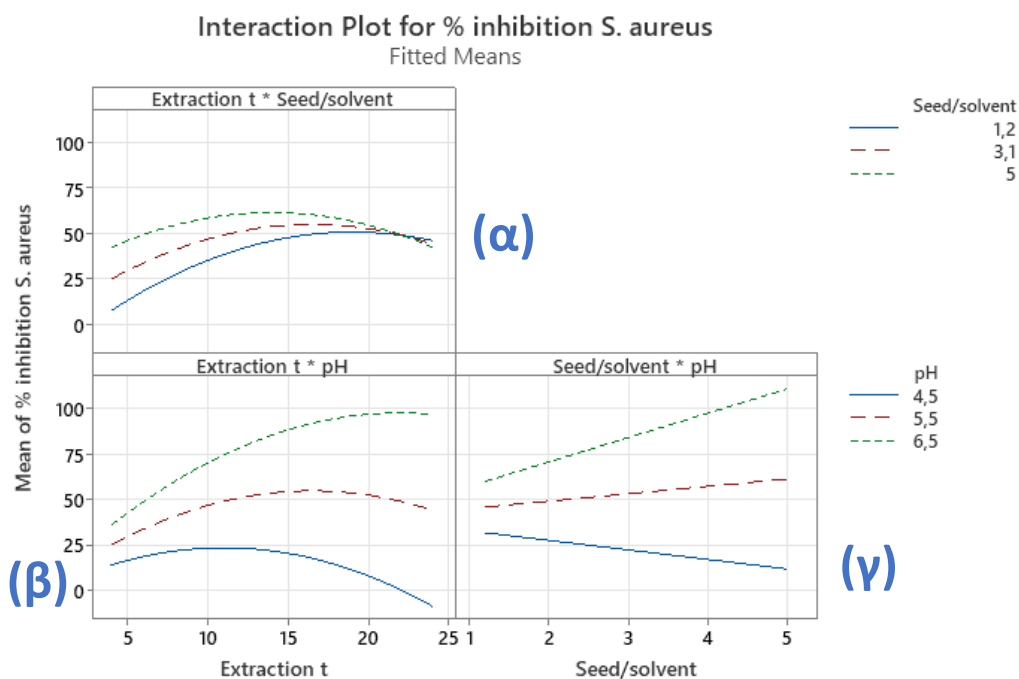
και  $R^2_{adj}=59,79\%$ ) φανερώνεται πως το εν λόγω μοντέλο είναι αρκετά ικανοποιητικό, καθώς ο συντελεστής παλινδρόμησης ( $R^2$ ) δεν απέχει πολύ από το 100% και η διαφορά του από τον διορθωμένο συντελεστή παλινδρόμησης ( $R^2_{adj}$ ) είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από 20% μονάδες.



Διάγραμμα 4.5 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus*

Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.5) παρουσιάζει την επίδραση που έχει η κάθε μία παράμετρος ξεχωριστά στο ποσοστό αναστολής και, κατ' επέκταση, στην αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της τσίλι πιπεριάς ενάντια στον *S. aureus*. Συγκεκριμένα, το γράφημα αυτό δείχνει να συμφωνεί με την προηγούμενη παρατήρηση, ότι δηλαδή ο παράγοντας με την μεγαλύτερη επίδραση ως προς την αντιμικροβιακή ικανότητα είναι αυτός του pH, καθώς όσο αυξάνεται η τιμή, αυξάνεται σημαντικά και το ποσοστό αναστολής. Επιπρόσθετα, η επίδραση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη φαίνεται να μην είναι σημαντική μιας και δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές στο ποσοστό αναστολής ανάμεσα στην ελάχιστη (1,25% w/v) και τη μέγιστη τιμή (5,0% w/v) της παραμέτρου. Μάλιστα, το γεγονός αυτό επαληθεύεται κι από τον πίνακα διακύμανσης ανάλυσης (Πίνακας 4.6) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.3) έχοντας τιμή p-value ίση με 0,304. Μια ακόμη παρατήρηση που μπορεί να επαληθευθεί αντιστοίχως από τον πίνακα διακύμανσης ανάλυσης (Πίνακας 4.6) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.3), αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης στο ποσοστό αναστολής με τιμή p-value ίση με 0,197, η οποία κρίνεται ομοίως μη σημαντική αλλά μεγαλύτερη από αυτή της παραμέτρου της αναλογίας των σπόρων προς τον διαλύτη. Η καμπύλη επίδρασης του

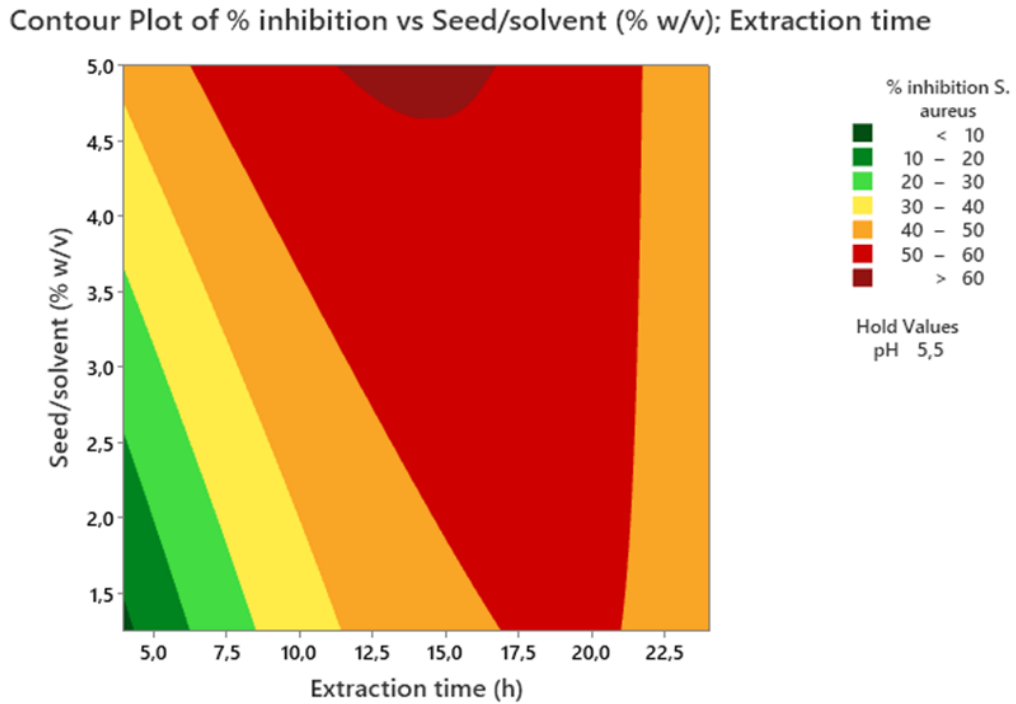
φανερώνει μια αύξηση του ποσοστού αναστολής μεγαλύτερη από το μισό του μεγίστου (100%) η οποία όμως διακόπτεται κοντά στις 16 ώρες και διαδέχεται από σταδιακή μείωση.



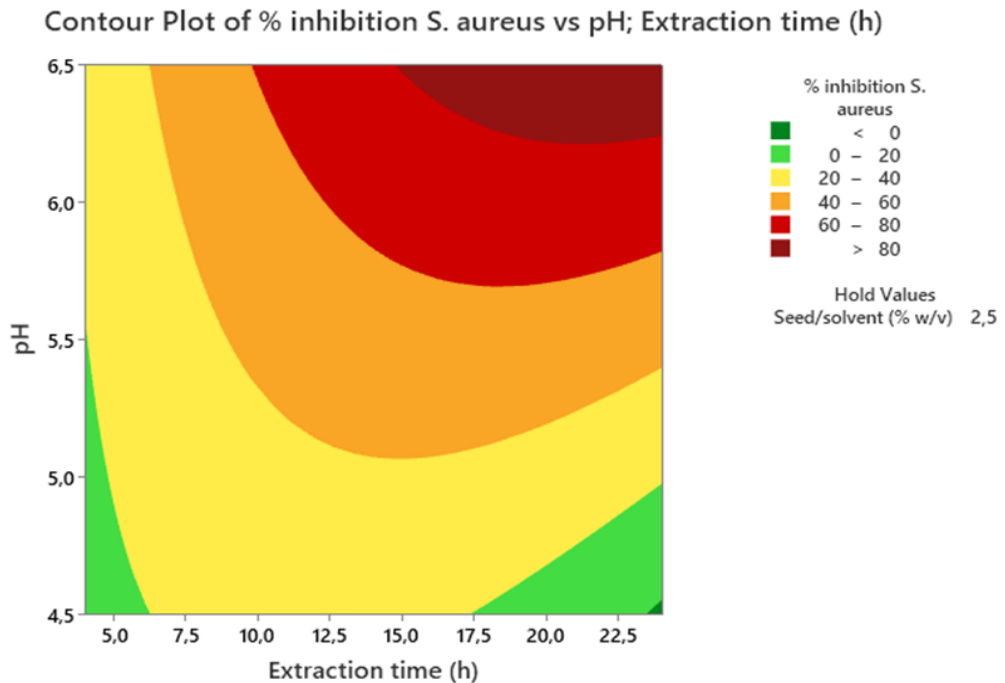
Διάγραμμα 4.6 Συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus*

Πέρα από την μεμονωμένη επίδραση των παραμέτρων εκχύλισης στην αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων των σπόρων της πιπεριάς, είναι βαρύνουσας σημασίας να μελετηθεί και η συνδυαστική επίδραση που μπορεί να έχουν οι παράμετροι αυτοί. Για παράδειγμα, από το Διάγραμμα 4.6 προκύπτει πως ο συνδυασμός του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας σπόρων/διαλύτη έχει μη σημαντικό αντίκτυπο στο ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού *S. aureus*, καθώς πιθανές μεταβολές της αναλογίας των σπόρων ως προς τον διαλύτη δεν φαίνεται να το επηρεάζουν σημαντικά με το πέρασμα του χρόνου εκχύλισης. Μάλιστα, ανεξαρτήτως της αναλογίας μετά το πέρασμα των 15 ωρών οι 3 καμπύλες του πρώτου γραφήματος συγκλίνουν μεταξύ τους και καταλήγουν στο ίδιο μη ικανοποιητικό αποτέλεσμα (μικρό ποσοστό αναστολής). Ωστόσο, τόσο ο συνδυασμός του χρόνου εκχύλισης με το pH όσο και αυτός της αναλογίας σπόρων/διαλύτη με το pH αποδεικνύονται να είναι πολύ σημαντικοί. Αναλυτικά, και στις δύο περιπτώσεις οι πράσινες καμπύλες με τη μέγιστη τιμή pH (6,5) οδηγούν στη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής. Όμως, οι δύο καμπύλες διαφέρουν μιας και η αύξηση της καμπύλης του διαγράμματος 4.6 (γ) απεικονίζεται ως γραμμική σε συνάρτηση με την αναλογία, ενώ αυτή του (β) δεν είναι γραμμική σε συνάρτηση

με το χρόνο και, μάλιστα, μετά το πέρας των 22 ωρών περίπου ξεκινά σταδιακή μείωση του ποσοστού αναστολής.



Διάγραμμα 4.8 Διάγραμμα *Contour Plot* (αναλογία σπόρων/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής του *S. aureus*



Διάγραμμα 4.7 Διάγραμμα *Contour Plot* (χρόνος εκχύλισης και pH) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής του *S. aureus*

Οι συνδυασμοί συνθηκών και οι επιδράσεις τους στο ποσοστό αναστολής ενάντια στον *S. aureus* αναπαράστώνται πιο παραστατικά και κατανοητά στα παραπάνω διαγράμματα Contour Plot (Διαγράμματα 4.7 και 4.8). Το πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα 4.7) αφορά την επίδραση του συνδυασμού της αναλογίας σπόρων/διαλύτη και του χρόνου εκχύλισης στο ποσοστό αναστολής διατηρώντας τον παράγοντα του pH σταθερό στην τιμή 5,5. Η πιο σκούρα κόκκινη περιοχή (άρα και η περιοχή που βελτιστοποιείται η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων πιπεριάς έναντι του *S. aureus*), που μεγιστοποιεί το ποσοστό αναστολής, εμφανίζεται για τιμές της αναλογίας σπόρων/διαλύτη άνω του 4,5 και τιμές του χρόνου εκχύλισης μεταξύ των 12,5 και λιγότερων των 17,5 ωρών. Ένας πιθανός συνδυασμός συνθηκών που θα μπορούσε να αποφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής: 16,5 ώρες εκχύλισης και 5% w/v σπόρων/διαλύτη. Το δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 4.8) αφορά την συνδυαστική επίδραση του pH και του χρόνου εκχύλισης, διατηρώντας σταθερή την αναλογία σπόρων/διαλύτη στο 2,5% w/v. Σε αυτήν την περίπτωση τα όρια της ιδανικής περιοχής συνιστώνται από τιμές μεταξύ των 15 και των 24 ωρών για το χρόνο εκχύλισης και μεταξύ του 6,1 και του 6,5 για το pH. Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα, ένας πιθανός συνδυασμός συνθηκών για βέλτιστα αποτελέσματα θα μπορούσε να κατέχει τιμή pH ίση με 6,5 και τιμή χρόνου εκχύλισης περίπου ίση με περίπου 21 ώρες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως ο αναφερόμενος συνδυασμός είναι πολύ κοντά σε μία από τις προτινόμενες από το Minitab βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής ενάντια στον *S. aureus*

Προτεινόμενη συνθήκη	Χρόνος εκχύλισης (h)	Αναλογία σπόρων/διαλύτη (% w/v)	pH	% Αναστολή <i>S. aureus</i>	Πιθανότητα επιτυχίας
1	14,0000	4,17146	6,50000	100	1
2	24,0000	4,97791	6,31758	100	1
3	21,2374	4,82640	6,26866	100	1

Στο τέλος της στατιστικής ανάλυσης, το πρόγραμμα Minitab πρότεινε τρεις συνδυασμούς βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής στο 100%.

Αναλυτικότερα, η πρώτη προτεινόμενη συνθήκη κατέχει τον ελάχιστο χρόνο εκχύλισης στις 14 ώρες, τη μέγιστη τιμή pH (6,5) και ποσοστό αναλογίας σπόρων/διαλύτη 4,17% w/v. Οι επόμενες δύο προτεινόμενες εκχυλίσεις παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές αναλογίας σπόρων διαλύτη (4,98% για τη δεύτερη συνθήκη και 4,83% για την τρίτη) και pH (6,32 για τη δεύτερη και 6,27 για την τρίτη), αλλά διαφορετικές τιμές χρόνου εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η δεύτερη συνθήκη έχει ορισμένο χρόνο εκχύλισης τις 24 ώρες, ενώ η τρίτη τις 21,2 ώρες. Επίσης, αξίζει να τονιστεί πως εάν και οι τρεις συνδυασμοί παραμέτρων εκχύλισης εφαρμοστούν πειραματικά προβλέπεται να συμφωνούν απόλυτα με τη θεωρητική τιμή της % αναστολής (composite desirability 100%).

#### 4.2.3. *Listeria monocytogenes*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.4, οι τιμές του ποσοστού αναστολής για την *Listeria monocytogenes* είναι σε κάθε περίπτωση θετικές, υποδεικνύοντας ότι πράγματι τα εκχυλίσματα των σπόρων των πιπεριών τσίλι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον μικροοργανισμό αυτό. Το ποσοστό αναστολής μπορεί να μην μεγιστοποιείται στο 100% για κανένα από τα πειράματα (όπως στον *S. aureus*), αλλά το γεγονός αυτό δεν αναιρεί την ύπαρξη της ανασταλτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Πιθανά απλώς να είναι χαμηλότερη για την *L. monocytogenes* από ότι στον *S. aureus*. Έτσι, η μέγιστη τιμή του ποσοστού αναστολής συναντάται στο πείραμα 1 (24h, 1,25% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=5,5) και ισούται με 52,60%.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα (Πίνακας 4.4) και αξιοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Minitab δημιουργήθηκαν: η εξίσωση για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης ενάντια στην *Listeria monocytogenes* (Εξίσωση 4.4), ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης των παραγόντων (Πίνακας 4.8), το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.4), τα διαγράμματα επιδράσεων των παραγόντων στην ανασταλτική ικανότητα (Διάγραμμα 4.9 και 4.10), δύο διαγράμματα δύο διαστάσεων (Contour Plot, Διάγραμμα 4.11 και 4.12), καθώς και ένας πίνακας προτεινόμενων βέλτιστων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του συγκεκριμένου μικροβίου (Πίνακας 4.9). Συγκεκριμένα, η εξίσωση του ποσοστού αναστολής για την *Listeria monocytogenes* που προέκυψε από το μοντέλο Box-Behnken είναι η εξής:

### Regression Equation in Uncoded Units

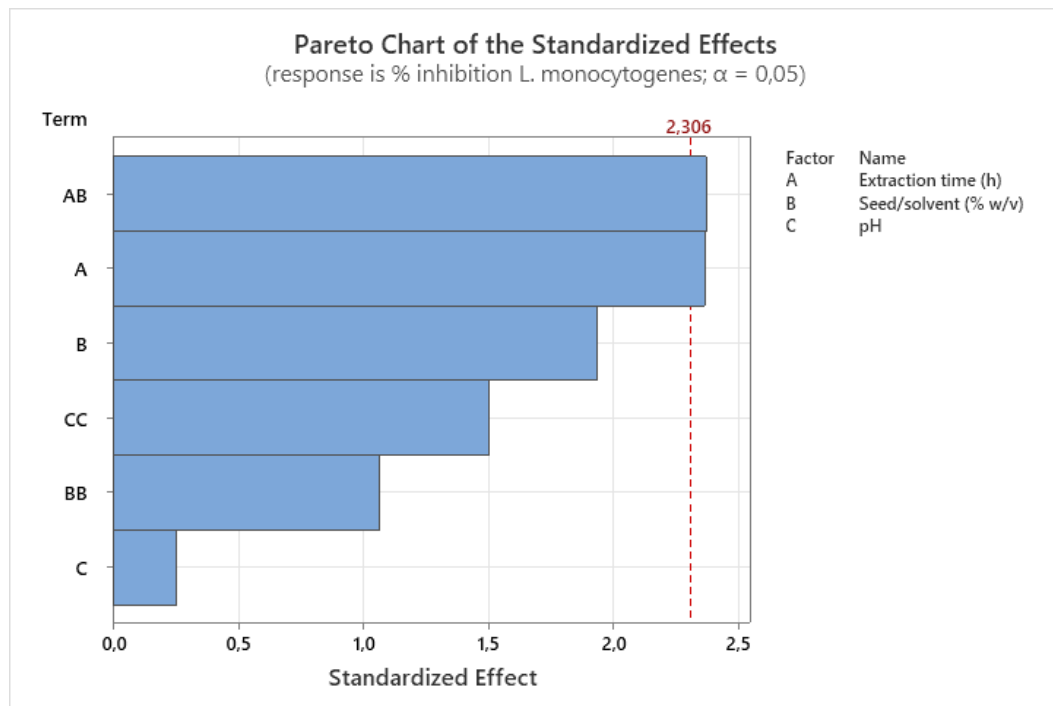
$$\begin{aligned} \% \text{ inhibition } L. \text{ monocytogenes} = & -140 + 1,699 \text{ Extraction time (h)} - 4,80 \text{ Seed/solvent (\% w/v)} \\ & + 58,0 \text{ pH} + 1,20 \text{ Seed/solvent (\% w/v)*Seed/solvent (\% w/v)} \\ & - 5,22 \text{ pH*pH} - 0,378 \text{ Extraction time (h)*Seed/solvent (\% w/v)} \end{aligned}$$

Εξίσωση 4.4 Εξίσωση υπολογισμού του ποσοστού αναστολής ενάντια στην *L. monocytogenes* με βάση το μοντέλο Box-Behnken

Πίνακας 4.8 Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στην *L. monocytogenes*

### Analysis of Variance

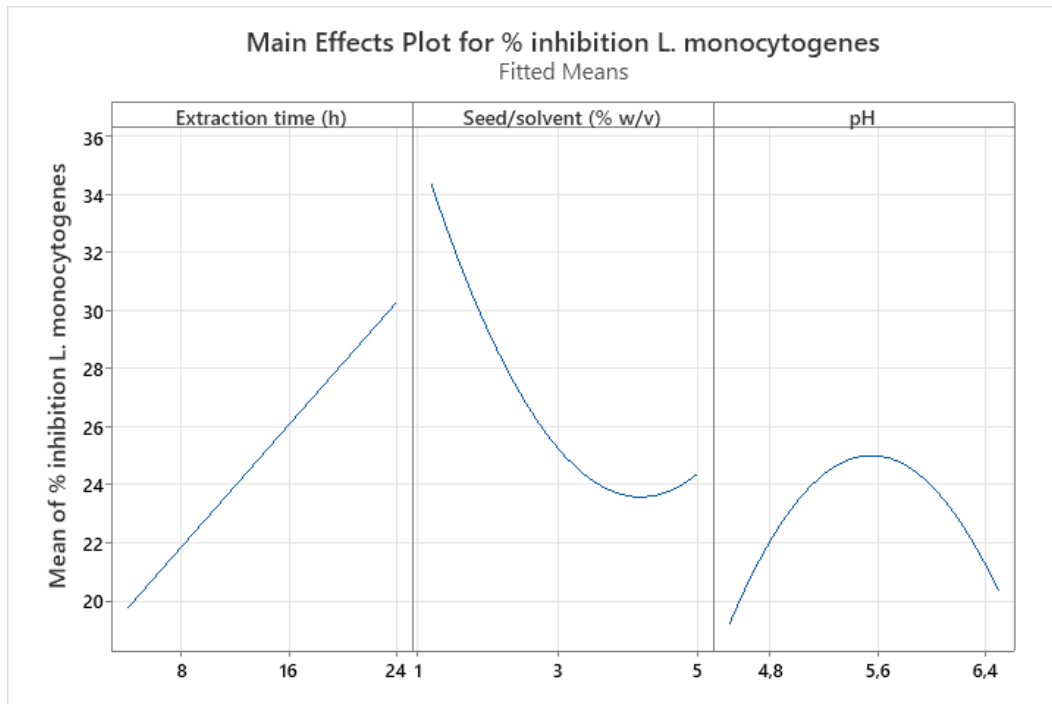
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	802,78	133,797	3,02	0,076
Linear	3	447,59	149,196	3,36	0,076
Extraction time (h)	1	247,47	247,473	5,58	0,046
Seed/solvent (% w/v)	1	165,96	165,959	3,74	0,089
pH	1	2,83	2,831	0,06	0,807
Square	2	160,98	80,489	1,81	0,224
Seed/solvent (% w/v)*Seed/solvent (% w/v)	1	50,01	50,011	1,13	0,319
pH*pH	1	100,24	100,240	2,26	0,171
2-Way Interaction	1	248,71	248,705	5,61	0,045
Extraction time (h)*Seed/solvent (% w/v)	1	248,71	248,705	5,61	0,045
Error	8	354,97	44,371		
Lack-of-Fit	6	217,66	36,277	0,53	0,769
Pure Error	2	137,30	68,651		
Total	14	1157,74			



Ραβδόγραμμα 4.4 Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια της *L. monocytogenes*

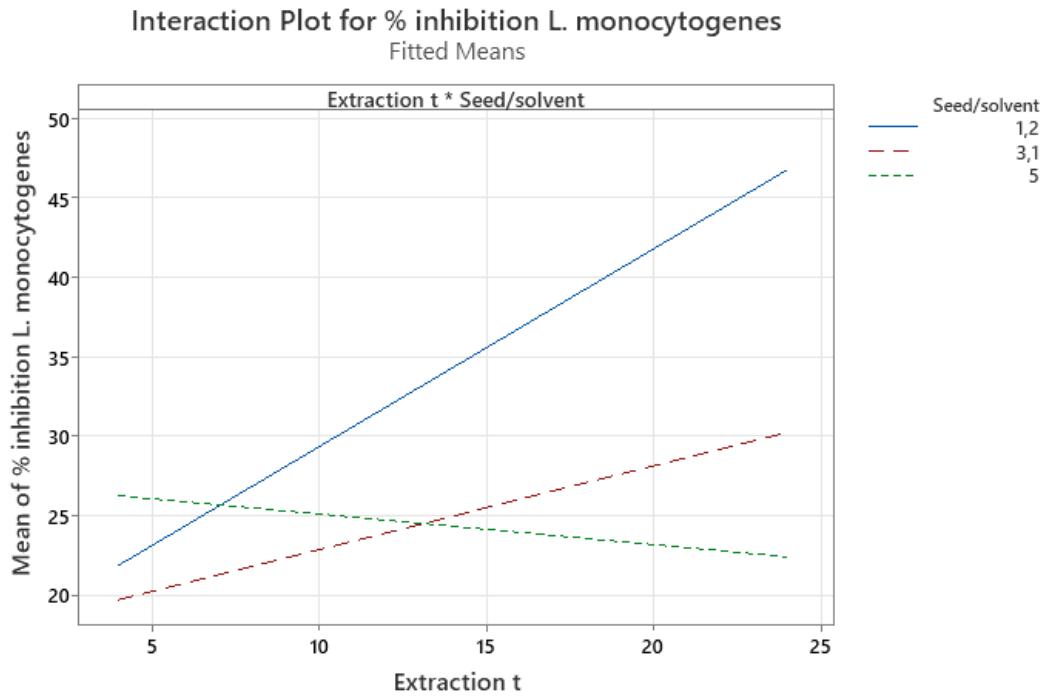
Σύμφωνα με τον πίνακα διακύμανσης παραγόντων (Πίνακας 4.8) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 4.4) συνοψίζεται ότι οι σημαντικότερες παράμετροι για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής ενάντια στην *L. monocytogenes* είναι: α) ο γραμμικός όρος του χρόνου εκχύλισης (A,  $p=0,046$ ) και β) η αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας σπόρων/διαλύτη (A by B,  $p=0,045$ ). Οι παράμετροι αυτοί παρουσίασαν  $p\text{-value}<0,05$  ξεπερνώντας το επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ενώ οι υπόλοιποι με  $p\text{-value}>0,05$  θεωρήθηκαν ως μη σημαντικοί. Επομένως, από τις τρεις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ως κυριότερη χαρακτηρίζεται ο χρόνος εκχύλισης. Έτσι, η μεταβολή του μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την έκβαση του πειράματος και χρήζει περισσότερης συζήτησης/ανάλυσης (γεγονός που πραγματοποιείται στα διαγράμματα 4.9 και 4.10). Επιπλέον, ο γραμμικός όρος της αναλογίας των σπόρων προς τον διαλύτη με τιμή  $p\text{-value}$  ίση με 0,089 μπορεί επίσης να έχει κάποια επίδραση στο αποτέλεσμα. Τέλος, από τις τιμές του στατιστικού ελέγχου ( $R^2=69,34\%$  και  $R^2_{adj}=46,34\%$ ) φανερώνεται πως το εν λόγω μοντέλο είναι αρκετά ικανοποιητικό.





Διάγραμμα 4.9 Επίδραση των τριών παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι της *L. monocytogenes*

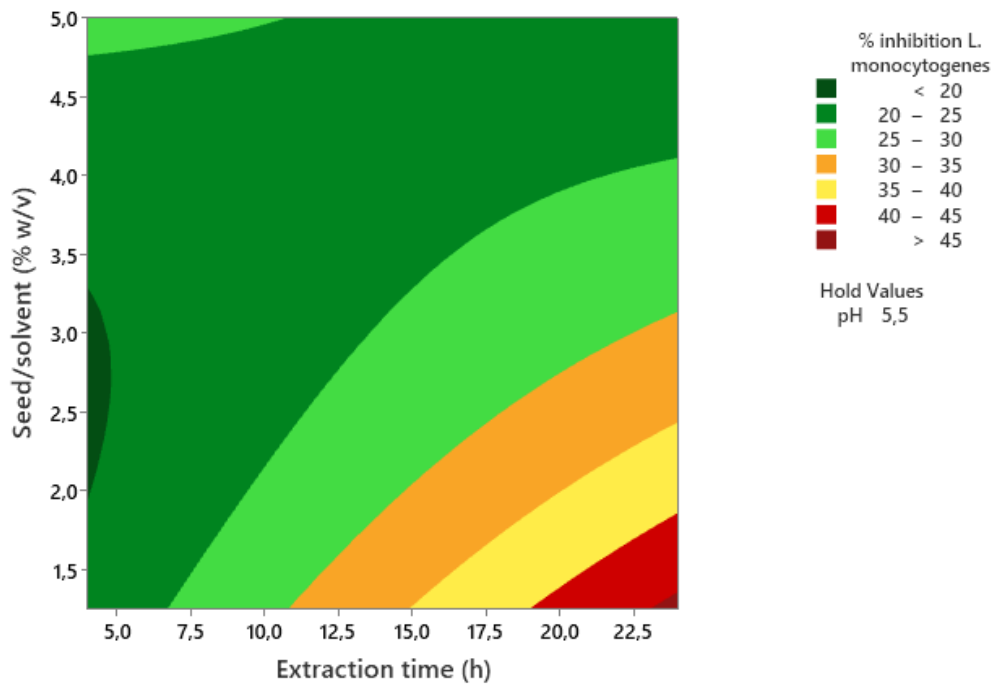
Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.9) παρουσιάζει την επίδραση που έχει η κάθε μία παράμετρος ξεχωριστά στο ποσοστό αναστολής και, κατ' επέκταση, στην αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων των σπόρων της τσίλι πιπεριάς ενάντια στην *L. monocytogenes*. Αναλυτικότερα, χάρη στο γράφημα αυτό επιβεβαιώνεται η προηγούμενη παρατήρηση ότι τόσο ο χρόνος εκχύλισης όσο και η αναλογία των σπόρων προς τον διαλύτη έχουν αρκετά σημαντική επίδραση στην ανασταλτική ικανότητα των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης δείχνει να αυξάνεται γραμμικά και το ποσοστό αναστολής μέχρις ότου φτάσει την τιμή του 30%. Ακόμα, όσον αφορά την επίδραση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη, αυτή φαίνεται να επιφέρει το αντίστροφο αποτέλεσμα από τον χρόνο εκχύλισης, δηλαδή, με την αύξηση της μειώνεται το ποσοστό αναστολής. Τέλος, η επίδραση του pH κρίνεται μη σημαντική ( $p$ -value=0,807) καθώς για την ελάχιστη (4,5) και τη μέγιστη (6,5) καθορισμένη τιμή pH το ποσοστό αναστολής δεν διαφέρει πολύ (διαφορά μικρότερη από 6%).



Διάγραμμα 4.10 Συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων στην αντιμικροβιακή δράση έναντι της *L. monocytogenes*

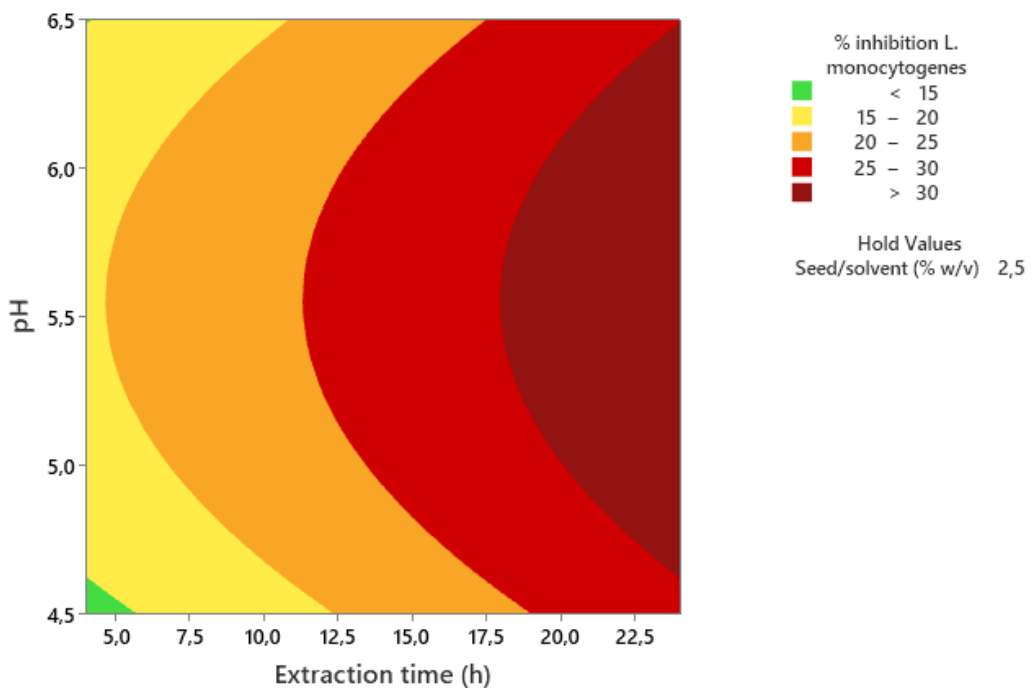
Πέρα από τη μεμονωμένη επίδραση των παραμέτρων στην αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων των σπόρων της πιπεριάς, μελετήθηκε επίσης και η συνδυαστική επίδραση τους. Ειδικότερα, στο Διάγραμμα 4.10 αποτυπώνεται η επήρεια του χρόνου εκχύλισης σε συνδυασμό με την αναλογία σπόρων/διαλύτη στο ποσοστό αναστολής. Έτσι, μπορεί να επαληθευθεί για ακόμη μια φορά πως για την επίτευξη του μέγιστου δυνατού ποσοστού αναστολής απαιτείται υψηλός χρόνος εκχύλισης (24h) και χαμηλή αναλογία των σπόρων ως προς τον διαλύτη (1,2% w/v).

Contour Plot of % inhibition vs Seed/solvent (% w/v); Extraction time



Διάγραμμα 4.12 Διάγραμμα Contour Plot (αναλογία σπόρων/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της *L. monocytogenes*

Contour Plot of % inhibition *L. monocytogenes* vs pH; Extraction time (h)



Διάγραμμα 4.11 Διάγραμμα Contour Plot (χρόνος εκχύλισης και pH) για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της *L. monocytogenes*

Οι συνδυασμοί συνθηκών και οι επιδράσεις τους στο ποσοστό αναστολής ενάντια στην *Listeria monocytogenes* αναπαράστώνται στα παραπάνω διαγράμματα Contour Plot (Διαγράμματα 4.11 και 4.12). Στο πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα 4.11) απεικονίζεται η συνδυαστική επίδραση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη και του χρόνου εκχύλισης στο ποσοστό αναστολής διατηρώντας τον παράγοντα του pH σταθερό ίσο με 5,5. Η ιδανική περιοχή για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής (δηλαδή, η πιο σκούρα κόκκινη) εμφανίζεται για τιμές αναλογίας κάτω του 1,5% w/v και τιμές χρόνου εκχύλισης άνω των 23 ωρών. Έτσι, σύμφωνα με το γράφημα αυτό, ένας πιθανός συνδυασμός συνθηκών που θα μπορούσε να αποφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής: 24 ώρες εκχύλισης, 1,25% σπόρων/διαλύτη και pH=5,5. Μάλιστα, σημειώνεται πως ο συνδυασμός αυτός είναι πολύ κοντίνος στην πρώτη βέλτιστη συνθήκη εκτέλεσης πειράματος που προτάθηκε από το Minitab και παρουσιάζεται παρακάτω στον Πίνακα 4.9. Όσον αφορά το δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 4.12), αυτό αποτυπώνει την επίδραση του pH και του χρόνου εκχύλισης, κρατώντας σταθερή την αναλογία σπόρων/διαλύτη στο 2,5% w/v. Η πιο σκούρα κόκκινη περιοχή του Contour Plot εντοπίζεται για χρόνους εκχύλισης άνω των 18 ωρών και για εύρος pH αρκετά μεγάλο μεταξύ της ελάχιστης (4,5) και της μέγιστης τιμής pH (6,5). Το γεγονός αυτό επαληθεύει ξανά το ότι η επίδραση του pH δεν είναι σημαντική στο ποσοστό αναστολής ενάντια στη *Listeria monocytogenes*.

Πίνακας 4.9 Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής ενάντια στην *L. monocytogenes*

Προτεινόμενη συνθήκη	Χρόνος εκχύλισης (h)	Αναλογία σπόρων/διαλύτη (% w/v)	pH	% Αναστολή <i>L. monocytogenes</i>	Πιθανότητα επιτυχίας
1	24,0000	1,25000	5,55051	46,2584	0,372830
2	24,0000	1,25000	4,92223	44,1565	0,348300
3	8,5764	1,25267	5,45124	27,2732	0,151271

Μετά το πέρας της στατιστικής ανάλυσης, από το πρόγραμμα Minitab προτάθηκαν τρεις συνδυασμοί συνθηκών οι οποίοι αποσκοπούν στη μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής. Συγκεκριμένα, οι δύο πρώτες προτεινόμενες συνθήκες κατέχουν κοινό χρόνο εκχύλισης (24 ώρες), κοινό ποσοστό αναλογίας σπόρων/διαλύτη (1,25% w/v) και διαφορετικό pH κατά

περίπου 0,6 μονάδες (5,55 για την πρώτη συνθήκη και 4,92 για τη δεύτερη). Η τελευταία συνθήκη διαφοροποιείται ακόμα περισσότερο έχοντας ως χρόνο εκχύλισης περίπου ίσο με 8,6 ώρες, ποσοστό αναλογίας σπόρων/διαλύτη ίσο με 1,25 και τιμή pH αρκετά κοντινή με τις δύο προηγούμενες. Ωστόσο, κανένας από τους παραπάνω προτεινόμενους συνδυασμούς δεν επιτυγχάνει να μεγιστοποιήσει το ποσοστό αναστολής ενάντια στον υπό μελέτη μικροοργανισμό στο 100%. Για την ακρίβεια, τα ποσοστά αναστολής τους είναι με τη σειρά περίπου ίσα με 46,3%, 44,2% και 27,3%. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει είτε πως οι επιλεγμένες συνθήκες δεν ήταν οι κατάλληλες, ή πως η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων κατά της *L. monocytogenes* να μην υφίσταται αλλά δεν είναι τόσο ισχυρή όσο στον *S. aureus*. Ακόμη, παρατηρείται σημαντική διαφορά στο ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται με την τρίτη συνθήκη (χρόνος εκχύλισης 8 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 1,25% w/v, pH 5,45) , καθώς είναι αρκετά μικρότερο. Έτσι, επιβεβαιώνεται ξανά πως για τη μεγιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης εκτός από μικρή αναλογία σπόρων/διαλύτη απαιτείται και μεγάλος χρόνος εκχύλισης. Τέλος, οι παραπάνω προτεινόμενες πειραματικές συνθήκες (Πίνακας 4.9) παρουσιάζουν μικρό ποσοστό επιτυχίας (37,3% για την πρώτη συνθήκη, 34,8% για τη δεύτερη και 15,1% για την τρίτη) για το προβλεπόμενο ποσοστό αναστολής. Αυτό σημαίνει πως πιθανώς απαιτούνται άλλες συνθήκες εκχύλισης για αυξημένη ανασταλτική δράση έναντι της *L.monocytogenes*.

Επιπροσθέτως, αν συγκρίνουμε τον Πίνακα 4.9 με τους Πίνακες 4.1, 4.4, και 4.7 προκύπτουν κάποιες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Αρχικά, στον Πίνακα 4.4 εμφανίζεται ένας συνδυασμός παραμέτρων για τον οποίο το ποσοστό αναστολής ενάντια στην *L. monocytogenes* μεγιστοποιείται στο 52,6%. Πρόκειται για το πείραμα 1 (24h, 1,25% w/v, pH=5,5), του οποίου οι συνθήκες είναι σχεδόν παραπλήσιες με αυτές της πρώτης προτεινόμενης από το Minitab συνθήκης (Πίνακας 4.9). Παρόλα αυτά, η πειραματική τιμή του ποσοστού αναστολής (52,60%) είναι μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη (46,26%).

### **4.3. Βιβλιογραφική σύγκριση επίδρασης πειραματικών συνθηκών εκχύλισης στο φαινολικό περιεχόμενο και στον προσδιορισμό αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum***

Τα χρησιμοποιούμενα εκχυλίσματα σπόρων της πιπεριάς *Capsicum* έδωσαν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο. Συγκεκριμένα, το πείραμα 14 με χρόνο εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50 % w/v και pH 6,5 (Πίνακας 4.1) φαίνεται να κατείχε τη μέγιστη τιμή φαινολικών ενώσεων η οποία ήταν ίση με 0,365 mg GAE/g seed.

Σύμφωνα με τους Beatrix Sik et al., ο χρόνος εκχύλισης εξαρτάται κυρίως από την κατηγορία της τεχνικής που χρησιμοποιείται (συμβατική ή μη). Αναλυτικότερα, οι μη συμβατικές τεχνικές έχουν εξαιρετικά μικρούς χρόνους εκχύλισης της τάξεως των 60 λεπτών, λόγω εφαρμογής ενέργειας (π.χ. υπέρηχοι, μικροκύματα) και υψηλής θερμοκρασίας, που επιταχύνουν τη διαδικασία, σε αντίθεση με τις συμβατικές που είναι αρκετά χρονοβόρες. Έτσι, δικαιολογείται η απαίτηση μεγάλου χρόνου εκχύλισης της παρούσας μελέτης για την επίτευξη του μέγιστου δυνατού φαινολικού περιεχομένου, καθώς η εκχύλιση στερεού-υγρού που πραγματοποιήθηκε ανήκει στις συμβατικές τεχνικές (Sik et al. 2020). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και μια ακόμη μελέτη των Thais W. Caldas et al. οι οποίοι επισήμαναν ότι οι μη συμβατικές τεχνικές οδηγούν σε υψηλότερη ανάκτηση φαινολικών ενώσεων σε συντομότερο χρόνο σε σχέση με τις συμβατικές (Caldas et al. 2018).

Μία άλλη παράμετρος εκχύλισης που εξετάστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η αναλογία σπόρων/διαλύτη. Ο εν λόγω παράγοντας είχε σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα ( $p$ -value=0,007) και έδειξε ότι όσο αυξάνεται η αναλογία σπόρων/διαλύτη, τόσο αυξάνεται και η ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Η γραμμική αυτή αύξηση παρατηρείται μέχρι ένα επίπεδο (περίπου 4% w/v), και περαιτέρω αύξηση επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα. Ανάλογα ευρήματα παρουσιάστηκαν και στις έρευνες των Tri Nhut Pham et al. και Cai-Ning Zhao et al. οι οποίοι διαπίστωσαν πως η αύξηση της αναλογίας στερεού-διαλύτη αυξάνει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μέχρι τη στιγμή επίτευξης της ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων (σπόροι και διαλύτης) (Pham et al. 2020; C.-N. Zhao et al. 2018). Στην παρούσα έρευνα, το κρίσιμο σημείο ισορροπίας φαίνεται να επιτυγχάνεται σε αναλογία 4% w/v, καθότι περαιτέρω αύξηση οδηγεί σε λιγότερη ποσότητα ανάκτησης ολικού φαινολικού περιεχομένου (Διάγραμμα 4.1).

Τέλος, το pH φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα, καθώς όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα ANOVA (Πίνακας 4.2), η τιμή p-value ήταν ίση με 0,662. Την παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει και η έρευνα των Elena Rosello-Soto et al., οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της ανωτέρου παραμέτρου καθώς επίσης και άλλων (% αιθανόλη, θερμοκρασία) σε εκχυλίσματα ενός είδους ξηρού καρπού (tiger nuts). Για την ακρίβεια, στο συγκεκριμένο πείραμα η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι το pH δεν έχει σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα (p-value=0,7961), σε αντίθεση με τη θερμοκρασία (p-value=0,0073) και την επί της % συγκέντρωση αιθανόλης (p-value=0,0007) (Roselló-Soto et al. 2019).

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum*, προέκυψε ότι οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης για την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού αναστολής διέφεραν μεταξύ των υπό εξέταση μικροοργανισμών. Ειδικότερα:

- Για τον *S. aureus*: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50 % w/v και pH 6,5
- Για την *L.monocytogenes*: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 1,25% w/v και pH 5,5

Η αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών αυτών επαληθεύθηκε από τα ποσοστά αναστολής τους με μέγιστη τιμή το 100% για τον *S.aureus* και το 52,60% για την *L. monocytogenes*. Αντίστοιχα, οι ερευνητές Neelam Gurnani et al. και Karleigh Bacon et al. διαπίστωσαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση κατά των αναφερόμενων βακτηρίων σε εκχυλίσματα πιπεριών *Capsicum frutescens* L. και *Capsicum annuum var. annuum* (Gurnani et al. 2016; Bacon et al. 2017).

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα εν λόγω εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του *B.cereus*. Αντιθέτως, αποδείχθηκε πως συνέβαλαν στην ανάπτυξη του. Ωστόσο, η έρευνα των Nihal Turkmen et al. σε εκχυλίσματα μαύρου τσαγιού κατέδειξε ικανοποιητική ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών έναντι του *B.cereus*. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι πιθανώς οι σπόροι γενικά δεν αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την εξέταση της αντιμικροβιακής δράσης (Turkmen et al. 2007).

Επιπροσθέτως, αξίζει να εξεταστεί η επίδραση των χρησιμοποιούμενων συνθηκών εκχύλισης και ως προς την αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων των πιπεριών

*Capsicum*. Αναφορικά με τον χρόνο εκχύλισης, υψηλοί χρόνοι εμφάνισαν καλύτερα αντιμικροβιακά αποτελέσματα σε σχέση με μικρότερους χρόνους. Η έρευνα των Nihal Turkmen et al. επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση με τη δοκιμή εκχυλισμάτων μαύρου τσαγιού σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης (2, 8 και 18 ώρες). Οι ερευνητές διαπίστωσαν πως αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης από 2 σε 18 ώρες, η ανασταλτική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς που μελέτησαν (ένας από τους οποίους ήταν ο *S. aureus*) είναι μεγαλύτερη (Turkmen et al. 2007). Η δε αναλογία σπόρων/διαλύτη φαίνεται να επηρεάζει έμμεσα την ικανότητα αναστολής. Η παράμετρος αυτή, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, συνδέεται άμεσα με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων των σπόρων της πιπεριάς *Capsicum*, που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Επομένως, η συσχέτιση της ανωτέρω παραμέτρου με την ικανότητα αναστολής επιτυγχάνεται με βάση το φαινολικό περιεχόμενο. Συγκεκριμένα, η αύξηση στην αναλογία σπόρων/διαλύτη αυξάνει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, και κατ' επέκταση την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων, μέχρι το σημείο στο οποίο επιτυγχάνεται η ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων (σπόροι και διαλύτης). Αύξηση της αναλογίας, πέρα από αυτό το σημείο οδηγεί σε μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Gao et al. 2021; Ιονανονίτς et al. 2021). Τέλος, το pH, από μικροβιολογική άποψη, ασκεί μεγάλη επίδραση στην αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων, καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών. Γενικά, η ανάπτυξη τους ευνοείται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH=4,5-8, ενώ σε τιμές pH<4,0 δεν παρατηρείται βακτηριακή δραστηριότητα. Αναλυτικά, οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν έχουν τις εξής ελάχιστες τιμές pH για ανάπτυξη τους:

- *S. aureus* pH=4,0
- *L. monocytogenes* pH=4,1
- *B. cereus* pH= 4,9 (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016)

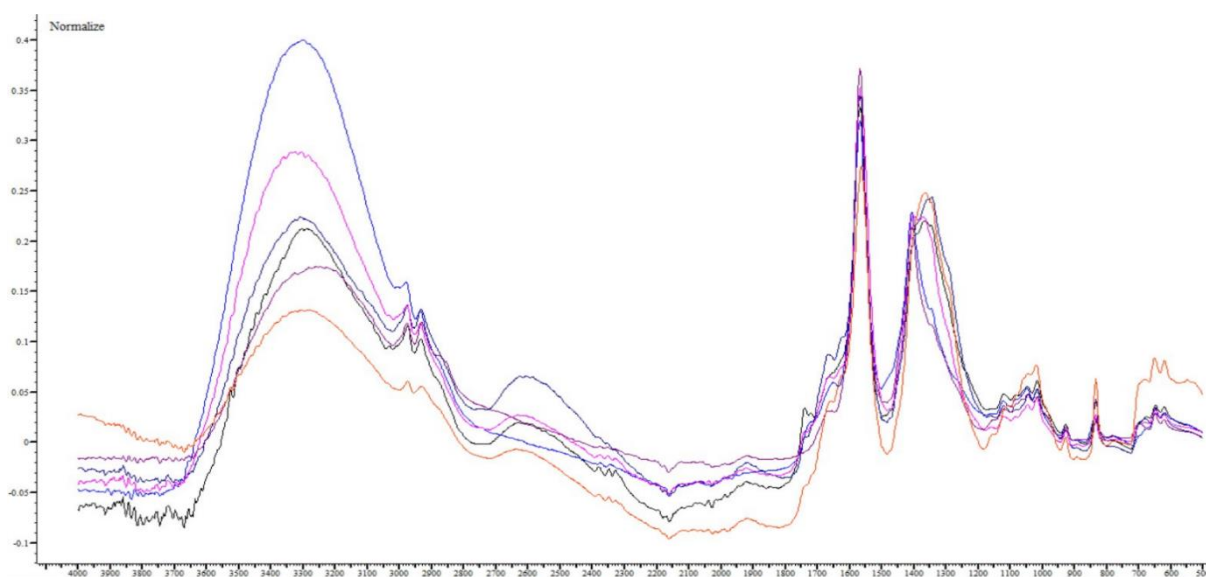
#### **4.4. Φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR)**

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 4.13, 4.14 και 4.15) απεικονίζεται το συνδυαστικό φάσμα ATR-FTIR όλων των επιλεγμένων δειγμάτων τα οποία υποβλήθηκαν στη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλιση. Στη συνέχεια, πρόκειται να αξιολογηθούν μόνο τα φάσματα των δειγμάτων των πειραμάτων εκχύλισης 1, 8 και 14 (Πίνακας 3.1), καθώς αυτά είχαν τα πιο σημαντικά αποτελέσματα προς σχολιασμό.

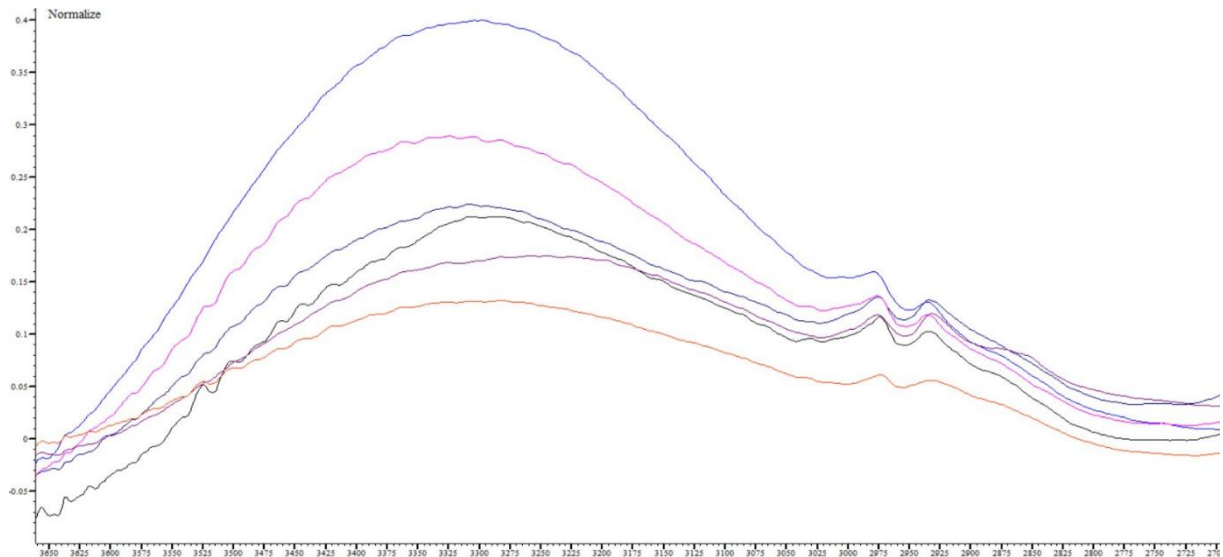


Συγκεκριμένα, το πείραμα 1 με χρόνο εκχύλισης 24h, αναλογία σπόρων/διαλύτη 1,25% w/v και pH 5,5 εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής έναντι του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ίσο με 52,60% (Πίνακας 4.4). Αντίθετα, το πείραμα 8 με χρόνο εκχύλισης 8h, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50% w/v και pH 5,5 εμφάνισε το μικρότερο ποσοστό αναστολής κατά της *L. monocytogenes* το οποίο ισούταν με 14,31% (Πίνακας 4.4). Επιπλέον, το πείραμα 14 με χρόνο εκχύλισης 24h, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50% w/v και pH 6,5 παρουσίασε το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο ίσο με 0,365 mg GAE/ g σπόρων (Πίνακας 4.1), καθώς και το μέγιστο ποσοστό αναστολής (100%) ενάντια στον *S. aureus*. Τα υπόλοιπα τρία δείγματα που προήλθαν από τα πειράματα εκχύλισης 3, 4 και 13 επιλέχθηκαν ενδεικτικά για τους εξής διαφορετικούς λόγους:

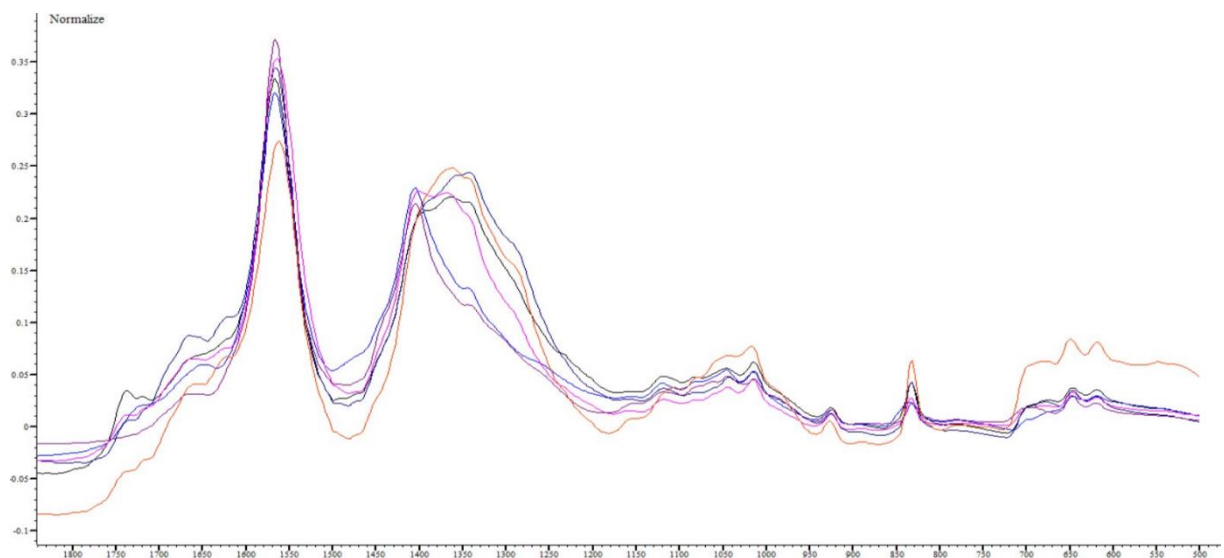
- Οι συνθήκες εκχύλισης του πειράματος 3 είναι ίδιες με αυτές του πειράματος 8 (Πίνακας 3.1). Επομένως, το αντίστοιχο του δείγμα επιλέχθηκε έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί εάν εκχυλίσματα με ίδιες πειραματικές συνθήκες δίνουν πραγματικά παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ.
- Το δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 4 επιλέχθηκε ενδεικτικά ως ένα εκχύλισμα με χρόνο εκχύλισης 4h (Πίνακας 3.1).
- Το δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 13 επιλέχθηκε ενδεικτικά ως ένα εκχύλισμα με τιμή pH ίση με 4,5 (Πίνακας 3.1).



Διάγραμμα 4.13 Συνδυαστικό φάσμα ATR-FTIR όλων των επιλεγόμενων δειγμάτων



Διάγραμμα 4.15 Μεγέθυνση δεξιάς περιοχής συνολικού φάσματος ATR-FTIR όλων των επιλεγμένων δειγμάτων



Διάγραμμα 4.14 Μεγέθυνση αριστερής περιοχής συνολικού φάσματος ATR-FTIR όλων των επιλεγμένων δειγμάτων

- \* Με φούξια χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 1.
- Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 3.
- Με σκούρο μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 4.
- Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 8.
- Με μωβ χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 13.
- Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 14.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.10) παρουσιάζονται οι ταινίες απορροφήσεων των φασμάτων ATR-FTIR των δειγμάτων των σπόρων της πιπεριάς *Capsicum*. Οι ταινίες αυτές ελήφθησαν στην περιοχή φάσματος  $3600-600\text{ cm}^{-1}$  και αφορούν τις χαρακτηριστικές ομάδες των πιπεριών συνοδευόμενες από τους αντίστοιχους κυματαριθμούς τους.

Πίνακας 4.10 Ταινίες απορροφήσεων χαρακτηριστικών ομάδων των σπόρων της πιπεριάς

Κυματαριθμός (cm <sup>-1</sup> )	Λειτουργική ομάδα	Αναφορά
3630 cm <sup>-1</sup>	Δονήσεις τάσεις μη δεσμευμένου Ο-Η, πιθανά οφελούμενο στις φαινόλες	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
3300–3354 cm <sup>-1</sup>	Δονήσεις τάσεις N-H αμινοξέων	(A and A 2016)
2980–2950 cm <sup>-1</sup>	Ασύμμετρες C(sp <sup>3</sup> )-H δονήσεις τάσεις του CH <sub>3</sub>	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
2935-2915 cm <sup>-1</sup>	Ασύμμετρες C(sp <sup>3</sup> )-H δονήσεις τάσεις του CH <sub>2</sub>	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1750-1725 cm <sup>-1</sup> (1735)	C=O δόνηση τάσης εστέρων	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1680–1630 cm <sup>-1</sup> (1647)	(C=O) δόνηση τάσης αμίδιων της καψαϊκίνης των τσίλι πιπεριών	(A and A 2016)
1556 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση τάσης του δεσμού C=C-C του αρωματικού δακτυλίου	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1410-1360 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση κάμψης ΟΗ των φαινολών ή των τριτογενών αλκοολών	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1170-1154 cm <sup>-1</sup> (1157)	Δόνηση τάση αρωματικού C-O πρωτεϊνών, υδατανθράκων, πιπερίνης	(Wilde et al. 2019)
1116 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση τάσης του δεσμού C-O των εστέρων	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1045-1053 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση τάσης C-O σε συνδυασμό με τη δόνηση τάσης C-OH των υδατανθράκων	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
1014 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση τάσης C-N πρωτοταγούς αμίνης	(Nandiyanto, Oktiani, and Ragadhita 2019)
925 cm <sup>-1</sup>	Παραμόρφωση δακτυλίου φαινολών	
800-860 cm <sup>-1</sup> (831)	Δόνηση κάμψης παραδιυποκατεστημένου αρωματικού παράγωγου	
780-760 cm <sup>-1</sup>	Δονήσεις αρωματικού δακτυλίου	
675 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση κάμψης αρωματικού C-H εκτός επιπέδου	
650-610 cm <sup>-1</sup> (644)	Δόνηση κάμψης αρωματικού C-H	

617 cm <sup>-1</sup>	Δόνηση κάμψης ΟΗ εκτός επιπέδου	
----------------------	---------------------------------	--

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 4.11) παρουσιάζονται οι επί τοις 100 σχετικές εντάσεις των κορυφών των ταινιών απορρόφησης των φασμάτων ATR-FTIR των εκχυλισμάτων των σπόρων της τσίλι πιπεριάς *Capsicum annuum*.

Πίνακας 4.11 Σχετικές % εντάσεις των ταινιών απορρόφησης των φασμάτων ATR-FTIR των εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς

Κυματαριθμοί (cm <sup>-1</sup> )	% Σχετική ένταση ταινιών απορρόφησης στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 1	% Σχετική ένταση ταινιών απορρόφησης στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 8	% Σχετική ένταση ταινιών απορρόφησης στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 14
617	0,025	0,038	0,078
644	0,053	0,045	0,093
675	0,023	0,034	0,059
780-760	0,010	0,011	0,017
831	0,110	0,174	0,284
925	0,047	0,042	0,061
1014	0,063	0,068	0,252
1045	0,019	0,025	-
1116	0,024	0,032	0,017
1157	0,006	0,006	-
1410-1360	0,563	0,561	0,755
1566	0,784	0,782	0,671
1647	0,013	0,018	0,007
1735	-	0,038	-
2935-2915	0,027	0,033	0,019
2976	0,031	0,033	0,013
3300	0,002	0,005	0,001
3630	-	0,005	-

Σύμφωνα, λοιπόν, με τους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 4.10 και 4.11), διαπιστώνεται πως και τα τρία εκχυλίσματα παρουσιάζουν πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο ανεξαρτήτως της αντιμικροβιακής τους δράσης. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με χρόνο εκχύλισης 24h, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50% w/v και pH 6,5 (συνθήκες εκχύλισης 14, Πίνακας 3.1) ήταν αυτό που εμφάνισε την υψηλότερη ένταση για τον δεσμό O-H (0,755) σε κυματαριθμό 1410-1360cm<sup>-1</sup>

που αντιπροσωπεύει τις ομάδες των φαινολών και των τριτογενών αλκοολών. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο αφού το δείγμα αυτό κατά τη δοκιμή της μεθόδου Folin-Ciocalteu κατείχε τη μέγιστη τιμή φαινολικών ενώσεων ίση με 0,365 mg GAE/g σπόρου (Πίνακας 4.1) και το μέγιστο ποσοστό αναστολής έναντι του *S. aureus* ίσο με 100% (Πίνακας 4.4) κατά τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης των πιπεριών, η οποία σχετίζεται με την ποσότητα των φαινολικών οξέων. Τα άλλα δύο εκχυλίσματα με συνθήκες εκχύλισης 1 (24h, 1,25% w/v, pH 5,5) και 8 (8h, 2,50% w/v, pH 5,5, Πίνακας 3.1) παρουσίασαν παρόμοιες μεταξύ τους εντάσεις (0,563 και 0,561 αντίστοιχα) οι οποίες να μεν ήταν γενικά αυξημένες ως τιμές, αλλά και εμφανώς μειωμένες σε σχέση με την ένταση του προαναφερόμενου εκχυλίσματος. Ωστόσο, όπως παρατηρήθηκε στον Πίνακα 4.4, τα εν λόγω εκχυλίσματα διαφοροποιούνται ως προς την ανασταλτική τους δράση κατά της *L. monocytogenes*. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανά να μην οφείλεται στην μόνο στην ποσότητα των φαινολικών ενώσεων όπως στην περίπτωση του *S. aureus*, αλλά να οφείλεται και στο είδος των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα με συνθήκες εκχύλισης 1 μπορεί να περιέχει αυξημένη ποσότητα φαινολικών οξέων, ενώ το εκχύλισμα με συνθήκες 8 μπορεί να είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή τα οποία δεν έχουν το ίδιο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με τα φαινολικά οξέα. Όμως, ο παραπάνω ισχυρισμός για να αποδειχθεί απαιτεί ταυτοποίηση των συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων μέσω εξειδικευμένων τεχνικών όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LC-MS).

Επιπλέον, πέρα από τις φαινολικές ενώσεις, και στα τρία εκχυλίσματα εμφανίζονται χαρακτηριστικές δονήσεις που αφορούν τον αρωματικό δακτύλιο, τα αμινοξέα, τους εστέρες και την καψαϊκίνη (ή πιπερίνη), η οποία χαρακτηρίζει τις κόκκινες πιπεριές *Capsicum annuum* προσδίδοντάς τους την μοναδική πικάντικη γεύση τους. Επίσης, παρατηρούνται δονήσεις τάσεις του δεσμού C-N των πρωτοταγών αμινών και δονήσεις κάμψεις ενός παρά-διυποκατεστημένου αρωματικού παράγωγου, οι οποίες είναι ιδιαίτερα αυξημένες (0,252 και 0,284 αντίστοιχα) στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 14. Μια ακόμα παρατήρηση που προκύπτει από τους πίνακες 4.10 και 4.11 αφορά τη δόνηση του αρωματικού δακτυλίου. Σε αντίθεση με όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις, η ένταση της δόνησης του αρωματικού δακτυλίου φαίνεται να είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στα δείγματα με συνθήκες εκχύλισης 1 και 8 (0,784 και 0,782) από ότι σε αυτό με τις συνθήκες 14 (0,671). Το γεγονός αυτό πιθανά να

μαρτυρά την ύπαρξη επιπλέον αρωματικών ενώσεων εκτός των φαινολικών στα εκχυλίσματα και χρήζει περαιτέρω μελέτης με άλλες τεχνικές. Επιπροσθέτως, δονήσεις όπως αυτές του αρωματικού C-O των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, και της πιπερίνης και του C-O σε συνδυασμό με τη δόνηση τάσης C-OH των υδατανθράκων δεν ανιχνεύτηκαν στο εκχύλισμα με συνθήκες εκχύλισης 14. Παρόλα αυτά, δεν γίνεται λόγος για απουσία των ενώσεων αυτών καθώς υπάρχουν άλλες ταινίες απορροφήσεων που μαρτυρούν την ύπαρξή τους (όπως στην περίπτωση της πιπερίνης η δόνηση τάσης του δεσμού C=O σε κυματαριθμό  $1647\text{ cm}^{-1}$ ). Πιθανά απλά οι ποσότητές τους στο συγκεκριμένο εκχύλισμα να είναι μειωμένες, γεγονός που μπορεί να επαληθευτεί με την εφαρμογή μιας ειδικότερης μεθόδου (π.χ. LC-MS). Τέλος, στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 8 εντοπίστηκαν δύο δονήσεις τάσεις που δεν εντοπίστηκαν στα άλλα δύο δείγματα. Αυτές αφορούν τους δεσμούς O-H (σε κυματαριθμό  $3630\text{ cm}^{-1}$ ) και C=O των εστέρων (σε κυματαριθμό  $1745\text{ cm}^{-1}$ ). Μάλιστα, όσον αφορά συγκεκριμένα τους εστέρες, οι συνθήκες του εκχυλίσματος 8 (8h, 2,50% w/v, pH=5,5) φαίνεται να ευνοούν την παραλαβή τους λόγω της προηγούμενης παρατήρησης σε συνδυασμό με τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O των εστέρων σε κυματαριθμό  $1116\text{ cm}^{-1}$  που εμφανίζεται αυξημένη σε σχέση με τα άλλα δύο εκχυλίσματα.

#### 4.5. Συμπεράσματα

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των σπόρων της πιπεριάς *Capsicum* με την χρήση βρώσιμων διαλυτών (τσίπουρου). Από τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum*:

- Το τσίπουρο αποδείχθηκε καλός διαλύτης για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου καθότι πέτυχε ικανοποιητικά αποτελέσματα (Πίνακας 4.1).
- Ο βέλτιστος συνδυασμός συνθηκών εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου ( $0,365\text{ mg GAE/g}$  σπόρου) ήταν: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων διαλύτη 2,50 % w/v, pH 6,5.
- Οι γραμμικοί όροι του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας σπόρων/διαλύτη, όπως και ο συνδυασμός των γραμμικών όρων του χρόνου εκχύλισης και του pH επηρεάζουν

σημαντικά το αποτέλεσμα με  $p$ -value= 0,034,  $p$ -value=0,007 και  $p$ -value= 0,022 αντίστοιχα.

- Οι συμβατικές τεχνικές απαιτούν μεγάλους χρόνους εκχύλισης εξαιτίας της απουσίας θερμοκρασίας και ενέργειας (επιταχυντήριοι παράγοντες εκχύλισης), για την μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.
- Η αύξηση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη οδηγεί σε αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου μέχρι το σημείο στο οποίο επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων (σπόρων και διαλύτη). Περαιτέρω αύξηση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη οδηγεί σε ανάκτηση λιγότερης ποσότητας φαινολικών.
- Το pH ως παράμετρος εκχύλισης δεν ασκεί σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα ( $p$ -value=0,662).

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum*:

- Τα εκχυλίσματα πιπεριάς εμφάνισαν ανασταλτική δράση κατά του *S. aureus* και της *L. monocytogenes*. Αντίθετα, ο *B.cereus* φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιεί τα εκχυλίσματα ως θρεπτικό υλικό προκειμένου να αναπτυχθεί.
- Η ικανότητα ανάπτυξης του *B.cereus* στα εκχυλίσματα πιπεριάς συνδέεται με την περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες (υπόστρωμα για ανάπτυξη βακτηρίων) και στην ύπαρξη γονιδίων στη πιπεριά που ενεργοποιεί την παραγωγή τοξινών του *B.cereus*.
- Οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης για την αναστολή ανάπτυξης του *S. aureus* και της *L. monocytogenes* διέφεραν. Για τον *S.aureus* βρέθηκαν δύο συνδυασμοί συνθηκών εκχύλισης που πέτυχαν το υψηλότερο ποσοστό αναστολής. Ο πρώτος είχε χρόνο εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50 % w/v και pH 6,5, ενώ ο δεύτερος είχε χρόνο εκχύλισης 8 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 5,00 % w/v και pH 6,5. Για την *L. monocytogenes* οι συνθήκες εκχύλισης που πέτυχαν το υψηλότερο ποσοστό αναστολής ήταν: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 1,25 % w/v και pH 5,5.
- Οι συνθήκες εκχύλισης του πειράματος 14 (χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,50 % w/v και pH 6,5) έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όσο και για την αναστολή δράσης του *S.aureus*.

- Οι συνθήκες εκχύλισης του πειράματος 5 (χρόνος εκχύλισης 8 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 5,00 % w/v και pH 6,5) αποδείχθηκαν οι καλύτερες για την αναστολή δράσης του *S.aureus* και ταυτόχρονα οι βέλτιστες για την ανάπτυξη του *B. cereus*.
- Τα εκχυλίσματα πιπεριάς εμφάνισαν διαφορετικά ποσοστά αναστολής για την *L. monocytogenes* και τον *S. aureus* (52,60% και 100% αντίστοιχα).
- Υψηλοί χρόνοι εκχύλισης παρουσίασαν καλύτερα αντιμικροβιακά αποτελέσματα στα εκχυλίσματα της πιπερίας *Capsicum*.
- Υψηλοί χρόνοι εκχύλισης δίνουν καλύτερα αποτελέσματα τόσο για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όσο και για την ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων κατά των *L. monocytogenes* και *S. aureus*.
- Η αναλογία σπόρων/διαλύτη επηρεάζει έμμεσα την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων μέσω της επίδρασης που έχει στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.
- Το pH αποτελεί μικροβιολογική παράμετρο που επηρεάζει την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών. Γενικά, σε τιμές pH<4,0 δεν παρατηρείται βακτηριακή δραστηριότητα.

Από την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα τρία δείγματα με συνθήκες εκχύλισης 1, 8 και 14 παρουσιάζουν πλούσιο φαινολικό περιεχόμενο.
- Το δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 14 εμφάνισε την υψηλότερη ένταση για τον δεσμό O-H (0,755) σε κυματαριθμό 1410-1360  $\text{cm}^{-1}$  που αντιπροσωπεύει τις ομάδες των φαινολών και των τριτογενών αλκοολών.
- Τα δείγματα με συνθήκες εκχύλισης 1 και 8 παρά τις παραπλήσιες τιμές εντάσεων που αφορούν την ταινία του δεσμού O-H δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη ανασταλτική δράση κατά της *L.monocytogenes*. Η διαφορά αυτή πιθανώς δεν οφείλεται στη ποσότητα των φαινολικών ενώσεων αλλά στο είδος των εμπριεχομένων φαινολικών ενώσεων.
- Τα τρία δείγματα με συνθήκες εκχύλισης 1, 8 και 14 εμφανίζουν χαρακτηριστικές δονήσεις που αφορούν τις αρωματικές ενώσεις, τα αμινοξέα, τις αμίνες, τους εστέρες και την καψαϊκίνη.



- Στο δείγμα με συνθήκες εκχύλισης 8 εντοπίστηκαν δύο δονήσεις των δεσμών O-H και C=O των εστέρων που δεν ανιχνεύτηκαν στα άλλα δύο δείγματα.

#### 4.6. Μελλοντικοί στόχοι

Από τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής θέτονται ορισμένοι μελλοντικοί στόχοι για περαιτέρω μελέτη και κατανόηση της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων της κόκκινης πιπεριάς *Capsicum*. Πιο συγκεκριμένα:

- Μελέτη και άλλων αλκοολούχων αποσταγμάτων για πιθανή χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων ως διαλύτες για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. βότκα, τζίν κτλ).
- Μελέτη επιπρόσθετων παραμέτρων εκχύλισης (π.χ. θερμοκρασία, συγκέντρωση διαλύτη).
- Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Capsicum* σε παραπάνω στελέχη βακτηρίων που παίζουν ρόλο στην αλλοίωση των τροφίμων (π.χ. *Salmonella*, *E. coli*).
- Δημιουργία πειραματικού μοντέλου που να μελετά την ανάπτυξη του *B. cereus* στα εκχυλίσματα της πιπεριάς *Capsicum*, εφόσον βρέθηκε ότι συμβάλουν στην ανάπτυξη του.
- Ταυτοποίηση ενώσεων με εξειδικευμένες τεχνικές (π.χ. LC-MS) για τη δημιουργία του φυτοχημικού προφίλ της κόκκινης πιπεριάς *Capsicum*.

## BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

- A, El Kaaby Ekhlas, and Al Hattab Zahra N. and Al-Anny Jenan A. 2016. 'FT-IR Identification of Capsaicin from Callus and Seedling of Chilli Pepper Plants *Capsicum Annuum* L. in Vitro.' *International Journal of Multidisciplinary and Current Research* Vol.4 (Nov-Dec-2016). <http://ijmcr.com/ft-ir-identification-of-capsaicin-from-callus-and-seedling-of-chilli-pepper-plants-capsicum-annuum-l-in-vitro/>.
- Alvarez-Rivera, Gerardo, Monica Bueno, Diego Ballesteros-Vivas, Jose A. Mendiola, and Elena Ibañez. 2020. 'Chapter 13 - Pressurized Liquid Extraction'. In *Liquid-Phase Extraction*, edited by Colin F. Poole, 375–98. Handbooks in Separation Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>.
- Anaya-Esparza, Luis Miguel, Zuamí Villagrán-de la Mora, Olga Vázquez-Paulino, Felipe Ascencio, and Angélica Villarruel-López. 2021. 'Bell Peppers (*Capsicum Annuum* L.) Losses and Wastes: Source for Food and Pharmaceutical Applications'. *Molecules* 26 (17): 5341. <https://doi.org/10.3390/molecules26175341>.
- Asnin, L., and S. W. Park. 2015. 'Isolation and Analysis of Bioactive Compounds in Capsicum Peppers'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55 (2): 254–89. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.652316>.
- Bacon, Karleigh, Renee Boyer, Cynthia Denbow, Sean O'Keefe, Andrew Neilson, and Robert Williams. 2017. 'Antibacterial Activity of Jalapeño Pepper (*Capsicum Annuum* Var. *Annuum*) Extract Fractions against Select Foodborne Pathogens'. *Food Science & Nutrition* 5 (3): 730–38. <https://doi.org/10.1002/fsn3.453>.
- Bimakr, Mandana, Russly Abdul Rahman, Farah Saleena Taip, Ali Ganjloo, Liza Md Salleh, Jinap Selamat, Azizah Hamid, and I. S. M. Zaidul. 2011. 'Comparison of Different Extraction Methods for the Extraction of Major Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha Spicata* L.) Leaves'. *Food and Bioproducts Processing* 89 (1): 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>.
- Bostanci, Hüseyin, Selçuk Ok, and Emin Yilmaz. 2019. 'Valorization of Capia Pepperseed Flour-I: Spreadable New Products Development'. *Waste and Biomass Valorization* 10 (3): 681–90. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0139-z>.
- Caldas, Thais W., Karen E. L. Mazza, Aline S. C. Teles, Gabriela N. Mattos, Ana Iraidy S. Brígida, Carlos A. Conte-Junior, Renata G. Borguini, Ronoel L. O. Godoy, Lourdes M. C. Cabral, and Renata V. Tonon. 2018. 'Phenolic Compounds Recovery from Grape Skin Using Conventional and Non-Conventional Extraction Methods'. *Industrial Crops and Products* 111 (January): 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>.
- Carvalho Lemos, Virgínia, Julia Jessica Reimer, and Alexandra Wormit. 2019. 'Color for Life: Biosynthesis and Distribution of Phenolic Compounds in Pepper (*Capsicum Annuum*)'. *Agriculture* 9 (4): 81. <https://doi.org/10.3390/agriculture9040081>.

- Cvetković, Tanja, Jasmina Ranilović, and Stela Jokić. 2022. 'Quality of Pepper Seed By-Products: A Review'. *Foods* 11 (5): 748. <https://doi.org/10.3390/foods11050748>.
- Dekebo, Aman. 2020. *Capsicum*. BoD – Books on Demand.
- 'Different Methods of Extraction Pharmaceuticals Notes | The Pharmapedia'. 2022. 13 July 2022. <https://thepharmapedia.com/different-methods-of-extraction-pharmaceuticals/pharmacy-notes/>.
- Durakovic, Benjamin. 2017. 'Design of Experiments Application, Concepts, Examples: State of the Art'. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences (PEN)* 5 (3). <https://doi.org/10.21533/pen.v5i3.145>.
- E, DR.Adewole. 2022. 'Identification of Amino Acids and B-Vitamins in Scotch Bonnet Pepper (*Capsicum Chinense*) Using an HPLC-UV Detector', January, 89–111.
- 'European Commission, Official Website'. n.d. Accessed 10 June 2023. [https://commission.europa.eu/index\\_en](https://commission.europa.eu/index_en).
- Ferrentino, Giovanna, Sebastiano Giampiccolo, Ksenia Morozova, Nabil Haman, Sara Spilimbergo, and Matteo Scampicchio. 2020. 'Supercritical Fluid Extraction of Oils from Apple Seeds: Process Optimization, Chemical Characterization and Comparison with a Conventional Solvent Extraction'. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 64 (August): 102428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102428>.
- 'Functional Food Ingredients Market Size, Trends, Analysis by 2026'. n.d. MarketsandMarkets. Accessed 3 March 2023. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/functional-food-ingredients-market-9242020.html>.
- Gao, Yuan, Shengfang Wang, Shikun Dang, Shulan Han, Cholil Yun, Wenjie Wang, and Huimei Wang. 2021. 'Optimized Ultrasound-Assisted Extraction of Total Polyphenols from *Empetrum Nigrum* and Its Bioactivities'. *Journal of Chromatography B* 1173 (May): 122699. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122699>.
- Geow, Chin Hong, Mei Ching Tan, Swee Pin Yeap, and Nyuk Ling Chin. 2021. 'A Review on Extraction Techniques and Its Future Applications in Industry'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 123 (4): 2000302. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000302>.
- Gómez-Mejía, Esther, Noelia Rosales-Conrado, María Eugenia León-González, and Yolanda Madrid. 2019. 'Citrus Peels Waste as a Source of Value-Added Compounds: Extraction and Quantification of Bioactive Polyphenols'. *Food Chemistry* 295 (October): 289–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.136>.
- Gonelimali, Faraja D., Jiheng Lin, Wenhua Miao, Jinghu Xuan, Fedrick Charles, Meiling Chen, and Shaimaa R. Hatab. 2018. 'Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms'. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01639>.

- Gurnani, Neelam, Madhu Gupta, Darshana Mehta, and Bhupendra Kumar Mehta. 2016. 'Chemical Composition, Total Phenolic and Flavonoid Contents, and in Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Crude Extracts from Red Chilli Seeds (*Capsicum Frutescens* L.)'. *Journal of Taibah University for Science* 10 (4): 462–70. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.011>.
- Helkar, Prathamesh, and AK Sahoo. 2016. 'Review: Food Industry By-Products Used as a Functional Food Ingredients'. *International Journal of Waste Resources* 6 (January). <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000248>.
- Hernández-Pérez, Talía, María Del Rocío Gómez-García, María Elena Valverde, and Octavio Paredes-López. 2020. 'Capsicum Annuum (Hot Pepper): An Ancient Latin-American Crop with Outstanding Bioactive Compounds and Nutraceutical Potential. A Review'. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (6): 2972–93. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12634>.
- Hleba, Lukas, Jana Petrová, Rafal Kordiak, Attila Kántor, Juraj Čuboň, Maciej Kluz, Mohammad Ali Shariati, and Miroslava Kacaniova. 2015. 'Antibacterial Activity of Habanero Chili Sauces against Selected Pathogenic Bacteria' 2015 (June).
- Idrees, Saba, Muhammad Asif Hanif, Muhammad Adnan Ayub, Asma Hanif, and Tariq Mahmood Ansari. 2020. 'Chapter 9 - Chili Pepper'. In *Medicinal Plants of South Asia*, edited by Muhammad Asif Hanif, Haq Nawaz, Muhammad Mumtaz Khan, and Hugh J. Byrne, 113–24. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00009-4>.
- 'Is a Pepper a Fruit or a Vegetable and Why?' n.d. Accessed 30 June 2023. <https://www.eufic.org/en/healthy-living/article/is-a-pepper-a-fruit-or-a-vegetable-and-why>.
- Jankovic, Aleksandar, Gaurav Chaudhary, and Francesco Goia. 2021. 'Designing the Design of Experiments (DOE) – An Investigation on the Influence of Different Factorial Designs on the Characterization of Complex Systems'. *Energy and Buildings* 250 (November): 111298. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>.
- Jovanović, Aleksandra A., Verica B. Djordjević, Predrag M. Petrović, Dejan S. Pljevljakušić, Gordana M. Zdunić, Katarina P. Šavikin, and Branko M. Bugarski. 2021. 'The Influence of Different Extraction Conditions on Polyphenol Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wild Thyme'. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 25 (December): 100328. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100328>.
- Jr, Valdir Florencio da Veiga, Larissa Silveira Moreira Wiedemann, Claudio Pereira de Araujo Jr, and Ananda da Silva Antonio. 2022. *Chemistry and Nutritional Effects of Capsicum*. Royal Society of Chemistry.
- Leng, Zexing, Biming Zhong, Hanjing Wu, Ziyao Liu, Abdur Rauf, Sami Bawazeer, and Hafiz Suleria. 2022. 'Identification of Phenolic Compounds in Australian Grown Bell Peppers

- by LC-ESI-QTOF-MS/MS and Estimation of Their Antioxidant Potential'. *ACS Omega*, January. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06532>.
- Ligor, Magdalena, Ileana-Andreea Ratiu, Anna Kiełbasa, Hossam Al-Suod, and Bogusław Buszewski. 2018. 'Extraction Approaches Used for the Determination of Biologically Active Compounds (Cyclitols, Polyphenols and Saponins) Isolated from Plant Material'. *ELECTROPHORESIS* 39 (15): 1860–74. <https://doi.org/10.1002/elps.201700431>.
- Lim, Kramer Joseph A., Alden A. Cabajar, Camila Flor Y. Lobarbio, Evelyn B. Taboada, and Daniel J. Lacks. 2019. 'Extraction of Bioactive Compounds from Mango (*Mangifera Indica* L. Var. Carabao) Seed Kernel with Ethanol–Water Binary Solvent Systems'. *Journal of Food Science and Technology* 56 (5): 2536–44. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03732-7>.
- Loizzo, Monica R., Alessandro Pugliese, Marco Bonesi, Francesco Menichini, and Rosa Tundis. 2015. 'Evaluation of Chemical Profile and Antioxidant Activity of Twenty Cultivars from *Capsicum Annuum*, *Capsicum Baccatum*, *Capsicum Chacoense* and *Capsicum Chinense*: A Comparison between Fresh and Processed Peppers'. *LWT - Food Science and Technology* 64 (2): 623–31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.042>.
- López-Bascón, M. A., and M. D. Luque de Castro. 2020. 'Chapter 11 - Soxhlet Extraction'. In *Liquid-Phase Extraction*, edited by Colin F. Poole, 327–54. Handbooks in Separation Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>.
- LU, Anikwe, Uwakwe Onoja, Christopher Onyeke, and Emeka Nweze. 2017. 'Antimicrobial Activities of Four Varieties of *Capsicum Annuum* Fruits Cultivated in Southeast Nigeria against Multidrug-Resistant and Susceptible Organisms'. *JOURNAL OF BASIC PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY* 1 (April): 21–26.
- Marić, Mirela, Antonela Ninčević Grassino, Zhenzhou Zhu, Francisco J. Barba, Mladen Brnčić, and Suzana Rimac Brnčić. 2018. 'An Overview of the Traditional and Innovative Approaches for Pectin Extraction from Plant Food Wastes and By-Products: Ultrasound-, Microwaves-, and Enzyme-Assisted Extraction'. *Trends in Food Science & Technology* 76 (June): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>.
- Mohammad Salamatullah, Ahmad, Khizar Hayat, Fohad Mabood Husain, Mohammed Asif Ahmed, Shaista Arzoo, Mohammed MUSAAD Althbiti, Abdulhakeem Alzahrani, et al. 2022. 'Effects of Different Solvents Extractions on Total Polyphenol Content, HPLC Analysis, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Properties of Peppers (Red, Yellow, and Green (*Capsicum Annum* L.))'. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022 (January): e7372101. <https://doi.org/10.1155/2022/7372101>.
- Montgomery, Douglas C. 2017. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.
- Montoya-Ballesteros, L., Alberto Gonzalez Leon, Miguel García-Alvarado, and G. Rodriguez-Jimenes. 2014. 'Bioactive Compounds During Drying of Chili Peppers'. *Drying Technology* 32 (September). <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.902381>.

- Nadar, Shamraja S., Priyanka Rao, and Virendra K. Rathod. 2018. 'Enzyme Assisted Extraction of Biomolecules as an Approach to Novel Extraction Technology: A Review'. *Food Research International* 108 (June): 309–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>.
- Nandiyanto, Asep Bayu Dani, Rosi Oktiani, and Risti Ragadhita. 2019. 'How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material'. *Indonesian Journal of Science and Technology* 4 (1): 97–118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>.
- Ortintero, Cesar, Rosalie Rafael, Charmaine Eljie Rayos, Katherine Bautista, Mark Aldren Feliciano, Lexter Natividad, and Gaudencio Natividad. 2021. 'Distilled Spirit Extraction of Phenolic Antioxidants from Fruit and Vegetable Residues'. *Journal of Ecological Engineering* 22 (1): 125–31. <https://doi.org/10.12911/22998993/128864>.
- Osorio-Tobón, J. Felipe. 2020. 'Recent Advances and Comparisons of Conventional and Alternative Extraction Techniques of Phenolic Compounds'. *Journal of Food Science and Technology* 57 (12): 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>.
- Panja, Palash. 2018. 'Green Extraction Methods of Food Polyphenols from Vegetable Materials'. *Current Opinion in Food Science, Food Engineering & Processing part 1 \* Food Engineering & Processing part 2 \* Food Mycology*, 23 (October): 173–82. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>.
- Park, Kyung Min, Mooncheol Jeong, Kee Jai Park, and Minseon Koo. 2018. 'Prevalence, Enterotoxin Genes, and Antibiotic Resistance of *Bacillus Cereus* Isolated from Raw Vegetables in Korea'. *Journal of Food Protection* 81 (10): 1590–97. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-205>.
- Pham, Tri Nhut, Van Thuy Nguyen, Tran Quoc Toan, Mai Huynh Cang, Long Giang Bach, and Nguyen Van Muoi. 2020. 'Effects of Various Processing Parameters on Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Activities of *Codonopsis Javanica* Root Extract'. *Natural Product Communications* 15 (9): 1934578X20953276. <https://doi.org/10.1177/1934578X20953276>.
- Rasul, Mohammed Golam. 2018. 'Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Their Advantages and Disadvantages' 2 (6).
- Roselló-Soto, Elena, Francisco J. Martí-Quijal, Antonio Cilla, Paulo E. S. Munekata, Jose M. Lorenzo, Fabienne Remize, and Francisco J. Barba. 2019. 'Influence of Temperature, Solvent and PH on the Selective Extraction of Phenolic Compounds from Tiger Nuts by-Products: Triple-TOF-LC-MS-MS Characterization'. *Molecules* 24 (4): 797. <https://doi.org/10.3390/molecules24040797>.
- Safdar, Muhammad Naeem, Tusneem Kausar, and Muhammad Nadeem. 2017. 'Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel'. *Journal of Food Processing and Preservation* 41 (4): e13028. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13028>.

- Sahu, Mamta, and Shashi Bala. 2017. 'Food Processing, Food Spoilage and Their Prevention: An Overview'. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research* 3 (1). <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.1.1>.
- Saini, Ramesh Kumar, and Young-Soo Keum. 2016. 'GC–MS and HPLC–DAD Analysis of Fatty Acids and Tocopherols in Sweet Peppers (*Capsicum Annuum* L.)'. *Journal of Food Measurement and Characterization* 10 (3): 685–89. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9352-x>.
- Sevindik, Mustafa, and Imran Uysal. 2021. 'Food Spoilage and Microorganisms'. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 9 (10): 1921–24. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i10.1921-1924.4658>.
- Sharif, Faez, and Muhd Bennett. 2016. 'The Effect of Different Methods and Solvents on the Extraction of Polyphenols in Ginger (*Zingiber Officinale*)'. *Jurnal Teknologi* 78 (November). <https://doi.org/10.11113/jt.v78.9943>.
- Sik, Beatrix, Erika Lakatos Hanczné, Viktória Kapcsándi, and Zsolt Ajtony. 2020. 'Conventional and Nonconventional Extraction Techniques for Optimal Extraction Processes of Rosmarinic Acid from Six Lamiaceae Plants as Determined by HPLC-DAD Measurement'. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 184 (May): 113173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>.
- Silva, Luís R., Jessica Azevedo, Maria J. Pereira, Patrícia Valentão, and Paula B. Andrade. 2013. 'Chemical Assessment and Antioxidant Capacity of Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Seeds'. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 53 (March): 240–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.036>.
- Sobolev, Anatoly P., Luisa Mannina, Donatella Capitani, Gabriella Sanzò, Cinzia Ingallina, Bruno Botta, Simonetta Fornarini, et al. 2018. 'A Multi-Methodological Approach in the Study of Italian PDO "Cornetto Di Pontecorvo" Red Sweet Pepper'. *Food Chemistry* 255 (July): 120–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.050>.
- Sridhar, Adithya, Muthamilselvi Ponnuchamy, Ponnusamy Senthil Kumar, Ashish Kapoor, Dai-Viet N. Vo, and Sivaraman Prabhakar. 2021. 'Techniques and Modeling of Polyphenol Extraction from Food: A Review'. *Environmental Chemistry Letters* 19 (4): 3409–43. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>.
- Taşkın, Bilge, and Zeynep Aksoylu Özbek. 2020. 'Optimisation of Microwave Effect on Bioactives Contents and Colour Attributes of Aqueous Green Tea Extracts by Central Composite Design'. *Journal of Food Measurement and Characterization* 14 (4): 2240–52. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00471-8>.
- Teixeira de Souza Sora, Gisele, Aloisio Souza, Acácio Zielinski, Charles Haminiuk, Makoto Matsushita, and Rosane Peralta. 2015. 'Fatty Acid Composition of *Capsicum* Genus

- Peppers'. *Ciência e Agrotecnologia* 39 (August): 372–80. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000400008>.
- Tejeda, Leslie, Pamela Iriarte, Jimena Ortiz, Enzo Aliaga- Rossel, Patricia Mollinedo, and Mauricio Peñarrieta. 2022. 'Characterization of Bolivian Chili Peppers; Antioxidant Capacity, Total Phenolic Compounds, Capsaicin and b-Carotene Concentration'. *Nutrition & Food Science* 30 (April). <https://doi.org/10.1108/NFS-11-2021-0341>.
- Thuphairo, Kantamane, Puttacha Sornchan, and Uthaiwan Suttisansanee. 2019. 'Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Inhibition of Key Enzymes Relevant to Alzheimer's Disease from Sweet Pepper (*Capsicum Annuum*) Extracts'. *Preventive Nutrition and Food Science* 24 (3): 327–37. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.327>.
- Torres-León, Cristian, Nathiely Ramírez-Guzman, Liliana Londoño-Hernandez, Gloria A. Martinez-Medina, Rene Díaz-Herrera, Víctor Navarro-Macias, Olga B. Alvarez-Pérez, et al. 2018. 'Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries'. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2018.00052>.
- Turkmen, Nihal, Y. Sedat Velioglu, Ferda Sari, and Gokce Polat. 2007. 'Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea'. *Molecules* 12 (3): 484–96. <https://doi.org/10.3390/12030484>.
- Wilde, Amelie S., Simon A. Haughey, Pamela Galvin-King, and Christopher T. Elliott. 2019. 'The Feasibility of Applying NIR and FT-IR Fingerprinting to Detect Adulteration in Black Pepper'. *Food Control* 100 (June): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.039>.
- Zamljen, Tilen, Aljaž Medič, Robert Veberič, Metka Hudina, Jerneja Jakopič, and Ana Slatnar. 2022. 'Metabolic Variation among Fruits of Different Chili Cultivars (*Capsicum* Spp.) Using HPLC/MS'. *Plants* 11 (1): 101. <https://doi.org/10.3390/plants11010101>.
- Zhao, Cai-Ning, Jiao-Jiao Zhang, Ya Li, Xiao Meng, and Hua-Bin Li. 2018. 'Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma Sanguineum* Fruit: Optimization and Identification'. *Molecules* 23 (10): 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules23102498>.
- Zhao, Ping, Jean Pierre Ndayambaje, Xiao Liu, and Xingxing Xia. 2022. 'Microbial Spoilage of Fruits: A Review on Causes and Prevention Methods'. *Food Reviews International* 38 (sup1): 225–46. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1858859>.
- Άννα Αναγνωστοπούλου, and Αικατερίνη Ταλέλλη. 2008. *Τεχνολογία Και Ποιότητα Φρούτων Και Λαχανικών*. Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών.
- Κουτζεκίδου-Ρούκα Π., Κουτζεκιδου-Ρούκα Π. 2016. *Μικροβιολογία-Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων*.



ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΦΗ. 2020. *ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΕΣ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕ ΤΟ SPSS.*  
ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΝΕΩΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ.

ΤΣΑΚΝΗΣ ΓΙΑΝΝΗΣ, ΓΡΗΓΟΡΑΚΗΣ ΚΡΙΤΩΝ. 2014. *ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.*  
ΠΑΠΑΣΩΤΗΡΙΟΥ.