



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

«Μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των πράσινων πιπεριών (*Jalapeños*) του γένους *Capsicum* annum με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και χαρακτηρισμός του φυτοχημικού προφίλ με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS)»



ΔΗΜΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ, ΜΑΤΣΑ ΝΑΤΑΛΙΑ

A.M.: 19684155, 19684056

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 green peppers (Jalapeños) of the Capsicum annum using experimental design models and characterization of the phytochemical profile by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ».

DIMA DESPOINA, MATSA NATALIA

R.N.: 19684155, 19684056

Supervisor:

THALIA TSIAKA

Athens, July 2023



Πτυχιακή Εργασία

«Μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των πράσινων πιπεριών (*Jalapeño*) του γένους *Capsicum annuum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και χαρακτηρισμός του φυτοχημικού προφίλ με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS)»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

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

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

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Δέσποινα Δημά του Δημητρίου και Ναταλία Μάτσα του Χρήστου με αριθμό μητρώου 19684455 και 19684056 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

Η Δηλούσα

Δέσποινα

Ναταλία

Δημά

Μάτσα



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Έχοντας ολοκληρώσει την πτυχιακή μας εργασία θα θέλαμε πρωτίστως να ευχαριστήσουμε την υπεύθυνη καθηγήτρια Δρ. Θάλεια Τσιάκα, για την εμπιστοσύνη, την υπομονή της, την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μας παρείχε καθ'όλη την διάρκεια της παρούσας πτυχιακής μελέτης, όσο και για την παροχή των εργαστηρίων στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Επιπλέον, 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 επίσης και για την μετέπειτα επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θέλουμε να εκφράσουμε ένα μεγάλο ευχαριστώ στις οικογένειες και στους φίλους μας, για την αγάπη, τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους, καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.

Δέσποινα – Ναταλία

Σεπτέμβριος 2023

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας εστιάζει στην μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των πράσινων πιπεριών (*Jalapeño*) του γένους *Capsicum annuum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και τον χαρακτηρισμό του φυτοχημικού προφίλ με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (LC-MS), ώστε να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικοί παράγοντες σε προϊόντα τροφίμων. Στην αρχή της εργασίας αυτής έγινε αναφορά στις ιδιότητες των παραπροϊόντων της πιπερίας *Jalapeño*. Έπειτα έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση στις βασικές μεθόδους προσδιορισμού και εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων, κυρίως των φαινολικών ενώσεων, καθώς και στη χρήση των αλκοολούχων αποσταγμάτων, όπως είναι το τσίπουρο, ως διαλύτες για εκχύλιση αυτών των ενώσεων. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας υποδεικνύει πως η χρήση αλκοολούχων αποσταγμάτων αποτελεί μια καινοτόμα εδώδιμη εναλλακτική επιλογή για την αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών. Στην συνέχεια έγινε αναφορά στους μελετούμενους μικροοργανισμούς (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Listeria monocytogenes*) που δημιουργούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και σχετίζονται σημαντικά με την ασφάλεια των τροφίμων. Κατά το πειραματικό μέρος, έγινε βελτιστοποίηση τριών επιλεγμένων παραγόντων εκχύλισης (χρόνος, θερμοκρασία, pH) για την παραλαβής εκχυλισμάτων μέγιστου φαινολικού περιεχομένου από σπόρους πιπεριάς *Jalapeño* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού. Ακόμη, μελετήθηκε η δράση εκχυλισμάτων στην αναστολή των υπό εξέταση μικροοργανισμών (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Listeria monocytogenes*) με την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης που προκαλούν αυξημένη αναστολή για κάθε μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα των σπόρων *Jalapeño* συνέβαλαν στην ανάπτυξη και όχι στην αναστολή του *B.cereus* και του *S. aureus*, ενώ έδρασαν πιο αποτελεσματικά για την αναστολή κατά της *L. monocytogenes*. Τέλος, αξιολογήθηκε το φυτοχημικό προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματοφωτομετρίας μάζας, ώστε να συσχετιστεί το προφίλ βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων με την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των εξεταζόμενων μικροοργανισμών.

Λέξεις κλειδιά: παραπροϊόντα τροφίμων, εκχυλίσματα πιπεριάς *Jalapeño*, σπόροι πιπεριάς, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιμικροβιακή δράση, εδώδιμοι διαλύτες εκχύλισης

ABSTRACT

The topic of this thesis focuses on the study of the antimicrobial and antioxidant activity of green peppers (Jalapeños) of the genus *Capsicum annuum* using experimental design models and the characterization of the phytochemical profile by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), in order to be used in the food industry as enhancers in food products. At the beginning of this work, the properties of by-products of Jalapeños pepper were reported. A literature review was then conducted on the basic methods for the determination and extraction of bioactive compounds, mainly phenolic compounds, and the use of alcoholic distillates, such as tsipouro, as solvents for the extraction of these compounds. The review of the literature suggests that the use of alcoholic distillates is an innovative edible alternative to replace organic solvents. The studied microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*) that cause food spoilage and are significantly related to food safety were discussed. In the experimental part, three selected extraction factors (time, temperature, pH) were optimized for obtaining extracts of maximum phenolic content from Jalapeños pepper seeds using experimental design models. Furthermore, the effect of extracts on the inhibition of the microorganisms under investigation (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*) was studied by finding the optimal extraction conditions that cause increased inhibition for each microorganism. Specifically, Jalapeños seed extracts contributed to the growth rather than inhibition of *B. cereus* and *S. aureus*, while acting more effectively for inhibition against *L. monocytogenes*. Finally, the phytochemical profile of selected extracts was evaluated using liquid chromatography-mass spectrophotometry to correlate the bioactive compound profile of the extracts with their antimicrobial activity against the tested microorganisms.

Key words: food by-products, Jalapeños pepper extracts, pepper seeds, total phenolic content, antimicrobial activity, edible extraction solvents

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΡΑΒΔΟΓΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	14
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1.1. ΠΙΠΕΡΙΑ JALAPEN΄ΟΣ	14
1.2. ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ/ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	16
1.2.1. ΜΕΡΗ - ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	18
1.3.1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	22
1.3.2. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	23
1.3.3. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	25
1.3.4. ΚΑΨΑΙΚΙΝΟΕΙΔΗ	25
1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΙΠΕΡΙΑΣ JALAPEN΄ΟΣ	27
1.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΙΠΕΡΙΑΣ JALAPEN΄ΟΣ	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	29
ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΟ	29
2.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	29
2.1. ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	29
2.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.1.3. <i>Bacillus cereus</i>	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	32
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	32
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	32
3.1. ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (conventional methods)	33
3.1.1. Μέθοδος Soxhlet	33
3.1.2. Διαβροχή (Maceration extraction method)	34
3.1.3. Έγχυση (infusion)	34
3.1.4. Μέθοδος βρασμού (Decoction extraction method)	35
3.2. ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (Non-conventional methods)	35
3.2.1. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound assisted method)	35
3.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction)	36
3.2.3. Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical fluid extraction)	36

3.3.	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	37
3.4.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	38
3.5.	ΑΛΚΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ ΩΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ/ ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ.....	39
3.6.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	39
3.7.	ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ (Design Of Experiments).....	40
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	42
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	43
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	43
4.	Προετοιμασία δείγματος.....	43
4.1.	Πειραματική Πορεία	44
4.1.1.	Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου – Μέθοδος Folin Ciocalteu	46
4.1.2.	Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης – Μέτρηση με Bioscreen	46
4.1.3.	Προσδιορισμός φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριάς Jalapeño os	47
4.2.	Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού Box –Behnken	48
4.3.	Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων	49
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	51
5.	Βελτιστοποίηση εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού	51
5.1.	Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς Jalapeño ενάντια στους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.....	57
5.1.1.	Bacillus cereus	57
5.1.2.	Staphylococcus aureus.....	62
5.1.3.	Listeria monocytogenes	67
5.2.	Βιβλιογραφική σύγκριση επίδρασης πειραματικών συνθηκών εκχύλισης στο φαινολικό περιεχόμενο και στον προσδιορισμό αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων της πιπεριάς Jalapeño os	72
5.3.	Φασματομετρία μάζας (LC-MS).....	75
5.4.	Συμπεράσματα.....	82
5.5.	Μελλοντικοί στόχοι.....	84
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1. 1: πράσινη πιπεριά Jalapeño.....	14
Εικόνα 1. 2: Πηγή των πιο χρησιμοποιούμενων υποπροϊόντων φρούτων και λαχανικών σε εμπλουτισμένα προϊόντα διατροφής (n = 101).....	18
Εικόνα 1. 3: Βασικά μέρη του καρπού πιπεριάς.....	19
Εικόνα 1. 4:(α) Υποπροϊόν που ανακτάται από τη βιομηχανία (β) Ξεπλυμένο και αποθηκευμένο υποπροϊόν. (γ) Βιομηχανικό υποπροϊόν υπό ανάδευση. (δ) Στεγνώνεται σε φούρνο με θερμαινόμενο αέρα. (ε) Προσδιορισμός υγρασίας και ενεργότητας ύδατος (στ) Συστατικό έτοιμο προς χρήση.....	20
Εικόνα 1. 5: Γενικές δομές διαφορετικών κατηγοριών φαινολικών ενώσεων (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ταννίνες).....	23
Εικόνα 1. 6: Χαρακτηριστικά καροτενοειδή. Αριστερά: καροτένια Δεξιά: ξανθοφύλλες.....	24
Εικόνα 1. 7 Ειδική αρίθμηση ανθράκων που εφαρμόζεται στα καροτενοειδή (εδώ γίνεται στο μόριο του λυκοπενίου).	24
Εικόνα 1. 8: Περιεχόμενη ποσότητα κάποιων βιταμινών ανάλογα την ωριμότητα της πιπεριάς.....	25
Εικόνα 1. 9: Χημική δομή καψαϊκίνης.....	25
Εικόνα 3. 1: Μέθοδοι εκχύλισης.....	33
Εικόνα 2. 2: Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet.....	33
Εικόνα 3. 3: Μέθοδος εκχύλισης Διαβροχή.....	34
Εικόνα 3. 4: Μέθοδος εκχύλισης βρασμού.....	35
Εικόνα 3. 6: Εκχύλιση με μικροκύματα.....	36
Εικόνα 2. 5: Εκχύλιση με υπέρηχους.....	35
Εικόνα 4. 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας.....	45
Εικόνα 4. 2: Αντίδραση φαινολικών ενώσεων και αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (a), παρατηρούμενες χρωματικές αλλαγές (b).....	46
Εικόνα 4. 3: Απεικόνιση χειρισμού της μεθόδου Bioscreen C στο εργαστήριο.....	47
Εικόνα 5. 1: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς Jalapeño.....	80
Εικόνα 5. 2: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς Jalapeño, έχοντας αφαιρεθεί οι 3 με τις πιο μεγάλες εντάσεις.....	80

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. 1: Ποσοστό απορριμάτων σε διάφορα φρούτα και λαχανικά.....	17
Πίνακας 1. 2:Ενδεικτικός πίνακας εμπειροχόμενων βιοδραστικών ενώσεων στους σπόρους πράσινης πιπεριάς Jalapeño.....	26
Πίνακας 1. 3: Βιολογική δράση πιπεριών.....	28
Πίνακας 2. 4: Έρευνες αντιμικροβιακής δράσης κατά των μελετούμενων μικροοργανισμών.....	32
Πίνακας 3. 1: Μέθοδοι εκχύλισης πιπεριών.....	38

Πίνακας 3. 2: Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων.....	40
Πίνακας 3. 3: Εφαρμογές μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού	41
Πίνακας 4. 1: Πειραματικές συνθήκες διεξαγωγής εκχύλισεων	43
Πίνακας 4. 2: Επίπεδα τιμών 3 παραγόντων	48
Πίνακας 5. 1: Πειραματικά δεδομένα φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων	51
Πίνακας 5. 2: Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο	52
Πίνακας 5. 3: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικού περιεχομένου	56
Πίνακας 5. 4.: Ποσοστά αναστολής μικροοργανισμών στα εκχυλίσματα πιπεριάς Jalapeño	57
Πίνακας 5. 5: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής κατά του <i>B. cereus</i>	58
Πίνακας 5. 6: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>B.cereus</i>	61
Πίνακας 5. 7: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>S.aureus</i>	63
Πίνακας 5. 8: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>S. aureus</i>	66
Πίνακας 5. 9: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>L. monocytogenes</i>	68
Πίνακας 5. 10: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>L. monocytogenes</i>	71
Πίνακας 5. 11: Συνθήκες εκχύλισης υψηλότερων και χαμηλότερων εκχυλισμάτων	75
Πίνακας 5. 12: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με ονομασία	76

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 5. 1.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (pH και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	54
Διάγραμμα 5. 2.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	54
Διάγραμμα 5. 3.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.....	55
Διάγραμμα 5. 4.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (χρόνος εκχύλισης και pH) για την αναστολή του <i>B. cereus</i>	59
Διάγραμμα 5. 5.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του <i>B. Cereus</i>	60
Διάγραμμα 5. 6.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του <i>B. cereus</i>	60
Διάγραμμα 5. 7.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (pH και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του <i>S. aureus</i>	64

Διάγραμμα 5. 8.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του <i>S. aureus</i>	65
Διάγραμμα 5. 9.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του <i>S. aureus</i>	65
Διάγραμμα 5. 10: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (pH και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>	69
Διάγραμμα 5. 11: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>	70
Διάγραμμα 5. 12: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, <i>rsm</i> (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του <i>L. monocytogenes</i>	70

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΡΑΒΔΟΓΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Ραβδόγραμμα 5. 1: Ραβδόγραμμα Pareto για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου	53
Ραβδόγραμμα 5. 2: Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής έναντι του <i>B.cereus</i>	58
Ραβδόγραμμα 5. 3: Ραβδόγραμμα Pareto για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>S. Aureus</i>	63
Ραβδόγραμμα 5. 4: Ραβδόγραμμα Pareto για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του <i>L. monocytogenes</i>	68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΠΙΠΕΡΙΑ JALAPENˆOS

Παρόλο που κατά την καθημερινή της χρήση η πιπεριά χαρακτηρίζεται ως λαχανικό, βοτανικά ανήκει στα φρούτα και ταξινομείται ως μούρο. Η βοτανολογική ταξινόμηση των φρούτων και των λαχανικών βασίζεται κυρίως στη δομή και τη λειτουργία του τμήματος του συγκεκριμένου φυτού. Ως φρούτο θεωρείται το σαρκώδες φυτικό προϊόν, που σχηματίζεται από λουλούδια, έχει σπόρους και βοηθάει στη διαδικασία αναπαραγωγής του φυτού. Μερικά κοινά φρούτα είναι τα μήλα, τα ροδάκινα, τα βατόμουρα και τα σμέουρα. Από την άλλη πλευρά, τα λαχανικά ορίζονται ως το εδώδιμο μέρος ενός φυτού, το οποίο δεν περιλαμβάνει τις ωθήκες συγκεκριμένα είναι οι ρίζες, τα στελέχη, τα φύλλα ή άλλα βοηθητικά μέρη του φυτού. Επιπλέον κάποια γνωστά λαχανικά περιλαμβάνουν το σπανάκι, τα μαρούλια, τα καρότα και το σέλινο. Οι πιπεριές θεωρούνται ως μη κλιμακτηριακό λαχανικό, το οποίο συνήθως συλλέγεται είτε κατά το στάδιο της πράσινης ώριμης (πράσινη πιπεριά) είτε κατά το στάδιο του ώριμου χρώματος (κόκκινο, κίτρινο ή πορτοκαλί). (Κοντελής Σπυρίδων 2022). Κατά μέσο όρο, ένα υγιές φυτό πιπερίας παράγει 4-8 μεγάλα φρούτα. Ωστόσο, τα φυτά πιπεριάς που καλλιεργούνται σε θερμοκήπια μπορούν να παράγουν περισσότερα από 30 φρούτα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Από την άλλη πλευρά, σε μικρές ποικιλίες φρούτων πιπεριού, ένα φυτό μπορεί να παράγει 100 μικρές πιπεριές.



Εικόνα 1. 1: πράσινη πιπεριά Jalapenˆos

Οι πιπεριές προέρχονταν από την Κεντρική και Νότια Αμερική. Στην Ευρώπη εμφανίστικαν κατά τον 16^ο αιώνα και σήμερα αποτελούν ένα από τα πιο διαδεδομένα λαχανικά παγκοσμίως. (Neelam Gurnani, Madhu Gupta, Darshana Mehta & Bhupendra Kumar Mehta 2016)

Υπάρχουν δύο είδη πιπεριών, οι γλυκές και οι καυτερές. Οι καυτερές πιπεριές περιέχουν καψαϊκίνη, ενώ οι γλυκές πιπεριές όχι. Η καψαϊκίνη είναι η κύρια δραστική χημική ένωση των πιπεριών (8-μεθυλ- N -βανιλυλ-6-εννεαμίδιο). Η καψαϊκίνη και πολλές σχετικές ενώσεις ονομάζονται καψαϊκινιοειδή και παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τις πιπεριές τσίλι, πιθανώς ως αποτρεπτικά μέσα κατά των φυτοφάγων. Η καθαρή καψαϊκίνη είναι μια υδρόφοβη, άχρωμη, άοσμη και κρυσταλλική έως κηρώδης ένωση. Τα καψαϊκινιοειδή έχουν διάφορες φυσιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις στην κινητικότητα της γαστρεντερικής οδού, στο καρδιαγγειακό και αναπνευστικό σύστημα καθώς και το σύστημα θερμορύθμισης. (Zarringhalam M, Zaringhalam J, Shadnoush M, Safaeyan F, Tekieh E., Iran J Pharm Res. 2013)

Η πιπεριά jalapeño είναι μια από τις πιο γνωστές και πιο κοινές πιπεριές τσίλι στο Μεξικό. Η κατανάλωσή της είναι μια παράδοση που χρονολογείται από τις πρώτες μεταναστεύσεις των Ευρωπαίων στη χώρα. Με τον καιρό η ζήτησή της αυξήθηκε, αν και τα τελευταία χρόνια η κατανάλωσή της δεν παρουσιάζει αυξητική τάση. Το 1999, περίπου 43.000 εκτάρια γης στο Μεξικό αφιερώθηκαν στην παραγωγή jalapeño . Όσον αφορά το 2011, είχε μειωθεί σε 41.000 εκτάρια. (Sánchez Toledano, B. I., 2023)

Η επιστημονική ονομασία της πιπεριάς Jalapeño είναι *Capsicum annuum* και αποτελεί μέλος της οικογένειας *Solanaceae*. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει επίσης άλλα δημοφιλή λαχανικά, όπως οι πατάτες, οι ντομάτες, οι μελιτζάνες και άλλα. Πιο χαρακτηριστικά είναι μεσσαίου μεγέθους και μία ώριμη πιπεριά jalapeño έχει μήκος 5-10 εκατοστά με στρογγυλό σχήμα και λεία σάρκα, πάχους 25-40 χιλιοστών. Η καυστικότητα της μπορεί να κυμαίνεται από 3.500 έως 8.000 μοναδες Scovil (κλίμακα μέτρησης του βαθμού καυστικότητας μιας πιπεριάς τσίλι), η οποία ποικίλλει από ήπια σε καυτή ανάλογα με την καλλιέργεια και την προετοιμασία που έχει υποστεί. Μια ακατέργαστη χαλαπένιο αποτελείται 92% νερό, 6% υδατάνθρακες, 1% πρωτεΐνη και περιέχει αμελητέο λίπος.

Οι Jalapeño χρησιμοποιούνται όχι μόνο ως καρύκευμα, αλλά και ως ανεξάρτητο συστατικό σε ένα πιάτο. Μπορούν να βρεθούν ως φρέσκες στην αγορά και ως συσκευασμένο και κονσερβοποιημένο προϊόν τουρσί. Όμως η χρήση της δεν περιορίζεται μόνο ως τρόφιμο. Παράλληλα στην κοσμετολογία, οι Jalapeño χρησιμοποιούνται κυρίως ως συστατικό στις μάσκες μαλλιών. Ωστόσο βοηθούν και στην υγεία με τους παρακάτω τρόπους:

- επιτάχυνση του μεταβολισμού: χρήσιμο για την απώλεια βάρους
- μείωση της χοληστερόλης στο αίμα
- βελτίωση της κατάστασης των μαλλιών και του δέρματος: λόγω της μεγάλης ποσότητας βιταμινών και μετάλλων.
- πρόληψη ασθενειών του καρδιαγγειακού συστήματος.

1.2. ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ/ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τα υποπροϊόντα είναι γενικά δευτερογενή προϊόντα που προέρχονται από την πρωτογενή διαδικασία παραγωγής και αποτελούν μια ενδιαφέρουσα και φθηνή πηγή δυνητικά λειτουργικών συστατικών όπως πεπτίδια, καρστενοειδή και φαινολικές ενώσεις που προωθούν την ιδέα μιας κυκλικής οικονομίας. Τα τελευταία χρόνια, η ποσότητα των αποβλήτων των τροφίμων έχει αυξηθεί, εγείροντας ανησυχίες σχετικά με την επισιτιστική ασφάλεια και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως η εξάντληση των πόρων και οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου που προκαλούνται από την σπατάλη των τροφίμων. (Mourad, 2016). Ενσωματωμένη στην έννοια της κυκλικής οικονομίας, η αξιοποίηση αυτών των φυτικών υπολειμμάτων μπορεί να μειώσει τους σχετικούς χαμένους πόρους, όπως γη, νερό, υπηρεσίες, ενέργεια και εργατικό δυναμικό, σε ολόκληρη την αγροδιατροφική αλυσίδα, καθώς και τα περιβαλλοντικά ζητήματα που σχετίζονται με τους χώρους υγειονομικής ταφής, αποσύνθεσης και το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Επιπλέον τα εκπεμπόμενα αέρια θα πρέπει να αντιμετωπίζονται σύμφωνα με τη σύγχρονη κυκλική οικονομία και τους περιβαλλοντικούς κανονισμούς. Οπότε είναι κατανοητό πως η αξιοποίηση των υποπροϊόντων μπορεί να συντελέσει πλεονεκτικά (Venkat, K. 2011, Vilariño, M.V.; Franco, C.; Quarrington, C. 2017).

Κάθε χρόνο, από το ισοδύναμο των 3,1 δισεκατομμυρίων τόνων των παγκόσμιων τροφίμων που παράγονται για ανθρώπινη κατανάλωση, περίπου 1,3 δισεκατομμύρια, χάνεται ή σπαταλιέται. Ποσοτικά αυτό αντιπροσωπεύει ένα κόστος περίπου 990 δισεκατομμυρίων δολαρίων, που περιλαμβάνει απώλειες τροφίμων και απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων (FAO 2011 ; Ferrentino, Asaduzzaman και Scampicchio2017). Τα απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων ορίζονται συχνά ως υπολείμματα ή υποπροϊόντα που προέρχονται από την επεξεργασία πρώτων υλών στα τρόφιμα (Γαλανάκης2012 ; Κασαπίδου, Σωσίδου και Μιτλιάγκα 2015).

Τα υποπροϊόντα τροφίμων έχουν περιορισμένη εμπορική εκμετάλλευση, καθώς είναι δύσκολος ο χειρισμός τους λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε νερό (a_w , 0,70–0,95), την πιθανή ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών , την ταχεία αυτοοξείδωση όταν έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και την υψηλή ενζυματική δραστηριότητα που επιταχύνει την αλλοίωση (Aljila et al.2012 ; Jahurul et al.2015). Από την άλλη πλευρά, το κόστος ξήρανσης, αποθήκευσης, αποστολής ή διάθεσης των υποπροϊόντων είναι οικονομικοί και νομικοί περιοριστικοί παράγοντες (Lai et al.2017).

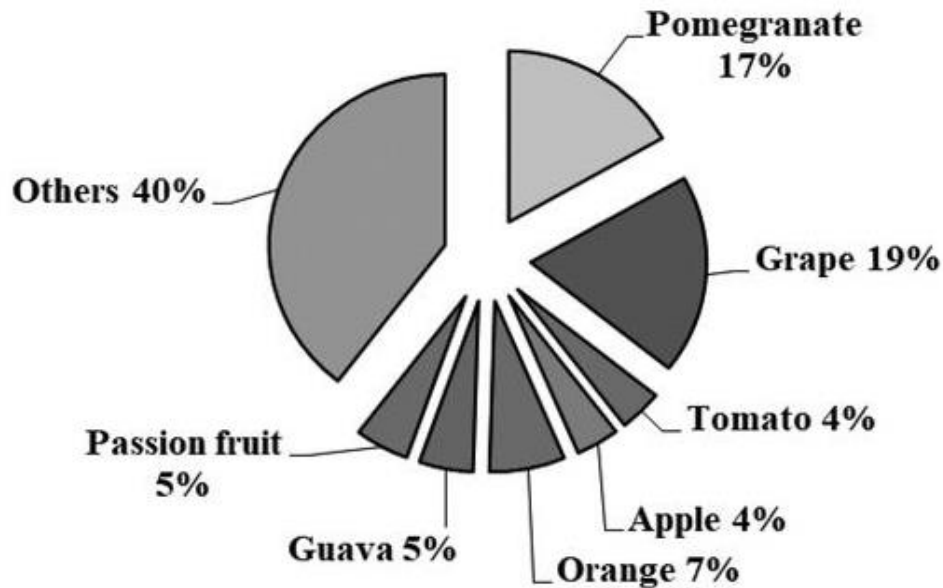
Διαδεδομένο μεταξύ της επιστημονικής κοινότητας και αναγνωρισμένων παγκόσμιων οργανισμών, όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) είναι το γεγονός ότι η βιομηχανία επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών είναι ένας από τους μεγαλύτερους παραγωγούς υποπροϊόντων (Gómez και Martinez2017 ; FAO2015). Πράγματι, αυτή η βιομηχανία απορρίπτει έως και το ένα τρίτο των φρούτων και λαχανικών με τη μορφή φλοιών, κουκούτσιων, πυρηνόπυρων, κατά την προετοιμασία και την επεξεργασία, αλλά και άγουρων ή/και κατεστραμμένων φρούτων και λαχανικών (FAO 2015) δημιουργώντας έτσι «απόβλητα», ενώ παράλληλα μειώνεται το μέγιστο θρεπτικό δυναμικό των φρούτων ή λαχανικών. Αρκετά παραδείγματα παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων που

προέρχονται από τα περισσότερα επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά παγκοσμίως απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα 1.1

Πίνακας 1. 1: Ποσοστό απορριμάτων σε διάφορα φρούτα και λαχανικά

Φρούτα/Λαχανικά	Υποπροϊόν	Ποσοστό απορριμάτων %	Αναφορά
Μήλο	φλούδα, πυρήνακι, σπόροι	25	Aljila et al. (2012)
Μπανάνα	Φλούδα	35	Aljila et al. (2012)
Εσπεριδοειδές	Φλούδα, σπόροι	50	Aljila et al. (2012)
Σταφύλι	Στέλεχος, δέρμα, σπόρος	20	Aljila et al. (2012)
Μάνγκο	Φλούδα, πέτρες	60	Padayachee et al. (2017)
Ρόδι	Φλούδα, μεσοκάρπιο	40-45	Duarte et al. (2016)
Πατάτα	Φλούδα	15	Aljila et al. (2012)
ντομάτα	Δέρμα, πυρήνας, σπόρος	20	Aljila et al. (2012)

Το 2014, η Ευρώπη παρήγαγε 100,33 και 73,67 εκατομμύρια μετρικούς τόνους λαχανικών και φρούτων, που αντιστοιχούν στο 8,6 και 8,9% της παγκόσμιας παραγωγής, αντίστοιχα (Statista 2014α,2014β). Ως εκ τούτου, είναι αναπόφευκτο η βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων να παράγει εκατομμύρια τόνους υποπροϊόντων φρούτων και λαχανικών (FVB = Fruits and vegetable by-products) ετησίως (Alexandre et al.2017β).Προκειμένου να θραυθούν τα 9 δισεκατομμύρια άτομα το 2050, ο FAO προβλέπει αύξηση 20% στην παραγωγή τροφίμων, επομένως στο εγγύς μέλλον αναμένεται μια αυξανόμενη ποσότητα FVB (FAO2009 ; Sharma et al.2014).Στην εικόνα 1.2 απεικονίζονται οι βασικές πηγές υποπροϊόντων φρούτων και λαχανικών.



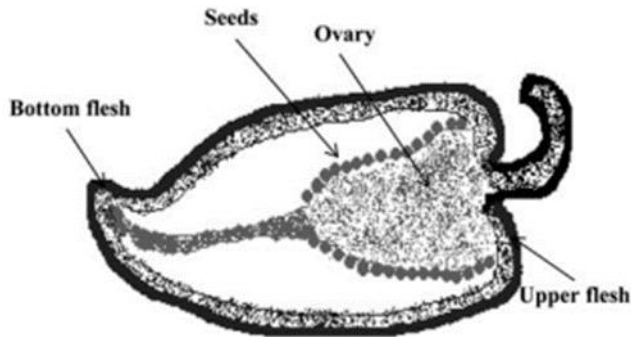
Εικόνα 1. 2: Πηγή των πιο χρησιμοποιούμενων υποπροϊόντων φρούτων και λαχανικών σε εμπλουτισμένα προϊόντα διατροφής (n = 101). Αυτά τα δεδομένα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τη συλλογή άρθρων που σχετίζονται με την εφαρμογή υποπροϊόντων φρούτων και λαχανικών σε ζωικά προϊόντα, ποτά, γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα αρτοποιίας και άλλα προϊόντα διατροφής.

Παρόλαυτα, με την αξιοποίηση των παραπροϊόντων θα μπορούσαν να παραχθούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. ζωοτροφές), καθώς η χρήση παραπροϊόντων μπορεί επίσης να αποτελέσει λύση για τη μείωση των απωλειών τροφών, για παράδειγμα μέσω της χρήσης των σπόρων για την παραγωγή άλλων προϊόντων όπως λάδι ή αλεύρι. Τέλος, σε μια εποχή που η βιωσιμότητα γίνεται όλο και πιο σημαντική για τους καταναλωτές, οι εταιρείες που χρησιμοποιούν τα παραπροϊόντα και παράγουν προϊόντα με μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα μπορούν να αποκτήσουν πλεονέκτημα έναντι άλλων. (Torres-León et al. 2018)

1.2.1. ΜΕΡΗ - ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΙΠΕΡΙΑΣ

Η παραγωγή πράσινου τσίλι έφτασε τα 2,42 εκατομμύρια τόνους το 2016, που αντιστοιχεί στο 21,3% των λαχανικών που καλλιεργείται στο Μεξικό. Ως ο κύριος εξαγωγέας, περίπου το 40% της παραγωγής του Μεξικού εξάγεται ως φρέσκο, αποξηραμένο και παρασκευασμένο τσίλι, συμβάλλοντας κατά 28,7% στις παγκόσμιες εξαγωγές που φτάνουν τους 3,3 εκατ. τόνους μεταξύ των 138 χωρών εξαγωγής (SIAP 2018). Αντίστοιχα είναι το δεύτερο μεγαλύτερης απόδοσης λαχανικό που καλλιεργείται στην Κίνα. Η ετήσια παραγωγή πιπεριών έφτασε τους 28 εκατομμύρια τόνους και αντιπροσώπευε το 46% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής

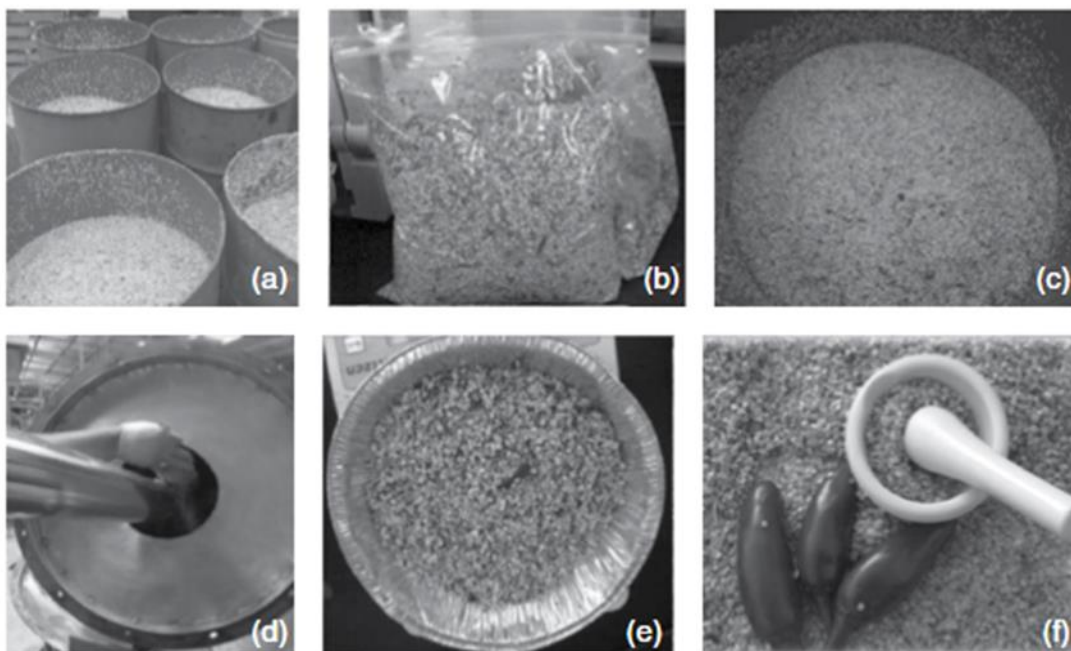
πιπεριάς τα τελευταία τρία χρόνια (FAO, 2016). Στην εικόνα 1.3 απεικονίζονται τα διαφορετικά μέρη της πιπεριάς.



Εικόνα 1. 3: Βασικά μέρη του καρπού πιπεριάς

Η πιπεριά αποτελείται από τον καρπό που είναι το εδώδιμο μέρος, τους σπόρους που βρίσκονται στο εσωτερικό του και το κοτσάνι το οποίο αποσπάται από το φυτό. Οι σπόροι και το κοτσάνι αποτελούν τα παραπροϊόντα της πιπεριάς στη βιομηχανία επεξεργασίας της. Οι σπόροι *C. annuum* διαχωρίζονται από τους λοβούς και απορρίπτονται πριν από την κατανάλωση ή μετά την επεξεργασία της σάρκας, καθώς είναι άφθονα, φθηνά και άμεσα διαθέσιμα παραπροϊόντα. Πρόσφατα έχει δοθεί έμφαση στην αξιοποίηση των υποπροϊόντων και σε γεωργικά προϊόντα που δεν χρησιμοποιούνται επαρκώς. Λόγω της πολυπλοκότητας των θεμάτων που σχετίζονται με τα βιομηχανικά παραπροϊόντα, απαιτείται μεγαλύτερη προσπάθεια για να αναπτυχθεί η αξιοποίηση υποχρησιμοποιούμενων ή μη χρησιμοποιημένων πρώτων υλών. Μόνο ένα μικρό μέρος του φυτικού υλικού καταναλώνεται απευθείας από τον άνθρωπο και το μεγαλύτερο μέρος του πρέπει να περάσει από στάδια επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα εκτός από τη νωπή κατανάλωση, οι πιπεριές μεταποιούνται κυρίως σε καρυκεύματα, όπως αποξηραμένη πιπεριά, τεμαχισμένη πιπεριά, σκόνη, σάλτσα, πάστα, πουρές, προϊόντα πιπεριάς τουρσί και ζύμωσης (Azabou, Taheur, Jridi, Bouaziz, & Nasri, 2017).

Η κονσερβοποίηση είναι μια από τις κύριες διαδικασίες που χρησιμοποιείται για να παραχθούν προϊόντα πιπεριάς. Η ζύμωση είναι μια διαδικασία για να ληφθούν σάλτσες, κυρίως από καυτερές ποικιλίες τσίλι *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens* και *Capsicum chinense*. Μετά την προετοιμασία της συνταγής της σάλτσας, η ζύμωση λαμβάνει χώρα μέσω της βακτηριακής δραστηριότητας για να αναδείξει τη χαρακτηριστική παλαιωμένη γεύση της πιπεριάς. (Sandoval-Castro, C.J., Valdez-Morales, M., Perea-Domínguez, X.P. et al. 2014).



Εικόνα 1. 4:(α) Υποπροϊόν που ανακτάται από τη βιομηχανία (β) Ξεπλυμένο και αποθηκευμένο υποπροϊόν. (γ) Βιομηχανικό υποπροϊόν υπό ανάδευση. (δ) Στεγνώνεται σε φούρνο με θερμαινόμενο αέρα. (ε) Προσδιορισμός υγρασίας και ενεργότητας ύδατος (στ) Συστατικό έτοιμο προς χρήση.

Αν και οι σπόροι από διάφορα είδη θεωρούνται συνήθως ως βιομηχανικά υποπροϊόντα έτσι και οι σπόροι πιπεριάς. Αυτοί αντιπροσωπεύουν το 45-50% του ξηρού βάρους των καρπών πιπεριάς μετά την επεξεργασία (Gu et al., 2017). Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση προστιθέμενης αξίας των γεωργικών υποπροϊόντων από τη βιομηχανία τροφίμων, διότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις θρεπτικές και βιολογικές τους ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.λπ.).

Το παραπάνω παράδειγμα αποτελεί ένα λόγο για τον οποίο οι βιοδραστικές ενώσεις από αυτά τα υποπροϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αντίστοιχες εφαρμογές. Επίσης μια πιθανή εφαρμογή θα μπορούσε να είναι η χρήση τους σε συμπληρώματα διατροφής και στον εμπλουτισμό τροφίμων, αφού γενικά θεωρείται ότι οι καταναλωτές προτιμούν φυσικά λειτουργικά τρόφιμα. Άλλες σημαντικές εφαρμογές περιλαμβάνουν τη χρήση τους στη συντήρηση τροφίμων, εξαιτίας των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τις οποίες περιέχουν, έναντι χημικών και τεχνητών συντηρητικών. Παράλληλα η απομόνωση αυτών των αντιμικροβιακών παραγόντων από την πιπεριά μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη των τροφιμογενών ασθενειών.

Κάποια συγκεκριμένα παραδείγματα εφαρμογής υποπροϊόντων της πιπεριάς :

Ένα υποπροϊόν της κονσερβοποίησης πράσινων λοβών New Mexican που αποτελείται από φλούδες λοβού πιπεριάς, μπορεί να είναι μια εξαιρετική πηγή διαιτητικών ινών και μπορεί να

προσθεθεί σε επεξεργασμένα αρτοσκευάσματα, καθώς η φλούδα περιέχει διαιτητικές ίνες σε ποσοστό 80% (77% των οποίων είναι διαλυτές) (Mckee, L. 1998)

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο σπόρος της πιπεριάς είναι πλούσιος σε λάδι (κυμαίνεται από 10,8 έως 35,9% ανάλογα με τις διάφορες ποικιλίες) (Azabou et al., 2017; Embaby Hel & Mokhtar, 2011; Jarret, Levy, Potter, & Cermak, 2013; Zou, Ma, & Tian, 2015), το οποίο περιέχει ακόρεστα λιπαρά οξέα (αντιστοιχούν στο 79,77–87,7% των συνολικών λιπαρών οξέων) (Gu et al., 2017; Jarret et al., 2013; Silva, Azevedo, Pereira, Valentao, & Andrade, 2013; Yang et al., 2010) και αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη E- (Matthäus & Özcan, 2009), πολυφαινόλες, καροτενοειδή και τοκοφερόλες (El-Adawy & Taha, 2001). Ως εκ τούτου, το έλαιο σπόρων πιπεριού (pepper seed oil, PSO) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως σαλάτα ή μαγειρικό λάδι, ως προστατευτικό για την υπεριώδη ακτινοβολία και ως θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι οικονομικά και περιβαλλοντικά πολύτιμα στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Embaby Hel & Mokhtar, 2011, Yilmaz, Sevgi Arsunar, Aydeniz, & Güneşer, 2015).

Ωστόσο, οι σπόροι και ο κεντρικός πυρήνας του *C. annuum* μπορεί να περιέχουν ποσότητα καψαϊκίνης, η οποία, όταν καταναλώνεται, προκαλεί έντονο ερεθισμό και αίσθηση καύσου στο στόμα, τη γλώσσα και το λαιμό. Η κατανάλωση σε μεγάλες ποσότητες αυτής της ένωσης για συνεχόμενο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει προβλήματα όπως χρόνια γαστρίτιδα, νεφρική βλάβη, ηπατική βλάβη και νευροτοξικές επιδράσεις.

1.3. ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΠΟΡΩΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ

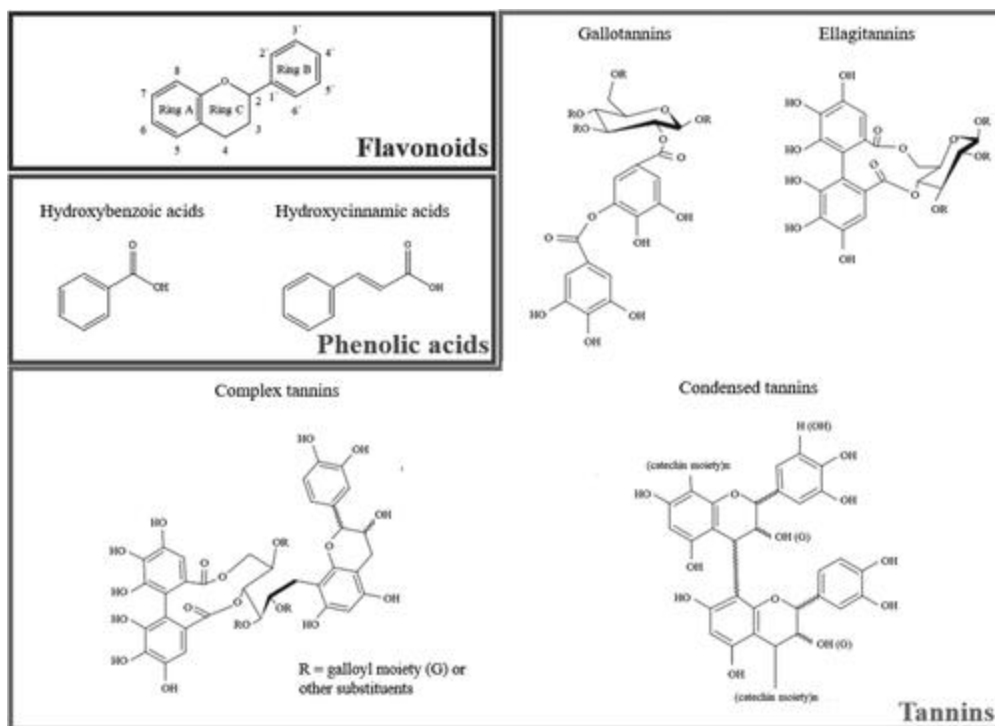
Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία λόγω των βιολογικών τους ιδιοτήτων (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.λπ.). Γενικά, η περιεκτικότητά τους είναι χαμηλότερη στα βρώσιμα όργανα των φυτών από τα αντίστοιχα υποπροϊόντα τους (Guil-Guerrero et al. 2016β ; Biesalski et al. 2009 ; del Castillo et al. 2017).

Υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες βιοδραστικών ενώσεων: οι βασικές και οι μη βασικές. Οι βασικές περιλαμβάνουν κυρίως βιταμίνες και μέταλλα, απαραίτητα για την πρόληψη ασθενειών και τη διατήρηση συγκεκριμένων βιοχημικών διεργασιών στο σώμα. Αντίθετα, οι μη βασικές βιοδραστικές ενώσεις περιλαμβάνουν δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, φυτοστερόλες, σαπωνίνες, αιθέρια έλαια και φυτικά οξέα, τα οποία επιτρέπουν τη διατήρηση της βέλτιστης κυτταρικής υγείας, οδηγώντας σε βελτίωση της μακροζωίας (Guil-Guerrero et al. 2016β ; Οι Padayachee et al. 2017). Οι φαινολικές ενώσεις και τα καροτενοειδή είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες βιοδραστικές ενώσεις που είναι διαθέσιμες σε φρούτα και λαχανικά (Padayachee et al. 2017).

Οι πιπεριές είναι μια πλούσια πηγή φυτοχημικών όπως βιταμίνες (Wahyuni et al., 2011, Zhuang et al., 2012), καψαϊκίνοειδή (Aguiar et al., 2016), καροτενοειδή (Giuffrida et al., 2013, Góamez και Góamez -Alejo, 2013, Ha et al., 2007, Rodríguez-Burruezo et al., 2010, Wall et al., 2001) και πολυφαινόλες (Wahyuni et al., 2011, Zhuang et al., 2012). Οι πιπεριές Jalapeño έχουν δείξει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Alvarez-Parrilla et al., 2011) και έχουν αποτελεσματική δράση κατά της οξείδωσης των λιπιδίων των τροφίμων και της ανθρώπινης LDL χοληστερόλης (Alvarez-Parrilla et al., 2012) λόγω των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχουν.

1.3.1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν μια τεράστια ποικιλία υδατοδιαλυτών ουσιών (περίπου 8000 διαφορετικά μόρια). Οι πιο σύνθετες δομικά φαινόλες, δηλαδή με υψηλό μοριακό βάρος, αναφέρονται συχνά ως πολυφαινόλες. Ωστόσο, όλες οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο με έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες (Singh et al.2017 ; del Castillo et al.2017 ; Burton-Freeman, Sandhu και Edirisinghe2017). Οι κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα υποπροϊόντα είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι ταννίνες (Babbar και Oberoi2014). Διαφορετικά μοτίβα υποκατάστασης στον δακτύλιο C επιτρέπουν στα φλαβονοειδή να έχουν πολλές υποκατηγορίες που υπάρχουν σε φρούτα και/ή λαχανικά, π.χ. φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανό-3-όλες, φλαβανόνες και ανθοκυανιδίνες. Θεωρείται ότι τα φλαβονοειδή ασκούν αντιμικροβιακή δράση λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα τόσο με εξωκυτταρικές όσο και με διαλυτές πρωτεΐνες καθώς και με βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα (Guil-Guerrero et al.). Σύμφωνα με τους Balasundram et al. (2006) και Rice-Evans et al. (1997) η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών επηρεάζεται και καθορίζεται από τα δομικά χαρακτηριστικά και τη φύση των υποκαταστάσεων. Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των φαινολικών ενώσεων είναι οι ακόλουθοι: ο αριθμός και θέση των υδροξυλομάδων στους Α και Β δακτυλίους, η ύπαρξη διπλού δεσμού μεταξύ C2 και C3, συζευγμένου με την ομάδα 4-κετο στον δακτύλιο C που ενισχύει την ικανότητα δέσμευσης ριζών, η εμφάνιση ενός διπλού δεσμού μεταξύ C2 και C3, σε συνδυασμό με ένα τμήμα 3-υδροξυ στον δακτύλιο C που αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης ριζών και η υποκατάσταση των συμβαλλόμενων υδροξυλικών ομάδων με γλυκοζυλίωση που μειώνει την αντιοξειδωτική δράση. (Y. LEE, L.R HOWARD, and B 1995).

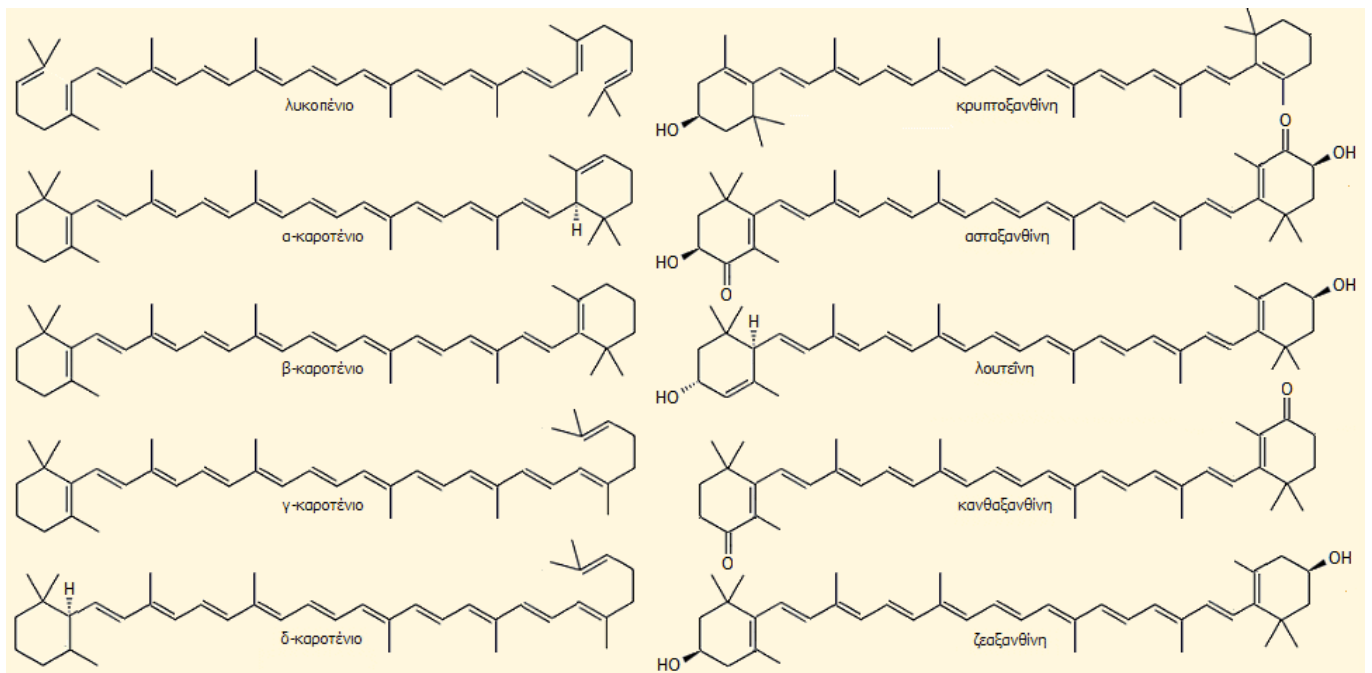


Εικόνα 1. 5: Γενικές δομές διαφορετικών κατηγοριών φαινολικών ενώσεων (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ταννίνες). Προσαρμογή από Balasundram, Sundram και Samman (Παραπομπή2006); Dua et al. (2016); Sieniawska και Baj (2017).

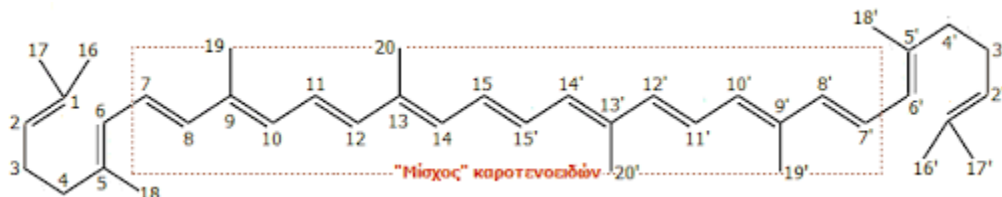
1.3.2. ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ

Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές χρωστικές ουσίες που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες και τους χρωμοπλάστες των φρούτων και των λαχανικών. Ορισμένα καροτενοειδή χρησιμοποιούνται ως φυσικές χρωστικές σε προϊόντα διατροφής (Cooperstone και Schwartz). Ο σκελετός των καροτενοειδών αποτελείται από μονάδες ισοπρενίου και από μια σειρά συζευγμένων διπλών δεσμών. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί πάνω από 700 καροτενοειδή. Ωστόσο, τα καροτενοειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως καροτένια (υδρογονάνθρακες χωρίς οξυγόνο) ή ξανθοφύλλες (υδρογονάνθρακες που περιέχουν οξυγόνο). Η διάταξη συζευγμένων διπλών δεσμών είναι κυρίως υπεύθυνη για τη χημική δραστηριότητα των καροτενοειδών έναντι ελευθέρων ριζών π.χ. λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών μπορεί να σχετίζεται με τις επιδράσεις τους στις φυσικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών διπλής στιβάδας. Υπό αυτή την έννοια, τα καροτένια (μη πολικά καροτενοειδή) αντιδρούν αποτελεσματικά μόνο με ρίζες που παράγονται μέσα στη μεμβράνη, ενώ οι ξανθοφύλλες, λόγω των υδροξυλομάδων τους, εκτίθενται σε υδατικό περιβάλλον και μπορούν επίσης να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στην υδατική φάση (Widomska 2014).

Γενικά είναι γνωστό πως τα καροτενοειδή προσδίδουν το χρώμα στις πιπεριές *Capsicum* και εκτελούν βασικές διατροφικές λειτουργίες που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία. (Anaya-Esparza et al. 2021). Κύρια καροτενοειδή που προσδιορίζονται στην *Capsicum annuum* είναι το β-καροτένιο, η β-κρυπτοξανθίνη και η ζεαξανθίνη (*J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 6, 3399–3406). Εν τούτης, πιο συγκεκριμένα καροτενοειδή που εντοπίζονται βάση χρώματος καρπού είναι η βιολαξανθίνη (34 ± 3 έως 100 ± 17 μg/g), η οποία εντοπίστηκε ως κύριο καροτενοειδές στις κίτρινες πιπεριές jalapeño. Ενώ σε κόκκινες πιπεριές jalapeño που καλλιεργήθηκαν στο χωράφι καλοκαιρινούς μήνες παρατηρήθηκε η διαφορά ότι έδειξαν υψηλότερη περιεκτικότητα ζεαξανθίνης (29 ± 0 και 31 ± 2 μg/g) και β-κρυπτοξανθίνης (11 ± 1 και 7 ± 0 μg/g) από τις πιπεριές που καλλιεργούνται στο θερμοκήπιο. Οπότε καθοριστικός είναι ο παράγοντας των συνθηκών ανάπτυξης τους ως προς την περιεκτικότητα που θα εμφανίσουν σε καροτενοειδή (da Silveira Agostini-Costa, T., da Silva Gomes, I., de Melo, L. A. M. P., Reifschneider, F. J. B., & da Costa Ribeiro, C. S. 2017).



Εικόνα 1. 6: Χαρακτηριστικά καροτενοειδή. Αριστερά: καροτένια Δεξιά: ξανθοφύλλες



Εικόνα 1. 7 Ειδική αρίθμηση ανθράκων που εφαρμόζεται στα καροτενοειδή (εδώ γίνεται στο μόριο του λυκοπενίου).

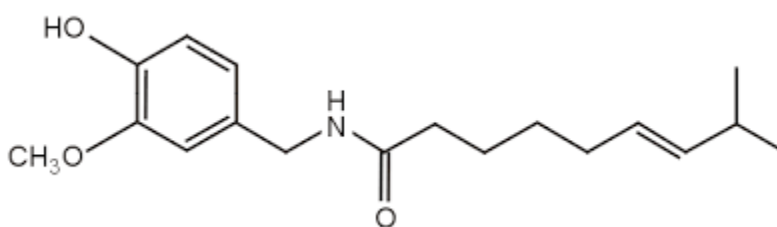
1.3.3. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Το κύριο θρεπτικό και λειτουργικό συστατικό του καρπού της πιπεριάς αποτελεί το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Teodoro et al., 2013, Toruz and Ozdemir, 2007). Επίσης η βιταμίνη C είναι ευρέως γνωστή ως αντιοξειδωτική και βιοδραστική ένωση, ιδιαίτερα στις ώριμες πιπεριές (Kim et al., 2011, Toruz and Ozdemir, 2007). Οι πιπεριές έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ από όλα τα λαχανικά. Για παράδειγμα, η κατανάλωση 100 g φρέσκου βάρους πιπεριών παρέχει 100% - 200% της συνιστώμενης διατροφικής δόσης ασκορβικού οξέος. Η υψηλή περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ των πιπεριών είναι μια από τις κύριες διατροφικές τους ιδιότητες. Παράγοντες όπως ο γονότυπος, το περιβάλλον και η ωριμότητα των καρπών επηρεάζουν τα επίπεδα ασκορβικού οξέος και άλλων θρεπτικών ενώσεων. Επιπλέον οι πιπεριές Jalapeño περιέχουν μεγάλη ποσότητα προβιταμίνης A, η οποία συμβάλει στην υγεία των ματιών και η οποία βρίσκεται με την μορφή β-καροτενίου στις πιπεριές (Παφύλη, Μ.).

Type	Cultivar	Alpha carotene (µg/100g)		Beta carotene (µg/100g)		Provitamin A (µgRE/100g) ^a	
		Green	Red	Green	Red	Green	Red
Jalapeño	Jalapeño M (JM)	60.1a ^b	275.8a	304.6bc	870.4f	55.8d	168.1f
	Tam Veracruz (TVC)	38.5ab	107.5c	363.0bc	1455.4d	63.7cd	251.5d
	Tam Mild Jalapeño (TMJ)	54.9a	208.8b	471.9b	2560.9c	83.2b	44.2c

Εικόνα 1. 8: Περιεχόμενη ποσότητα κάποιων βιταμινών ανάλογα την ωριμότητα της πιπεριάς

1.3.4. ΚΑΨΑΙΚΙΝΟΕΙΔΗ



Εικόνα 1. 9: Χημική δομή καψαϊκίνης

Η καψαϊκίνη (Cp) (Εικόνα 1.9) είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται από την οικογένεια των φυτών *Capsicum*. Αυτό το μόριο εμφανίζει διάφορες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές ικανότητες, κατά της παχυσαρκίας και αντιδιαβητικές ιδιότητες, μεταξύ άλλων. Επίσης η καψαϊκίνη ευθύνεται για την έντονη και καυτερή γεύση των καρπών της πιπεριάς. Η καψαϊκίνη και η διυδροκαψαϊκίνη είναι τα δύο κύρια καψαϊκίνοειδή που βρίσκονται στο περικάρπιο, στον πλακούντα και στους ιστούς των σπόρων όλων των πιπεριών

.Η χρήση της καψαϊκίνης όλο και εξελίσσεται. Εκτός από τη χρήση ως καρύκευμα με την οποία παρέχει χαρακτηριστική πικάντικη γεύση και χρώμα, νέα συστατικά που εξάγονται από πιπέρι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να επεκτείνουν την ημερομηνία λήξης των προϊόντων τροφίμων, καθώς και ως πρόσθετα ή τεχνητά συστατικά με αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση. Οι εναλλακτικές των χημικών συντηρητικών είναι φυσικά προϊόντα, όπως το πιπέρι. Το αιθέριο έλαιο πιπεριού χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης και αποτελεσματικό συντηρητικό τροφίμων. Καθώς εμφανίζονται νέα τροφιμογενή παθογόνα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, η ανακάλυψη φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στις πιπεριές θα είναι πολύτιμη για τους επιστήμονες τροφίμων. Αυτό βασίζεται σε σχετική έρευνα που έχει ήδη γίνει σε αυτόν τον τομέα. Επιπλέον, παρέχει τη βάση νέα ερευνητικά πεδία που εξετάζουν νέες ποικιλίες πιπεριάς για το θρεπτικό τους περιεχόμενο, το γευστικό προφίλ και την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι πολλών παθογόνων ικανών να προσβάλλουν τον άνθρωπο (Sandoval-Castro, C. J., et al (2017). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2) συγκεντρώνονται μερικές από τις βιοδραστικές ενώσεις που εμπεριέχονται στους σπόρους της πράσινης πιπεριάς Jalapeño.

Πίνακας 1. 2:Ενδεικτικός πίνακας εμπεριεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων στους σπόρους πράσινης πιπεριάς Jalapeño

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	Βιταμίνη C, βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)
ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	καφεϊκό οξύ, κινναμικό οξύ, καφεοϋλογλυκόζη, 3-φερουλοϋλκινικό οξύ,
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	Φλαβονόνες: ναριγίνη, απιγενίνη, ισοραμνετίνη Φλαβονόλες: κουερσετίνη, ισοκουερσετίνη
ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ	β-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη, ζεαξανθίνη, βιολαξανθίνηθίνη
ΚΑΨΑΪΚΙΝΟΕΙΔΗ	καψαϊκίνη (C), διυδροκαψαϊκίνη (DHC), νορ-διυδροκαψαϊκίνη (NHC), ομοκαψαϊκίνη
ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	Παλμιτικό, στεατικό, ελαϊκό, λινολεϊκό, αραχιδονικό, βεχενικό οξύ
ΑΜΙΝΟΞΕΑ	γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη,

	βαλίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, ισολευκίνη, ασπαρτικό οξύ, λυσίνη, γλουταμινικό οξύ, ιστιδίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, λευκίνη
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ	οξαλικό, μηλικό, φουμαρικό, κιτρικό, ασκορβικό οξύ
ΣΑΚΧΑΡΑ	γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη

1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΙΠΕΡΙΑΣ JALAPEÑOS

Η πράσινη πιπεριά (Jalapeño) είναι ένα γεωργικό προϊόν που είναι πλούσιο σε βιταμίνες και αντιοξειδωτικά, καθώς επίσης έχει γίνει δημοφιλές σε όλο τον κόσμο για την κατανάλωση της ως φρέσκου προϊόντος. Συγκεκριμένα η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χλωροφυλλών και καροτενοειδων σε ένα τρόφιμο όπως συμβαίνει στις πιπεριές Jalapeño , είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι μπορούν ασκήσουν προστασία προς μια ασθένεια με διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι φρέσκες πιπεριές έχουν αναγνωριστεί ως εξαιρετική πηγή βιταμινών C και E, προβιταμίνης A. Η κατανάλωση καροτενοειδών και χλωροφυλλών έχει συσχετιστεί με προστατευτικά αποτελέσματα κατά ορισμένων μορφών καρκίνου, πρόληψη γαστρικού έλκους, τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος, πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων . Επιπλέον η πληθώρα των αντιοξειδωτικών που περιέχουν οι πιπεριές Jalapeño έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και μειώνουν τον κίνδυνο για χρόνια νοσήματα. (Cervantes-Paz, B., et al 2014). Τέλος οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τα περισσότερα φυτοχημικά που περιέχονται στα φρούτα και στα λαχανικά ενώ ταυτόχρονα, τα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν μια συσχέτιση μεταξύ μιας πλούσιας σε φυτοχημικά διατροφής και ενός μειωμένου κινδύνου χρόνιων μεταδοτικών ασθενειών. Επίσης οι βιολογικές επιδράσεις των флаβονοειδών έχουν αποδοθεί στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία μετριάζει το οξειδωτικό στρες, ενώ παράλληλα τα флаβονοειδή χρησιμοποιούνται στην φαρμακευτική χάρης της αντιφλεγμονώδη δράσης τους. Για αυτούς τους λόγους η συχνή κατανάλωση πιπεριών Jalapeño μπορεί να βελτιώσει την ανθρώπινη υγεία.(Hernández-Pérez et al. 2020).Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.3) περιέχονται μερικά παραδείγματα της βιολογικής δράσεις των πιπεριών.

Πίνακας 1. 3: Βιολογική δράση πιπεριών (B Cervantes-Paz · 2014)

ΕΙΔΟΣ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	ΜΕΡΟΣ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΕΤΑΙ
<i>Jalapeños</i>	Φλούδα	Καταπολέμηση οστεοπόρωσης	Χλωροφύλλες Καροτενοειδή
<i>Robusta</i>	Καρπός	Αντιοξειδωτική δράση	Χλωροφύλλες
<i>Jalapeños</i>	Καρπός	Καταπολέμηση LDL χοληστερόλης	Καροτενοειδή
<i>Jalapeños</i>	Καρπός	Καταπολέμηση άγχους	Βιταμίνη Α
<i>Jalapeños</i>	Καρπός	Καταπολέμηση καρκίνου	Χλωροφύλλη

1.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΙΠΕΡΙΑΣ JALAPENŌS

Η αντιοξειδωτική δράση των πιπεριών *Jalapeños* οφείλεται στην ύπαρξη φαινολικών ενώσεων καθώς πειράματα έχουν αποδείξει ότι φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, εμποδίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των βακτηρίων και των μυκήτων. Επίσης η λουτεολίνη έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ακολουθούμενη από την καψαϊκίνη και την κερσετίνη (Howard, L. R., et al 1998). Σήμερα υπάρχει πληθώρα ερευνών στη μικροβιολογία που επικεντρώνονται στα αιθέρια έλαια φυτών και στην ικανότητά τους να αναστέλλουν την αλλοίωση και τα παθογόνα βακτήρια των τροφίμων. Τα αιθέρια έλαια που απομονώνονται από φυτικές πηγές έχουν βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες και υπάρχει συνεχής έρευνα για τον εντοπισμό περισσότερων αντιμικροβιακών φυτικών πηγών. Τέλος έχει αποδειχθεί ότι εκχυλίσματα ακατέργαστου ιστού από πολλές διαφορετικές ποικιλίες *C. annuum* έχουν αναστείλει την ανάπτυξη των ειδών *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* και *Streptococcus* ενώ το εκχύλισμα από φρούτα *jalapeno*, συγκεκριμένα, έχει αναστέλλει *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* και *Clostridium tetani* (Bacon, K. Et al 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΟ

2.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

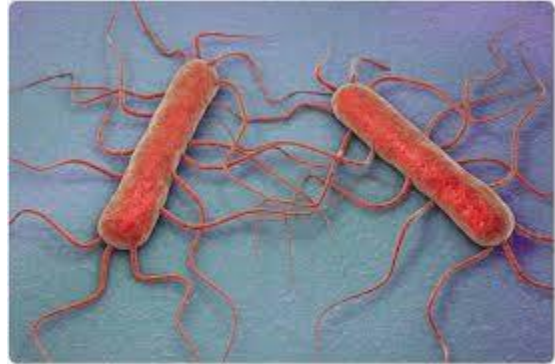
Η μικροβιολογία των τροφίμων είναι ένας σημαντικός τομέας μελέτης της επίδρασης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, καθώς είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί δρουν στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα στα τρόφιμα επιδρούν διάφοροι μικροοργανισμοί οι οποίοι ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες κατατάσσονται ανάλογα με την δράση τους: τους αλλοιωγόνους, τους παθογόνους και τους ωφέλιμους και. Αρχικά οι πιο συχνοί παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι οι *Salmonella* sp., *Listeria*, *Escherichia* και *Vibrio*. Ένας παθογόνος οργανισμός είναι ένας οργανισμός που είναι ικανός να προκαλέσει ασθένειες σε έναν ξενιστή (άτομο). Ουσίες που παράγονται από αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να υπάρχουν και μπορούν να αναπτυχθούν σε τρόφιμα και ζωοτροφές ζωικής και μη ζωικής προέλευσης με αποτέλεσμα να προκαλέσουν σοβαρούς κινδύνους ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα, απειλώντας την υγεία και τη ζωή τους. Δεύτερον οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (π.χ. *Pseudomonas* spp, *Psychrobacter* spp) χρησιμοποιούν τα τρόφιμα ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, επηρεάζοντας την ποιότητα των τροφίμων και προκαλώντας τους διάφορες αλλοιώσεις. (Beuchat, L. R. 1996). Τα αλλοιωμένα τρόφιμα χαρακτηρίζονται από αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους όπως εμφάνιση μούχλας ή κακοσμία, οι οποίες τα καθιστούν μη αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς όμως να απειλούν την υγεία του καταναλωτή. Τέλος ωφέλιμοι μικροοργανισμοί θεωρούνται, για παράδειγμα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιομηχανία ζύμωσης τροφίμων, κυρίως για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος, που εμφανίζει αντιμικροβιακές δράσεις Leroy et al (2002).

2.1. ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Στην πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν τρεις μικροοργανισμοί (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*) οι οποίοι κατηγοριοποιούνται ως Gram+ βακτήρια. Η επιλογή των τριών αυτών μικροοργανισμών στηρίχτηκε στο γεγονός ότι συναντώνται συχνά στα τρόφιμα και προκαλούν αλλοιώσεις και προβλήματα παθογενικής φύσεως. Ακόμη, ο *B.cereus* και η *L.monocytogenes* βρίσκονται κυρίως στο έδαφος όπως και τα λαχανικά σαν την πιπεριά, επομένως εμφανίζονται πιο συχνά στις πιπεριές σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς

2.1.1. *Listeria monocytogenes*

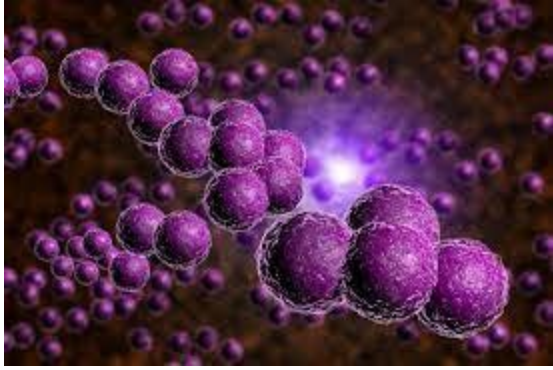
Η *Listeria monocytogenes* όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1 ανήκει στο γένος *Listeria* που τοποθετείται στον υποκλάδο *Clostridium*, είναι θετικό κατά gram βακτήριο και θεωρείται παθογόνο. Είναι ένας σαπροφυτικός οργανισμός που ζει σε περιβάλλον φυτού-εδάφους και ευδοκιμεί σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπως το έδαφος, το νερό, διάφορα προϊόντα διατροφής, τον άνθρωπο και τα ζώα. Παθογόνος μόλυνση από το *L. monocytogenes* οδηγεί σε λιστερίωση η οποία εκδηλώνεται ως γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, λοιμώξεις από μητέρα σε έμβρυο και σηψαιμία, με αποτέλεσμα το θάνατο στο 25-30% των περιπτώσεων.



Εικόνα 2. 1.: *Listeria monocytogenes*

2.1.2. **Staphylococcus aureus**

Ο *Staphylococcus aureus* όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2 είναι ένα πιθανό παθογόνο Gram-θετικό βακτήριο (μωβ χρώση με χρώση Gram) που έχει σχήμα κόκκου και τείνει να διατάσσεται σε ομάδες που περιγράφονται ως "σταφυλόμορφες". Ο *S. aureus* είναι μία από τις πιο κοινές βακτηριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο και είναι η αιτία πολλαπλών ανθρώπινων λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριαϊμίας, της λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας, των λοιμώξεων του δέρματος και των μαλακών ιστών, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, λοιμώξεις από προσθετικές συσκευές, πνευμονικές λοιμώξεις, γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα, σύνδρομο τοξικού σοκ και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Ανάλογα με τα εμπλεκόμενα στελέχη και τη θέση της λοίμωξης, αυτά τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις ή/και ασθένειες που προκαλούνται από τοξίνες. Ο οργανισμός μπορεί να διαδοθεί από ένα επιφανειακό μέρος μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα εσωτερικά όργανα, όπου μπορεί να δημιουργήσει μια μεταστατική εστία μόλυνσης. Ο *S. aureus* συνεχίζει να είναι ένα σημαντικό παθογόνο στην κοινότητα και στα νοσοκομεία, προκαλώντας υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα.



Εικόνα 2. 2.: *Staphylococcus aureus*

2.1.3. *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* όπως φαίνεται στην εικόνα 2.3 είναι βακτήριο θετικό κατά Gram βακτήριο που εμφανίζεται ως απαθογόνο ή ως ευκαιριακό παθογόνο. Είναι αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο και έχει μορφή κινητικής ράβδου σχηματισμού σπορίων που μπορεί να απομονωθεί από μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών θέσεων. Η ομάδα *Bacillus cereus* αποτελείται επί του παρόντος από επτά είδη *Bacillus*, δηλαδή, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, και το πιο πρόσφατα αναγνωρισμένο μέλος της ομάδας, *B. cytotoxicus*, που είναι θερμοανεκτικό.

Τα σπόρια του *B. cereus* είναι ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει σε τροφιμογενείς ασθένειες. Ο σπόρος *B. cereus* είναι πιο υδρόφοβος από τα σπόρια από οποιοδήποτε άλλο *Bacillus* spp., γεγονός που του επιτρέπει να προσκολλάται σε διάφορους τύπους επιφανειών. Υπάρχουν δύο τύποι τροφιμογενούς ασθένειας *B. cereus*. Ο πρώτος τύπος, ο οποίος προκαλείται από εμετική τοξίνη, οδηγεί σε εμετό, ενώ ο δεύτερος τύπος, ο οποίος προκαλείται από εντεροτοξίνη(εις), έχει ως αποτέλεσμα διάρροια. Η πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσα εντεροτοξίνη *B. cereus* είναι η κυτοτοξίνη K.



Εικόνα 2.3: *Bacillus cereus*

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.4) απεικονίζονται έρευνες με μεθόδους που προσδιόρισαν αντιμικροβιακή δράση κατά τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 2. 4: Έρευνες αντιμικροβιακής δράσης κατά των μελετούμενων μικροοργανισμών

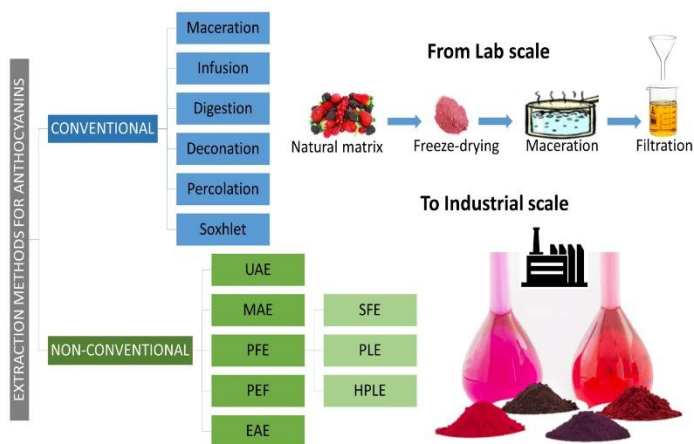
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΔΡΑΣΗ	ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>Listeria monocytogenes</i>	Βοτάνων	Αντιμικροβιακή	Cutter, C. N. (2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Πιπεριών	Αντιμικροβιακή	Koffi-Nevry, et al. (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Πιπεριών	Αντιμικροβιακή	Cichewicz, R. H., et al (1996)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΚΧΥΛΙΣΗ

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η εκχύλιση είναι μια μέθοδος προκατεργασίας για την παραλαβή μιας ή περισσότερων ενώσεων από ένα μίγμα και την απομάκρυνση προσμίξεων και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δυο φάσεων, που είναι ελάχιστα αναμιγμένες. Επίσης οι μέθοδοι εκχύλισης έχουν επίδραση στον προσδιορισμό και στην ποσοτικοποίηση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στα τρόφιμα. Οι μέθοδοι εκχύλισης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1: τις συμβατικές και μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Ligor et al. 2018).

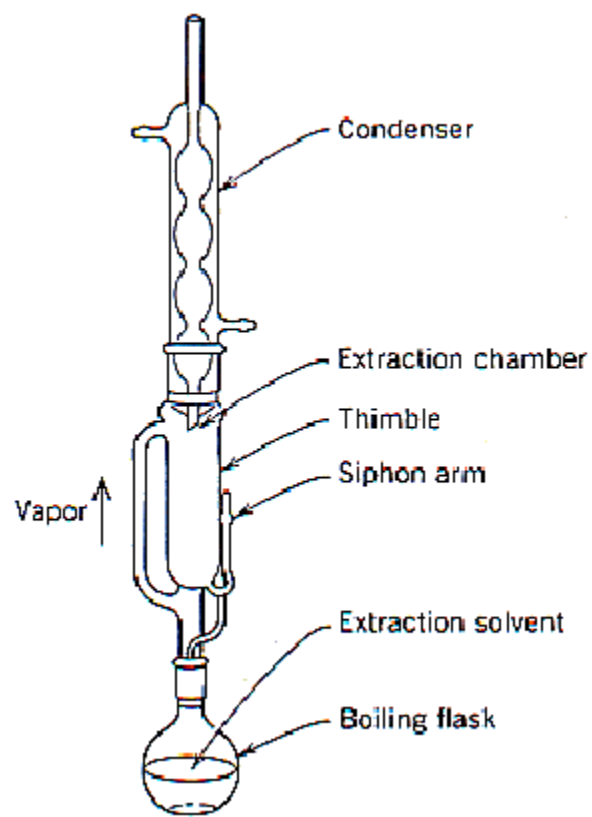


Εικόνα 3. 1: Μέθοδοι εκχύλισης <https://doi.org/10.3390/antiox11020286>

3.1. ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (conventional methods)

3.1.1. Μέθοδος Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet (Soxhlet Extraction) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως. Το δείγμα τοποθετείται, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2, σε μια θήκη από πορώδες υλικό, όπως διηθητικό χαρτί, την «δακτυλήθρα» (thimble). Ο θάλαμος που τοποθετείται η δακτυλήθρα με το υλικό γεμίζεται με τους διαλύτες εκχύλισης. Στην κάτω φιάλη είναι οι διαλύτες εκχύλισης, οι οποίοι βράζουν. Οι υδρατμοί ανεβαίνουν προς τον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται και ρέουν στο θάλαμο που περιέχει το δείγμα, τυλιγμένο στη δακτυλήθρα. Μόλις το συμπυκνωμένο μίγμα διαλύτη φτάσει στο επίπεδο υπερχειλίσης, το διάλυμα αναρροφάται χρησιμοποιώντας ένα σιφόνι και το διάλυμα των διαλυτών επιστρέφεται στη φιάλη απόσταξης με την εκχυλισμένη ουσία. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί πλήρης παραλαβή των εκχυλιζόμενων ουσιών.

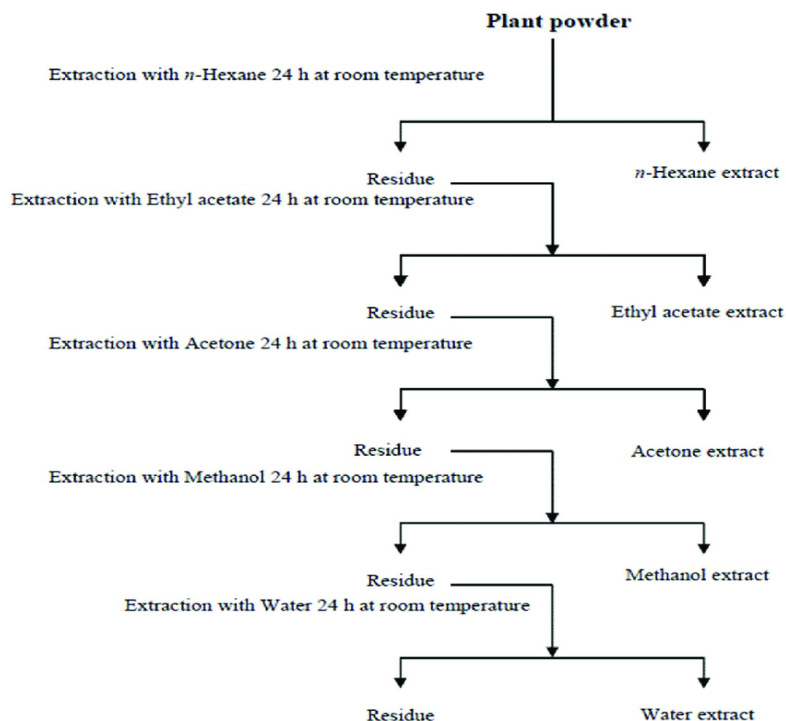


Εικόνα 2. 2: Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet

(Majenkodunmi, 2015).

3.1.2. Διαβροχή (Maceration extraction method)

Κατά τη διαδικασία διαβροχής (maceration), όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3, το φυτικό υλικό τοποθετείται σε ένα δοχείο με πώμα μαζί με τον διαλύτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το νερό, η αιθανόλη και η μεθανόλη. Το μείγμα του φυτικού υλικού και του διαλύτη παραμένει σε συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία) για τουλάχιστον 3 ημέρες, όπου αναδεύεται σε τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να διαλυθεί πλήρως το φυτικό υπόστρωμα. Έπειτα, το μίγμα στραγγίζεται, και η υγρή μάζα της δρόγης που παραμένει, συμπιέζεται. Το υγρό που προέκυψε από το στράγγισμα και το υγρό που προέκυψε από τη συμπίεση, ενώνονται και το τελικό εκχύλισμα οδηγείται σε διαύγαση είτε με διήθηση είτε με απόχυση μετά από παραμονή σε ακινησία (Majenkodunmi, 2015).



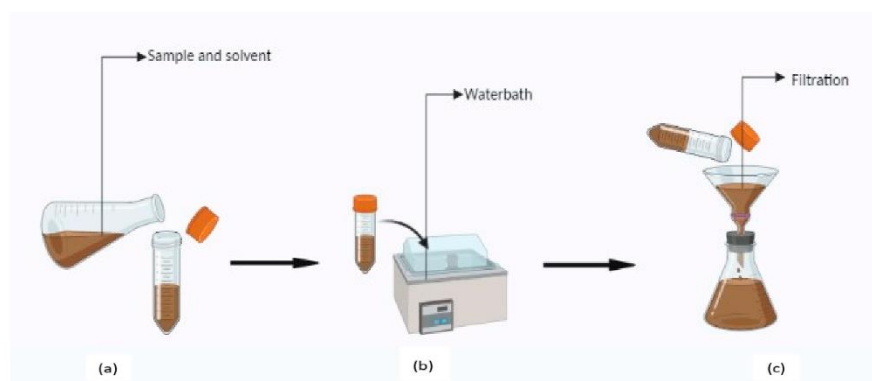
Εικόνα 3. 3: Μέθοδος εκχύλισης Διαβροχή (DOI: 10.3390/d10030053)

3.1.3. Έγχυση (infusion)

Εγχύματα, όπως τσάι, χαμομήλι ή φασκόμηλο, γίνονται με διαβροχή του ακατέργαστου φυτικού υλικού για λίγο χρόνο με κρύο ή βραστό νερό. Τα διαλύματα που προκύπτουν είναι αραιά διαλύματα των ευδιάλυτων συστατικών του ακατέργαστου φυτικού υλικού.

3.1.4. Μέθοδος βρασμού (Decoction extraction method)

Η μέθοδος του βρασμού περιλαμβάνει το τεμαχισμό του δείγματος ή την κονιοποίηση του σε μορφή σκόνης και την τοποθέτηση του σε δοχεία κονσερβών. Έπειτα, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4 προστίθεται νερό και η κονσέρβα θερμαίνεται καθώς πραγματοποιείται βρασμός σε χαμηλή φωτιά και στο τέλος το εκχύλισμα ψύχεται και διηθείται σε καθαρά δοχεία (Rasul 2018; Sridhar et al. 2021).

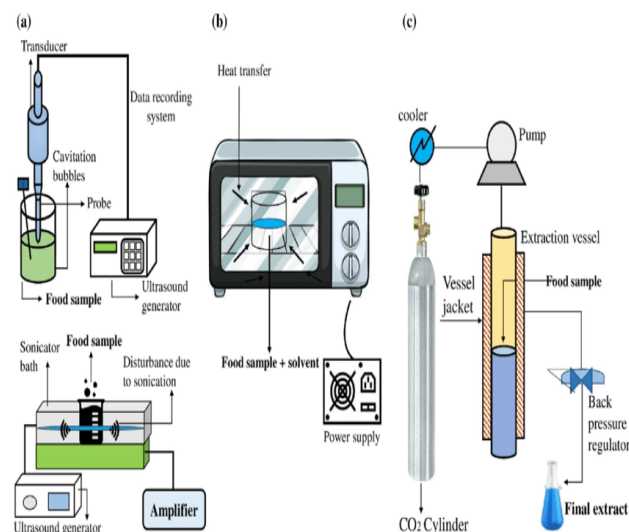


Εικόνα 3. 4: Μέθοδος εκχύλισης βρασμού

3.2. ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (Non-conventional methods)

3.2.1. Εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound assisted method)

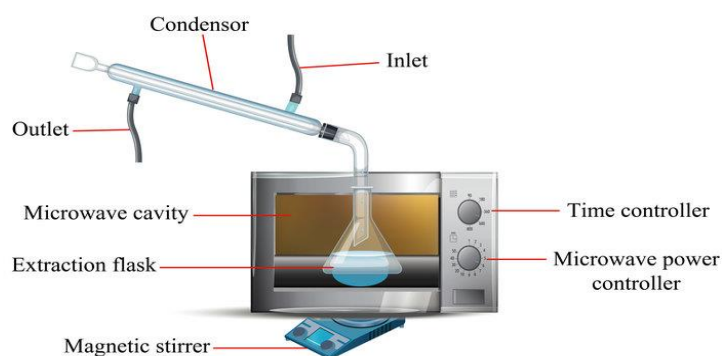
Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου όπως φαίνεται στην εικόνα 2.5 εφαρμόζονται δονήσεις μέσω υπερήχων, οι οποίες δημιουργούν φυσαλίδες προκαλώντας διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι γίνεται η διείσδυση του διαλύτη μελετούμενο υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την άμεση επαφή του διαλύτη και των συστατικών του κυττάρου καθιστώντας πιο εύκολη την απελευθέρωση τους και τη μεταφορά τους στο διαλύτη (Λαμπούση, Ν. 2022).



Εικόνα 2. 5: Εκχύλιση με υπερήχους

3.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction)

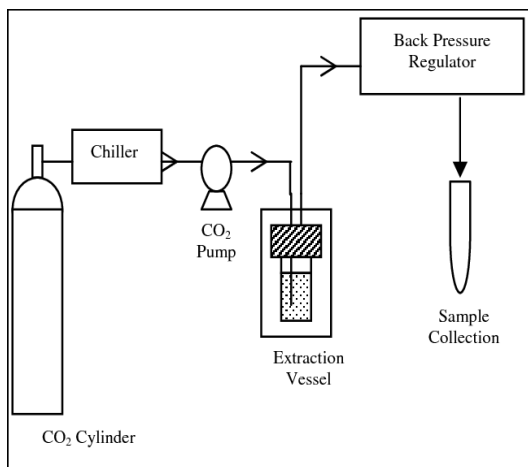
Η εκχύλιση με την μέθοδο των μικροκυμάτων είναι μια νέα μέθοδος κατά την οποία γίνεται χρήση συχνοτήτων από 300MHz έως 300 GHz. Η μέθοδος επιτυγχάνει ταχεία θέρμανση με τα μικροκύματα και έτσι επιτρέπει τον υψηλότερο ρυθμό εκχύλισης σε σύγκριση με την τεχνική Soxhlet. Η υψηλή θέρμανση έχει ως αποτέλεσμα η υγρασία να εξατμίζεται, αυξάνοντας την εσωτερική πίεση που ασκείται στο κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα, λόγω της πίεσης, διαρρηγνύεται και τα συστατικά αποβάλλονται από τα διερρηγμένα κύτταρα στο διαλύτη (Λαμπούση, Ν. 2022, Ραηja, Ρ. 2018). Η διαδικασία απεικονίζεται στην ακόλουθη εικόνα 3.6



Εικόνα 3. 6: Εκχύλιση με μικροκύματα

3.2.3. Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical fluid extraction)

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (supercritical fluid extraction – SFE) είναι γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης κατά την οποία δεν υπάρχουν στάδια καθαρισμού, οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται δεν είναι επιβλαβείς και γίνεται χρήση ήπιων συνθηκών θερμοκρασίας. Υπερκρίσιμο ρευστό είναι οποιαδήποτε ουσία βρίσκεται σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, οι οποίες έχουν υπερβεί το κρίσιμο σημείο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συμπεριφέρονται σαν μία ενιαία φάση διατηρώντας ταυτόχρονα τις ιδιότητες τόσο του αερίου όσο και του υγρού. Έτσι διαχέονται στη στερεή επιφάνεια του προς εκχύλιση δείγματος σαν αέρια και απελευθερώνουν τα ενεργά συστατικά του σαν υγρά. Ο συνηθέστερος διαλύτης είναι το διοξείδιο του άνθρακα, οποίος είναι ένα αδρανές και μη εύφλεκτο μέσο (Λαμπούση, Ν. 2022). Η διαδικασία απεικονίζεται στην ακόλουθη εικόνα 3.7



Εικόνα 3.7.: Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά

3.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Οι δύο παραπάνω κατηγορίες εκχυλίσεων φέρουν τις εξής διαφορές. Πρώτον στις μη συμβατικές τεχνικές οι διαλύτες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι το νερό και διάφορα υδατοαλκοολικά διαλύματα τα οποία είναι αναγνωρισμένοι ως GRAS (Generally Recognized As Safe). Αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν τοξική δράση και χρειάζονται μικρότεροι όγκοι ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Επομένως οι τεχνικές αυτές είναι φιλικές προς το περιβάλλον αντίθετα με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης που επιβαρύνουν το περιβάλλον λόγω της χρήσης επιβλαβών οργανικών διαλυτών σε μεγάλες ποσότητες. Δεύτερον οι συμβατικές μέθοδοι απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Ως αποτέλεσμα των δυο παραπάνω αιτιών οι βιοδραστικές ενώσεις του δείγματος υποβαθμίζονται. Παρ' όλα αυτά οι συμβατικές τεχνικές εκχυλίσεις εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται καθώς έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές και εμφανίζουν υψηλές αποδόσεις των εκχυλιζόμενων ουσιών.

Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως οι μη συμβατικές τεχνικές αρχίζουν να εφαρμόζονται συχνότερα από τις συμβατικές λόγω των πλεονεκτημάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω και πολύ πιθανών να αντικαταστήσουν τις συμβατικές μεθόδους ξεπερνώντας και μερικά μειονεκτήματα όπως για παράδειγμα τον ακριβό εξοπλισμό (Σαρόγλου, Β., & Αναγνωστοπούλου, Α. 2023).

3.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ

Οι μέθοδοι εκχύλισης που αναλύθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιούνται με σκοπό την ανάκτηση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων από τους σπόρους της πιπεριάς. Επιπλέον, υπάρχουν διαφορετικές τεχνικές με μια σειρά ιδιοτήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να τροποποιηθούν ανάλογα με την ανάγκη της ανάλυσης και την ένωση. Επιπλέον, σε κάθε μέθοδος εκχύλισης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητά της. Οι σημαντικότεροι είναι: ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, και ο διαλύτης. Αρχικά ο χρόνος την εκχύλισης επηρεάζει την απόδοση καθώς καθορίζει τον χρόνο που θα είναι σε επαφή ο διαλύτης με την εκχυλιζόμενη ουσία. Συνήθως για μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης παράγεται εκχύλισμα πλουσιότερο σε βιοδραστικές ενώσεις. Δεύτερον η θερμοκρασία επηρεάζει την διαλυτότητα της ουσίας Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερη είναι η κινητική ενέργεια του μορίου, αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά του. Τέλος ο διαλύτης που θα επιλεγεί έχει μεγάλη σημασία ως προς την πολικότητα του καθώς για πολικές εκχυλιζόμενες ενώσεις (π.χ. αμινοξέα) χρησιμοποιούνται πολικοί διαλύτες και αντίστοιχα για μη πολικές εκχυλιζόμενες ενώσεις (π.χ. εξάνιο) χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες (Σαρόγλου, Β., & Αναγνωστοπούλου, Α. 2023). Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.1) φαίνονται κάποιες από τις μεθόδους εκχύλισης των πιπεριών.

Πίνακας 3. 1: Μέθοδοι εκχύλισης πιπεριών

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΕΚΧΥΛΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Υπέρηχοι	-Πλάτος υπέρηχων -Θερμοκρασία -Χρόνος	-Καροτενοειδη – καψαϊκιννοειδη	DOI 10.1016/j.lwt.2019.108 32
Υπερκρίσιμο υγρό	-Θερμοκρασία -Πίεση	Καψαϊκιννοειδη	10.26656/φρ.2017.6(5) .537
Soxhlet	-Είδος διαλύτη	-φαινολικά, - καψαϊκιννοειδή, - καροτενοειδή - φλαβονοειδή	Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., & Patil, B. S. (2012).
Μικροκύματα	-Χρόνος -Θερμική ισχύς	-Αιθέρια έλαια	Zhang, C., Gu, F., Hu, W., Wu, G., Chen, W., Dong, C., & Niu, Z. (2022)
Διαβροχή	-Χρόνος	-Ελαιορητίνη	10.1016/j.foodchem.20 12.03.108

3.5. ΑΛΚΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ ΩΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ/ ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Αν και στη βιβλιογραφία έχουν εφαρμοστεί διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, η χρήση διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον όπως η αιθανόλη έχει αυξηθεί, οδηγώντας στην ανάπτυξη προϊόντων κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση. Για παράδειγμα, τα αλκοολούχα ποτά που περιέχουν αιθανόλη 40-50% μπορούν να θεωρηθούν βρώσιμοι διαλύτες. Τα πλεονεκτήματα των βρώσιμων διαλυτών είναι ότι δεν χρειάζονται απομάκρυνση, δηλαδή περαιτέρω επεξεργασία όπως οι κλασσικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται ευρέως (C Duque-Soto · 2023). Η επιτροπή περιβαλλοντικής υγείας και ασφάλειας, ορίζει ως “πράσινο διαλύτη” τους διαλύτες με θετικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο, καθώς και με λιγότερη τοξικότητα προς το περιβάλλον. Για παράδειγμα η αιθανόλη, το νερό και η ακετόνη ανήκουν στον κατάλογο των πράσινων διαλυτών Marina Cvjetko Bubalo (2018) Η αιθανόλη ή αιθυλική αλκοόλη έχει υψηλή διαλυτότητα για πολλές ενώσεις όπως αλδεΐδες, αιθέρες και αμίνες και μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη μούχλας και βακτηρίων όταν η συγκέντρωσή της είναι πάνω από 20%. Ως εκ τούτου, διαθέτει αντιμικροβιακή δράση και είναι ασφαλής η χρήση της σε τρόφιμα (food grade) (‘Different Methods of Extraction Pharmaceutics Notes | The Pharmapedia’ 2022). Επιπροσθέτως, σύμφωνα με μελέτες που έγιναν, η αντιοξειδωτική δράση της αιθανόλης είναι σε υψηλό επίπεδο σε σύγκριση με άλλους ευρέως χρησιμοποιούμενους διαλύτες όπως είναι η μεθανόλη και η ακετόνη.(Sharif and Bennett 2016; Mohammad Salamatullah et al. 2022).

Τα οινοπνευματώδη ποτά είναι διαλύματα νερού-αιθανόλης που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (40%). Η έρευνα δείχνει ότι αυτό το δυαδικό μείγμα (αιθανόλη-νερό) έχει μια συνεργατική δράση που μεγιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης. Το νερό διαλύει πολικές ενώσεις και οι οργανικοί διαλύτες ανακτούν λιγότερα πολικά συστατικά. Επιπλέον αλκοολούχα ποτά όπως το τζιν και η βότκα έχει αποδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να εκχυλίζουν φαινολικά συστατικά δρώντας ως διαλύτες εκχύλισης με σχεδόν την ίδια αποτελεσματικότητα με ένα διάλυμα αιθανόλης 40% (Ortinero et al. 2021). Στην παρούσα πτυχιακή έγινε χρήση του στίπουρου, ενός αποστάγματος ελληνικής προέλευσης, ως διαλύτη για την μελέτη φαινολικού περιεχομένου και της αντιμικροβιακής δράσης των σπόρων πιπεριάς Jalapeño.

3.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι πιπεριές Jalapeño περιέχουν πολλές βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν σημαντική δράση στην υγεία των καταναλωτών, επομένως είναι πολύ σημαντικός ο προσδιορισμός των ενώσεων αυτών ώστε να γίνει βιολογική τους αξία στην υγεία, στην διατροφή και στην φαρμακευτική βιομηχανία. Οι βασικότεροι μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις

φασματοφωτομετρικές και τις χρωματογραφικές μεθόδους που αποτελούνται από δύο υποκατηγορίες, τις μεθόδους υγρής και αέριας χρωματογραφίας. Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.2) φαίνονται μερικές μέθοδοι προσδιορισμού των βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα πιπεριάς.

Πίνακας 3. 2: Μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών ενώσεων

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Φασματομετρία UV-Vis (μήκος κύματος 450nm) HPLC-IR	Βρώσιμο μέρος πιπεριάς	Με χρήση πετρελαικού αιθέρα	Καροτενοειδή	(Tejeda et al. 2022)
	Περικάρπιο και πλακούντας	Με χρήση αποσταγμένου νερού	Φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη	(Zamljen et al. 2022)
Χρωματογραφία HPLC-DAD	Σπόροι	Αλκολική υδρόλυση και σαπωνοποίηση των ελεύθερων ενώσεων	Στερόλες, τριτερπένια	(Silva et al. 2013)
LC-ESI-QTOF-MS/MS	Πούλπα και σπόροι	Με χρήση διαλύματος αιθανόλης 80%	Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, σιλβένια	(Leng et al. 2022)
UHPLC-ESI-MS/MS	Βρώσιμο μέρος πιπεριάς	Εκχύλιση 0,3g δείγματος με 3ml διαλύματος νερού:ακετονιτριλίου (20:80 v/v	Φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις	(Tejeda et al. 2022)
UHPLC-ESI-MS/MS	Περικάρπιο, σπόροι και πλακούντας	Εκχύλιση με 4 ml μεθανόλης 80% σε νερό	Καψαϊκιοειδή	Zamljen et al. 2022)

3.7. ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ (Design Of Experiments)

Ο πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments (DOE)) είναι ένα στατιστικό εργαλείο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης συστημάτων, διαδικασιών και προϊόντων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, για να βελτιστοποιήσει διάφορες διαδικασίες ή μεθόδους σε πολλούς τομείς με σκοπό να πάρουμε το επιθυμητό σε κάθε περίπτωση αποτέλεσμα. Τα τελευταία 20 χρόνια η εφαρμογή του DOE αυξάνεται ραγδαία. Επίσης είναι το πιο δημοφιλές εργαλείο σε επιστημονικούς τομείς της ιατρικής, της μηχανικής, της βιοχημείας

και της φυσικής. (Durakovic, B. 2017). Το πλεονέκτημα του DOE είναι ότι εντοπίζει σημαντικούς παράγοντες μιας διεργασίας και στη συνέχεια βελτιστοποιεί μια απόκριση σε σχέση με αυτούς κατά την ανάπτυξη μεθόδου με τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό πειραμάτων. Ο στατιστικός σχεδιασμός πειραμάτων (DOE) είναι ανώτερος από την παραδοσιακή προσέγγιση αλλαγής ενός παράγοντα την κάθε φορά, όταν πρέπει να βελτιστοποιηθούν διαφορετικοί παράγοντες μια διαδικασίας (Coscollà, C et al 2014). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) φαίνονται εφαρμογές μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού.

Πίνακας 3. 3: Εφαρμογές μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού

ΠΑΡΟΠΡΟΙΟΝ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΕΚΧΥΛΙΖΟΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Δημητριακά	Soxhlet	Φαινολικές ενώσεις	Μοντέλο επιφανειών απόκρισης (RSM)	Liyana-Pathirana, (2005).
Αλκοόλουχα ποτά	Υγρή εκχύλιση	Καρβαμιδικοκαιθυ λεστέρας	Face-centered central composite design (CCD)	Zhang, Y., & Zhang, J. (2008)
Φύλλα δυόσμου	Soxhlet	Φλαβονοειδή	complete randomized design (CRD) full factorial	Bimakr et al (2011)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των πράσινων πιπεριών (*Jalapeño*) του γένους *Capsicum annuum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και τον χαρακτηρισμό του φυτοχημικού προφίλ με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS).

Ο όγκος των παραπροϊόντων που προκύπτουν είναι μεγάλος κυρίως από τις βιομηχανίες τροφίμων. Όμως έχει δοθεί έμφαση σε αυτά αφού αποτελούν μία πρώτη ύλη για την δημιουργία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Πολλά από τα παραπροϊόντα, όπως φλούδες και κουκούτσια, περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις, όπως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Παράλληλα, τα παραπροϊόντα αυτά είναι πολύ χρήσιμα για την βιομηχανία των τροφίμων ως ενισχυτικοί ή αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως μπορούν και να χρησιμοποιηθούν για τις θρεπτικές και βιολογικές τους ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.λπ.). Παρόλα αυτά ακόμα ο προσδιορισμός ιδιοτήτων τους, όπως η αντιμικροβιακή και η αντιοξειδωτική δράση αποτελούν μεγάλη πρόκληση.

Κατά το πειραματικό μέρος της εργασίας εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριάς *Jalapeño*, που ελήφθησαν κατά την κλασική εκχύλιση υγρού-στερεού με διαλύτη ένα εγχώριο αλκοολούχο απόσταγμα, το τσίπουρο. Μετρήθηκε η απορρόφηση κάθε εκχυλίσματος στα 750 nm και εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος (GAE)/g σπόρου. Όσο αφορά τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης έγινε με χρήση οπτικής πυκνότητας των εκχυλισμάτων σε τρεις μικροοργανισμούς (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*) με χρήση του οργάνου Bioscreen C και υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής των μελετούμενων μικροοργανισμών που προκαλείται από τα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς έναντι. Ακόμη πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία (LC-MS) με σκοπό την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων και τον χαρακτηρισμό του φυτοχημικού προφίλ επιλεγμένων εκχυλισμάτων.

Επιπλέον, η καινοτομία της παρούσας εργασίας έγκειται και στη χρήση του τσίπουρου ως διαλύτη για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων κατά την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μελετούμενων μικροοργανισμών. Το τσίπουρο είναι υδατοαιθανολικό διάλυμα και άρα διαθέτει παρόμοια χαρακτηριστικά με έναν κλασικό οργανικό διαλύτη, όπως την αιθανόλη. Το πλεονέκτημα του τσίπουρου είναι ότι είναι ποτό, είναι βρώσιμο και έτσι δεν χρειάζεται να αφαιρεθεί από το προϊόν και αποτελεί ένα εξαιρετικό εκχυλιστικό μέσο.

Συνοψίζοντας οι βασικοί στόχοι είναι: (α) ο έλεγχος της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριών *Jalapeño* ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ενισχυτικοί /αντιμικροβιακοί παράγοντες σε προϊόντα τροφίμων, (β) η ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων επιλεγμένων εκχυλισμάτων και (γ) η δοκιμή των αλκοολούχων αποσταγμάτων ως βρώσιμοι διαλύτες εκχύλισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

4. Προετοιμασία δείγματος

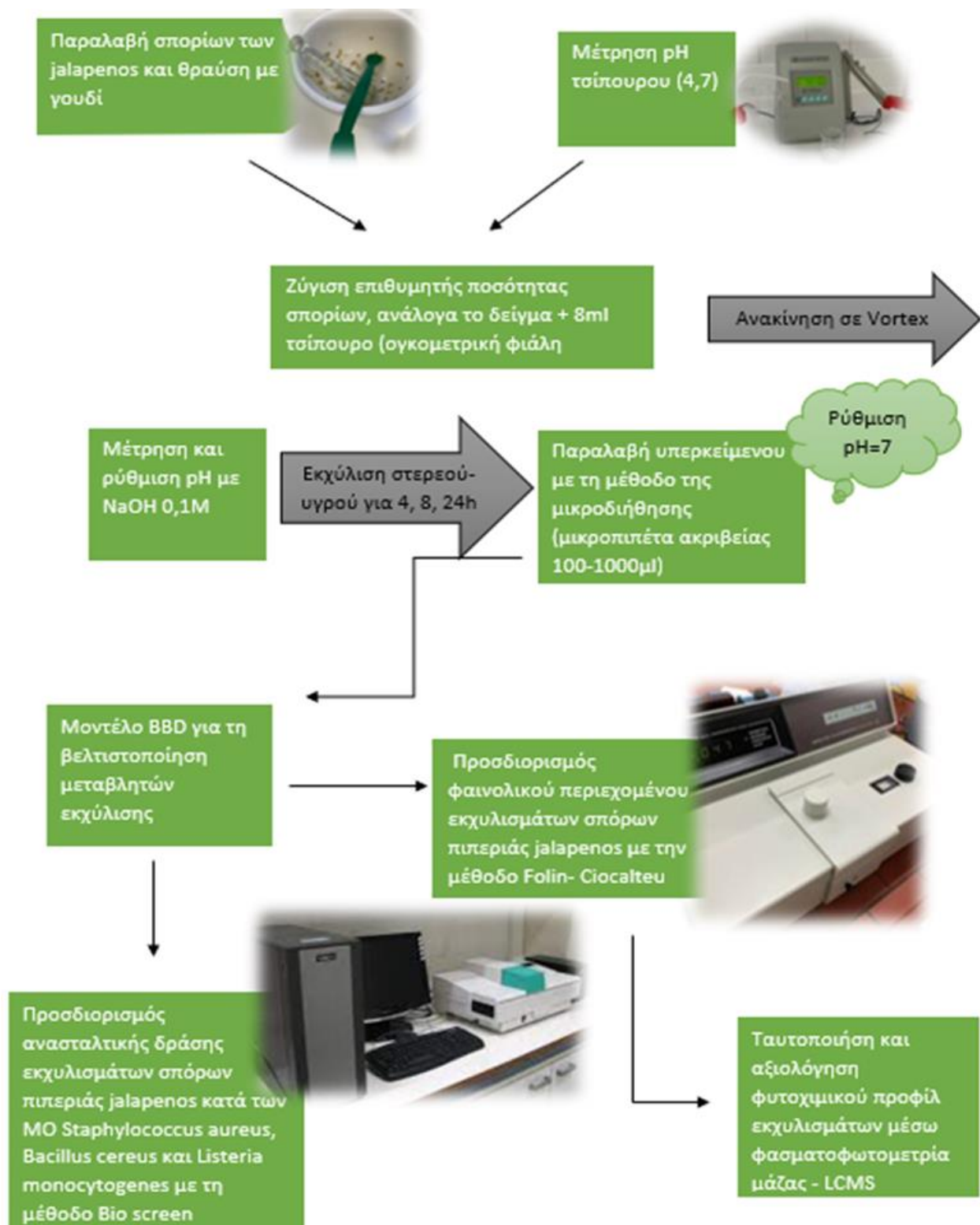
Παραλήφθηκε επαρκής ποσότητα πράσινων πιπεριών του είδους Jalapeño (περίπου 10), από τοπική λαχαναγορά. Στη συνέχεια το δείγμα καθαρίστηκε και απομονώθηκαν τα σπόρια με σκοπό τη θραύση τους σε γουδί για καλύτερη απόδοση της εκχύλισης. Έτσι, διαφορετικές ποσότητες κονιοποιημένων σπόρων τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Falcon, όπου προστέθηκε ποσότητα 8 ml τσίπουρου, το οποίο επιλέχθηκε ως διαλύτης. Στην συνέχεια, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό εξετάστηκαν 3 παράμετροι εκχύλισης (χρόνος εκχύλισης, pH και αναλογία μάζας δείγματος/ διαλύτη) και προέκυψαν 15 συνδυασμοί από τους οποίους προέκυψαν 15 εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς (επί 3 πανομοιότυπα), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1. Σημαντική υποσημείωση πως η ρύθμιση του pHμετρου έγινε με τη βοήθεια διαλυμάτων καυστικού νατρίου (NaOH) και υδροχλωρίου (HCl) συγκεντρώσεων 0,1N.

Πίνακας 4. 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)
14	1	8	2,5	5,5	0,2	8
11	2	8	1,25	6,5	0,096	8
13	3	8	2,5	5,5	0,2	8
10	4	8	5,0	4,5	0,4	8
12	5	8	5,0	6,5	0,4	8
5	6	4	2,5	4,5	0,2	8
7	7	4	2,5	6,5	0,2	8
3	8	4	5,0	5,5	0,4	8
2	9	24	1,25	5,5	0,096	8
6	10	24	2,5	4,5	0,2	8
4	11	24	5,0	5,5	0,4	8
15	12	8	2,5	5,5	0,2	8
8	13	24	2,5	6,5	0,2	8
9	14	8	1,25	4,5	0,096	8
1	15	4	1,25	5,5	0,096	8

4.1. Πειραματική Πορεία

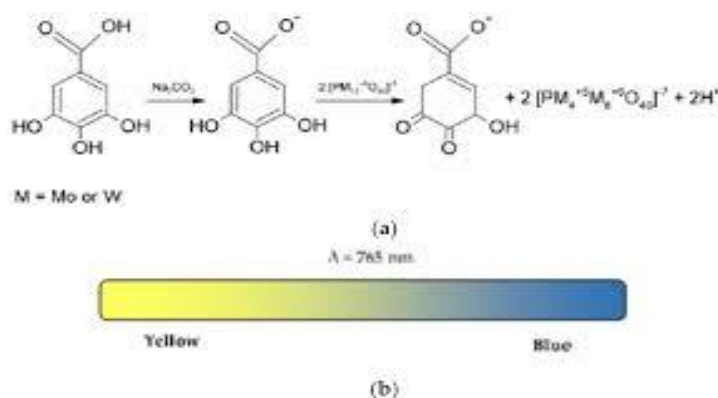
Στο παρακάτω διάγραμμα ροής (Εικόνα 4.1) περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα σπόρων πιπεριάς κατά τον πειραματικό σχεδιασμό Box Behnken. Για τα προτεινόμενα από το μοντέλο Box-Behnken πειράματα έχουν κατασκευαστεί 4 διαφορετικά τελικά μοντέλα με βάση τις 4 διαφορετικές τελικές αποκρίσεις/μετρούμενα μεγέθη (ολικό φαιολικό περιεχόμενο, ποσοστό αναστολής για κάθε ένα από του 3 εξεταζόμενους μικροοργανισμούς).



Εικόνα 4. 1: Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας

4.1.1. Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου – Μέθοδος Folin Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) προσδιορίστηκε με την μέθοδο Follin- ciocalteu. Αρχικά σε πλαστικές κυψελίδες των 4ml τοποθετήθηκαν με μικροσύριγκα 400μL δείγματος, 2500μL αποσταγμένο νερό και 200μL αντιδραστηρίου οξειδοαναγωγής Follin- ciocalteu το οποίο αποτελείται από άλατα μολυβδένιου (Mo) και βολφραμιου (W). Στην συνέχεια έγινε ανάδευση του δείγματος και παρέμεινε στο σκοτάδι για 8 λεπτα. Έπειτα οσοπροστέθηκαν 500μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου και οι κυψελίδες παρέμειναν σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40° C σε συνθήκες σκότους ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και να γίνει το διάλυμα από κίτρινο σε μπλέ. Ακολουθως οι κυψελίδες βγήκαν από το υδατόλουτρο ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηθηκε η απορρόφησή τους στα 750nm με το φασματοφωτόμετρο Spectro 23 (Labomed, inc.USA) με βάση την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης- συγκέντωσης: $A=0,0005C + 0,00783$, $R2=0,9989$. Τέλος τυχόν σφάλμα στην τιμή της απορρόφησης διορθώθηκε με την χρήση τυφλού δείγματος. Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε ένα από τα 15 δείγματα και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE ανά γραμμάρια δείγματος).



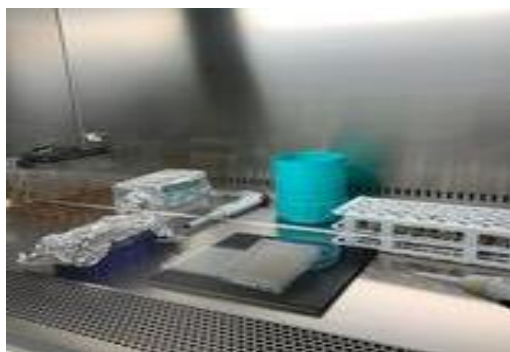
Εικόνα 4. 2: Αντίδραση φαινολικών ενώσεων και αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (a), παρατηρούμενες χρωματικές αλλαγές (b) (Munteanu and Apetrei 2021)

4.1.2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης – Μέτρηση με Bioscreen

Αφού τα δείγματα προετοιμάστηκαν, στάλθηκαν για λυοφιλίωση σε συγκεκριμένο όγκο (1 ml) ώστε το δείγμα να διατηρήσει χαμηλή θερμοκρασία και να αποφευχθούν μεταβολές στα βιοδραστικά συστατικά του, καθώς με την αφαίρεση του νερού αποφεύγεται η ποιοτική υποβάθμιση του δείγματος λόγω υγρασίας. Έπειτα ζυγίστηκε το ξηρό υπόλειμμα με την βοήθεια αναλυτικού ζυγού και έγινε επαναδιάλυση τους με απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια τα εκχυλίσματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν και προετοιμάστηκαν καταλλήλως για την αντιμικροβιακή τους δράση με το μηχάνημα Bioscreen C (Oy Grovth Curves Ab Ltd, Finland). Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά: ένα θρεπτικό υπόστρωμα Broth, τα αναγεννημένα μείγματα και οι τρεις προς εξέταση μικροοργανισμοί (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και την *Listeria monocytogenes*). Στην ειδική πλακέτα (template) του bioscreen

προετοιμάστηκαν τα δείγματα και δυο διαφορετικές κατηγορίες μαρτύρων. Για την δημιουργία των δειγμάτων χρειάστηκαν 300μl Broth, 30μl αναγεννημένου δείγματος και 20μl μικροοργανισμού. Ο χώρος πραγματοποίησης του πειράματος απεικονίζεται και στην εικόνα 4.3. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε ένα από τα 15 εκχυλίσματα. Η πρώτη κατηγορία μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκε ονομάστηκε negative control και αποτελούταν από 300ml Broth και 30μl αναγεννημένου δείγματος, ενώ στην δεύτερη κατηγορία που ονομάστηκε positive control προστέθηκε 300μl Broth και 20μl μικροοργανισμού και φτιάχτηκαν 3 positive control.

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών η ειδική πλακέτα (template) τοποθετήθηκε στο Bioscreen C και ρυθμίστηκαν οι συνθήκες της θερμοκρασίας στους 37 °C, η οποία είναι η βέλτιστη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και του χρόνου, ο οποίος διέφερε σε κάθε μικροοργανισμό. Για τον *Staphylococcus aureus* και την *Listeria monocytogenes* καταγράφηκαν μετρήσεις για 48 ώρες, ενώ για των *Bacillus* απαιτήθηκαν μόλις 12 ώρες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αφορούσαν την οπτική πυκνότητα και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με την επέκταση της εφαρμογής DMFIT 3-_5 του excel. Τέλος μέσω μαθηματικών τύπων προέκυψαν τα αποτελέσματα αναστολής (% inhibition) των εκχυλισμάτων για τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 4. 3: Απεικόνιση χειρισμού της μεθόδου Bioscreen C στο εργαστήριο

4.1.3. Προσδιορισμός φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριάς Jalapeño

Για την ταυτοποίηση του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδο LCMS, η οποία συνδυάζει υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (John Wiley & Sons; 2003, John Wiley & Sons; 2001). Υπάρχουν στοχευμένες και μη στοχευμένες αναλύσεις για την ταυτοποίηση των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων. Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση της μη στοχευμένης ανάλυσης, όπου επικεντρώνεται στην ταυτοποίηση των ενώσεων των εκχυλισμάτων χωρίς την χρήση πρότυπων διαλυμάτων ενώσεων. Ξεκινώντας τη διαδικασία του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 7 δείγματα στο σύνολο, τα οποία αντιπροσώπευαν τα ελάχιστα και μέγιστα αποτελέσματα όσον αναφορά τα περιεχόμενα φαινολικά και το ποσοστό αναστολής για κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Στα

λυοφιλωμένα δείγματα προστέθηκε 500ml μεθανόλη και έγινε καλή ανάδευση σε Vortex μέχρι την πλήρη διάλυση του στερεού μέρους. Έπειτα τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα PET με μέγεθος πόρων 0.45 μm και διάμετρο 13 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία) και προστέθηκαν σε ειδικά φιαλίδια ανάλυσης LCMS. Όλα τα διαγράμματα και τα φάσματα αναλύθηκαν, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Analyst 1.6.3 (AB SCIEX, ΗΠΑ).

4.2. Μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού Box –Behnken

Με την χρήση μοντέλου Box Behnken προέκυψαν διάφοροι συνδυασμοί συνθηκών εκχύλισης σύμφωνα με τους οποίους θα διεξαχθούν τα πειράματα για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και την αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων.

Αρχικά έγινε καθορισμός των παραγόντων

Στο πρώτο στάδιο έγινε:

Καθορισμός των παραγόντων της εκχύλισης.

Πιο συγκεκριμένα x_1 : χρόνος εκχύλισης, x_2 : αναλογία διαλύτη/μάζα δείγματος, x_3 : pH

- Δόθηκαν 3 τιμές για κάθε παράμετρο όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 4. 2: Επίπεδα τιμών 3 παραγόντων

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ
Χρόνος εκχύλισης (h) (1)	4	8	24
pH (2)	4.5	5.5	6.5
Αναλογία	1.25	2.5	5
Σπόρων/διαλύτη(% w/v) (3)			

- Έγινε εφαρμογή του συμμετρικού πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου βαθμού, Box-Behnken και βάση του μοντέλου που προέκυψε, πραγματοποιήθηκαν δεκαπέντε πειράματα τυχαίων συνδυασμών συνθηκών εκχύλισης.

- Έπειτα έγιναν τα πειράματα σύμφωνα με το μοντέλο Box-Behnken και προέκυψαν τα αποτελέσματα για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (έκφραση σε mg GAE / σπόρων πιπεριάς) και τη αντιμικροβιακή δράση (έκφραση σε ποσοστό αναστολής) των εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριάς Jalapeño.
- Ακολούθως έγινε επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων και έλεγχος του πειραματικού μοντέλου σχετικά με την αξιοπιστία του με βάση την τιμή R^2 (συντελεστής παλινδρόμησης και του R^2_{adj} (διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης)
- Τέλος από το μοντέλο προέκυψαν τρεις πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την λήψη μέγιστης ποσότητας φαινολικών και μέγιστο ποσοστό αναστολής δράσης μικροοργανισμών.

Από την στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων προέκυψε η εξίσωση πρόβλεψης του ολικού φαινολικού περιεχομένου και οι τρεις εξισώσεις πρόβλεψης για την μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης του κάθε μικροοργανισμού. Ακόμη για κάθε πείραμα φτιάχτηκαν πίνακες ανάλυσης διακύμανσης των παραγόντων (analysis of variance, ANOVA) και τα αντίστοιχα ραβδογράμματα Pareto, όπως τα διαγράμματα τριών διαστάσεων για την αλληλεπίδραση των παραμέτρων της εκχύλισης.

4.3. Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων

Για τον έλεγχο της ορθότητας του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού απαιτείται έλεγχος συγκεκριμένων στατιστικών δεικτών. Μια από τις στατιστικές μεθόδους είναι η ανάλυση διακύμανσης ή διασποράς (Analysis of Variance-ANOVA), που υποδεικνύει τους σημαντικούς παράγοντες ($p\text{-value} \leq 0,05$) της εκχύλισης και την αξιοπιστία του παραγόμενου μοντέλου. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, αξιολογήσαμε τη σημασία όλων των διαφορετικών 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 Statistica (έκδοση 14.0.1.25, trial version) και η αξιολόγηση των παραγόντων και η αξιοπιστία του πειραματικού μοντέλου βασίστηκε στους παρακάτω όρους:

- P-value: Είναι ένας δείκτης στατιστικής σημαντικότητας. Ορίζοντας το επίπεδο εμπιστοσύνης στο 95% όταν δίνεται τιμή P ενός παράγοντα μικρότερη του 0,05 ο παράγοντας θεωρείται σημαντικός.
- R^2 : Συντελεστής παλινδρόμησης κυμαίνεται από $0 < R^2 < 1$ ή $0\% < R^2 < 100\%$ και εκφράζει το ποσοστό διασποράς που παρατηρείται στο μοντέλο. Όσο πιο κοντά στην μονάδα είναι το R^2 τόσο πιο αξιόπιστο είναι το μοντέλο.
- R^2_{adj} : Διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης ή προσδιορισμού. Αν στο μοντέλο υπάρχουν αρκετές μη στατιστικά σημαντικές μεταβλητές τότε προκύπτει μείωση του

δείκτη αυτού . Για να θεωρηθεί ένα μοντέλο αξιόπιστο πρέπει να έχει τιμές $R^2_{adj} > 80\%$ και η διάφορα μεταξύ του R^2 και του R^2_{adj} δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 20 % και τέλος θα πρέπει να ισχύει $R^2 > R^2_{adj}$

(ΤΣΑΚΝΗΣ ΓΙΑΝΝΗΣ, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

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

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1). Το φαινολικό περιεχόμενο δώθηκε σε mg γαλλικού οξέος (GAE)/g σπόρου πιπεριάς (mg GAE/g seed).

Πίνακας 5. 1: Πειραματικά δεδομένα φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων

ΣΕΙΡΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	TPC (mg GAE/g seed)
1	0,229
2	0,265
3	0,277
4	0,298
5	0,360
6	0,226
7	0,261
8	0,495
9	0,186
10	0,288
11	0,378
12	0,329
13	0,217
14	0,119
15	0,111

*TPC: Total Phenolic Content

*Με κόκκινο επισημαίνεται το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 5.1) το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρατηρείται στο πείραμα 8 με τιμή TPC 0,495 (4h, 5,00% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=5,5). Ενώ

μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο παρουσίασε το πείραμα 15 με τιμή TPC 0,111 (4h, 1,25% w/v αναλογία σπόρων-διαλύτη, pH=5,5).

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα προέκυψε η εξίσωση από το μοντέλο Box-Behnken:

$$TPC \text{ (mg GAE/ g dry seed)} = -0,36 + 0,04 X_1 - 0,001 X_1^2 + 0,063 X_2 - 0,012 X_2^2 + 0,09 X_3 - 0,002 X_3^2$$

Όπου:

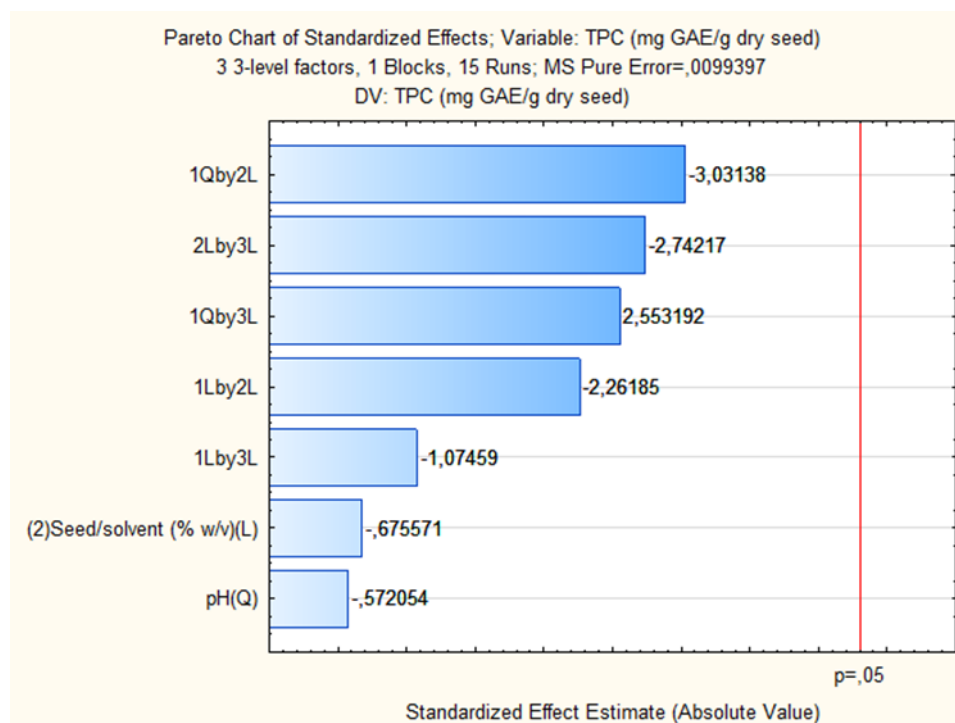
- X_1 : ο γραμμικός όρος του χρόνου εκχύλισης σε ώρες
- X_2 : της αναλογίας σπόρων /διαλύτη
- X_3 : ο γραμμικός όρος του pH
- X_1^2 : ο τετραγωνικός όρος του χρόνου εκχύλισης σε ώρες
- X_2^2 : ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας σπόρων /διαλύτη
- X_3^2 : ο τετραγωνικός όρος του pH

Πίνακας 5. 2: Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο

Effect Estimates; Var.: TPC (mg GAE/g dry seed); R-sqr=,85687; Adj.: 59923 (3 factor Box-Behnken design, 1 block , 15 runs ((No active dataset)) in 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=,0099397 DV: TPC (mg GAE/g dry seed)										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0.348197	0.028986	12.01264	0.006859	0.223481	0.472913	0.348197	0.028986	0.223481	0.472913
(1)Extraction time (min)(L)	0.022673	0.066946	0.33868	0.767106	-0.265373	0.310719	0.011337	0.033473	-0.132687	0.155360
(2)Seed/solvent (% w/v)(L)	-0.048368	0.075089	-0.64415	0.585493	-0.371451	0.274714	-0.024184	0.037545	-0.185725	0.137357
(3)pH (L)	0.003522	0.080066	0.04399	0.968908	-0.340972	0.348017	0.001761	0.040033	-0.170486	0.174008
pH (Q)	-0.030939	0.052742	-0.58660	0.616862	-0.257871	0.195994	-0.015469	0.026371	-0.128936	0.097997
1L by 2L	-0.207128	0.096691	-2.14217	0.165459	-0.623155	0.208898	-0.103564	0.048345	-0.311577	0.104449
1Q by 2L	-0.225411	0.074372	-3.03085	0.093796	-0.545410	0.094587	-0.112706	0.037186	-0.272705	0.047294
1L by 3L	-0.102667	0.099698	-1.02978	0.411358	-0.531633	0.326299	-0.051333	0.049849	-0.265816	0.163150
1Q by 3L	0.194033	0.078362	2.47613	0.131648	-0.143129	0.531196	0.097017	0.039181	-0.071565	0.265598
2L by 3L	-0.261500	0.099698	-2.62292	0.119791	-0.690466	0.167466	-0.130750	0.049849	-0.345233	0.083733

(L): Όρος γραμμικής μορφής, (Q): Όρος τετραγωνικής μορφής

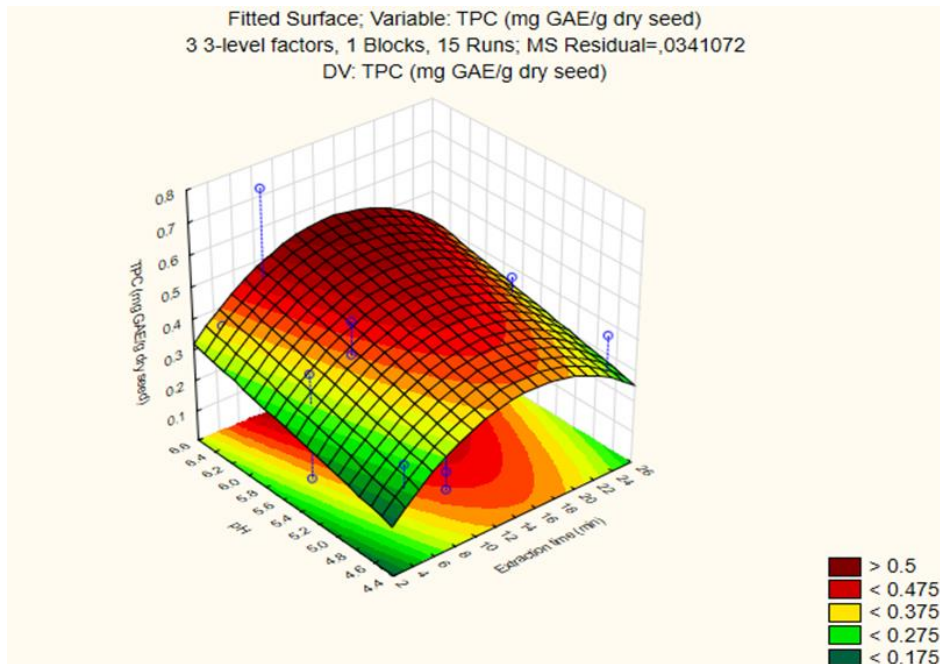
Με κόκκινο επισημαίνονται οι παράγοντες με σημαντική επίδραση (p-value≤0,05).



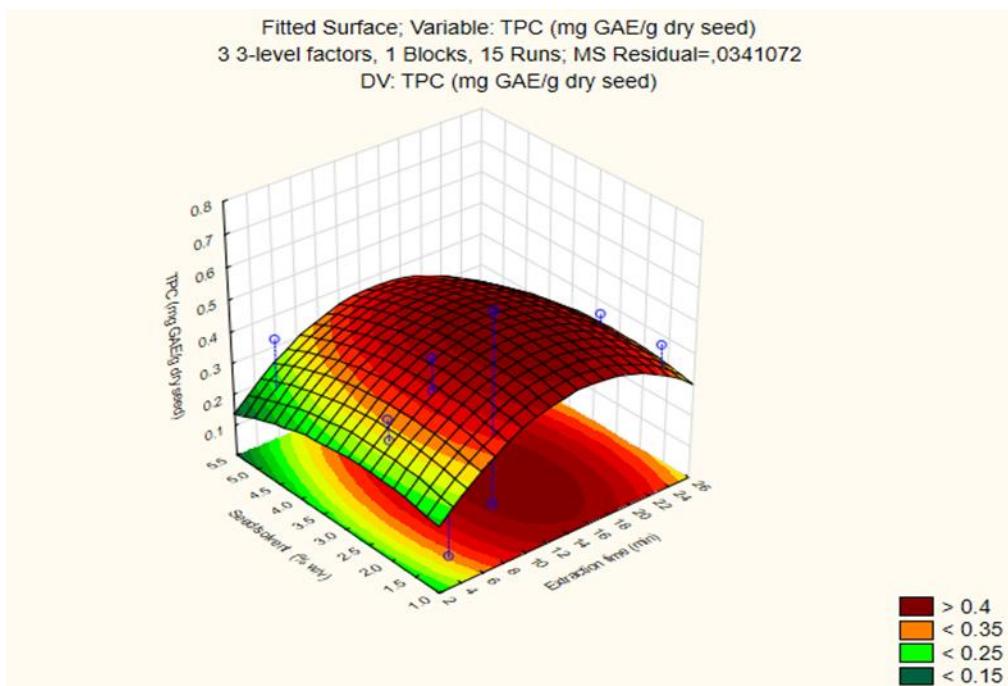
Ραβδόγραμμα 5. 1: Ραβδόγραμμα Pareto για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Σύμφωνα με τον πίνακα ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων ANOVA (Πίνακας 5.2) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 5.1) κανένας όρος της εξίσωσης δεν είναι σημαντικός και δεν έχει επίδραση στο αποτέλεσμα, αφού κανένας δεν ξεπερνά το επίπεδο εμπιστοσύνης $p=0,05$. Παρατηρείται πως ο συντελεστής παλινδρόμησης (R) είναι ίσος με 85,68% (κοντά στο 100%) και σε συνδυασμό με τον διορθωμένο συντελεστή παλινδρόμησης ($R_{Adj}=59,92\%$), ο οποίος δείχνει το ποσοστό των όρων των μεταβλητών της εκχύλισης που πραγματικά επηρεάζουν την απόδοση, δεν απέχουν μεταξύ τους πολύ πάνω από 20%. Αυτό αποδεικνύει την σχετικά ικανοποιητική επάρκεια του μοντέλου. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το παρόν πειραματικό μοντέλο είναι σχετικά ακριβές και αξιόπιστο.

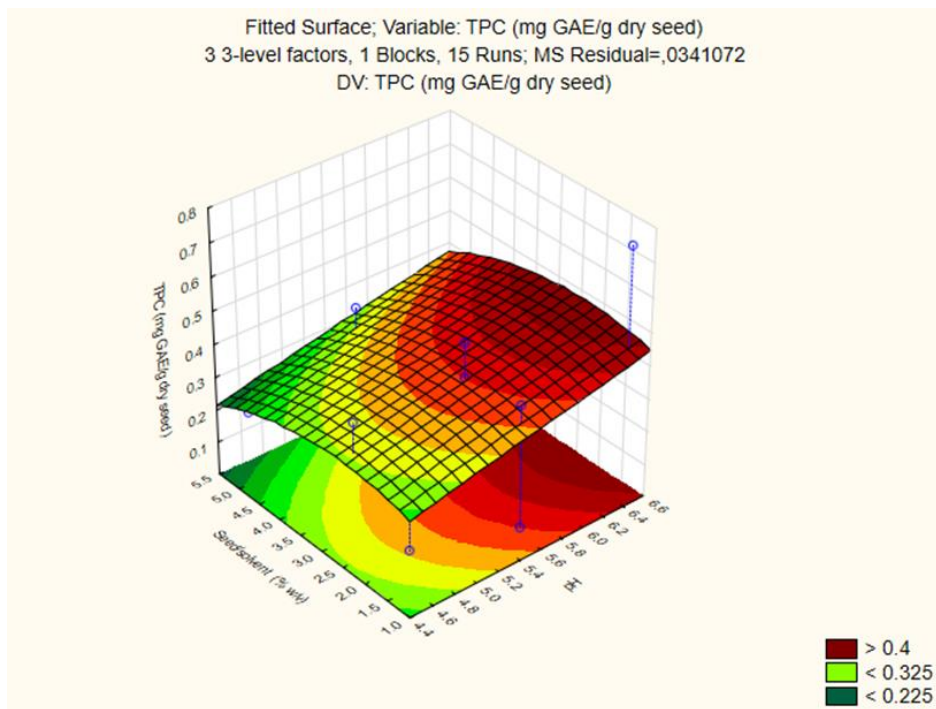
Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι διάφοροι συνδυασμοί παραγόντων εκχύλισης (χρόνος, αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της επίδρασής τους όσον αφορά τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.



Διάγραμμα 5. 1.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (pH και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου



Διάγραμμα 5. 2.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου



Διάγραμμα 5. 3.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Όσον αναφορά τα διαγράμματα αυτά, είναι γνωστό πως η περιοχή με το έντονο κόκκινο χρώμα αφορά τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, ενώ το αντίθετο ισχύει για τη περιοχή με το σκούρο πράσινο. Συγκεκριμένα, στο διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm*, όπου μελετάται ο χρόνος εκχύλισης με το pH (Διάγραμμα 5.1.) μέγιστα αποτελέσματα παρατηρούνται για pH περίπου 6,6 και χρόνο εκχύλισης 14 ώρες. Στο δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.2.) μελετάται η αναλογία σπόρων/ διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης. Σε αναλογία 3,5% w/v και χρόνο εκχύλισης περίπου 14 ώρες είναι οι ιδανικές συνθήκες εκχύλισης. Στο επόμενο διάγραμμα *rsm* (Διάγραμμα 5.3.) με την αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH παρατηρείται μέγιστο αποτέλεσμα σε pH περίπου 6,6 και αναλογία 3,5% w/v. Ως συμπέρασμα προκύπτει πως παρόλο που οι τρεις μελετούμενοι παράγοντες και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις δεν φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, χρειάζονται υψηλές τιμές pH μεγαλύτερες του 6, σχετικά μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης 16-18 ώρες και όχι υψηλές αναλογίες σπόρων/ διαλύτη μεταξύ 2,5-3,5 % για τη μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σπόρων πιπεριάς.

Πίνακας 5. 3: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικού περιεχομένου

ΠΡΟΤΕΙΝΟ- ΜΕΝΗ ΣΥΝΘΗΚΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (h)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΩΝ/ΔΙΑ ΛΥΤΗ (%w/v)	pH	Θεωρητική τιμή TPC (mg GAE/g dry seed)
	16	3	6,5	0,54

Με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα του Statistica (Πίνακας 5.3) και συγκρίνοντας με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν για το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Πίνακας 5.1) μπορούν να γίνουν τα εξής σχόλια:

- Ο χρόνος εκχύλισης του πειράματος 8 που φέρει και το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι πολύ λιγότερος, μόνο 4 ώρες, συγκριτικά με το βέλτιστο χρόνο εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα Statistica που είναι 16 ώρες.
- Η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v) διαφέρει επίσης αλλά αυτή την φορά η προτεινόμενη τιμή από το πρόγραμμα Statistica είναι μικρότερη, 3% w/v, από την αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα 8 που ήταν 5% w/v.
- Το pH των δυο αυτών συνθηκών επίσης διαφέρει κατά μια μονάδα καθώς στο πείραμα 8 χρησιμοποιήθηκε 5,5 ενώ το πρόγραμμα Statistica προτείνει Ph 6,5.
- Τέλος με βάση τις παραπάνω διαφοροποιήσεις στις συνθήκες των 2 πειραμάτων προκύπτουν και διαφορετικά ποσοστά ολικού φαινολικού περιεχομένου, στο πείραμα 8 που φέρει και το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι 0,495 (mg GAE/g dry seed) ενώ στις συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι 0,54 (mg GAE/g dry seed). Η διαφορά αυτή πιθανών να οφείλετε στον μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα αλλά και στο μεγαλύτερο pH συγκρίνοντας το με το pH του πειράματος 8. Παρόλα αυτά στην συγκεκριμένη περίπτωση φαίνεται να μην επηρεάζει το αποτέλεσμα η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v).

5.1. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων των σπόρων πιπεριάς *Jalapeño* ενάντια στους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.

Τα ποσοστά αναστολής στα εκχυλίσματα φαίνονται στο ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5.4.)

Πίνακας 5. 4.: Ποσοστά αναστολής μικροοργανισμών στα εκχυλίσματα πιπεριάς *Jalapeño*

ΣΕΙΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ % <i>ANASTOLH cereus</i>	B. % <i>ANASTOLH aureus</i>	S. % <i>ANASTOLH monocytogenes</i>
1	-55.4569	-23.5211	-18.03068644
2	-0.82551	-28.07194995	-14.23744531
3	9.000058	-39.95713854	5.694949412
4	-66.9027	-39.99787387	-18.30559611
5	-39.2484	-22.59019027	-25.59408822
6	-64.5857	-29.02225816	-34.03942045
7	-19.3606	-22.8905614	-13.48380717
8	-23.9585	4.451818061	-47.2125
9	-90.4279	-13.7171	-11.9964702
10	-67.0523	34.00805671	-35.68999981
11	9.393618	-37.52748585	-37.05839926
12	-70.39	19.44393192	-21.17663154
13	-104.369	-22.23353902	81.494291
14	-53.0056	-30.85726728	-18.14956412
15	-30.9038	-24.08649169	0.874099134

*Με κόκκινο επισημαίνονται τα μέγιστα ποσοστά αναστολής

5.1.1. *Bacillus cereus*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.4 προκύπτει ότι οι τιμές του ποσοστού αναστολής για τον μικροοργανισμό *B.cereus* είναι αρνητικές αφού το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση. Αντίθετος τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα δρουν βοηθητικά στην ανάπτυξη του *Bacillus cereus*. Υπάρχουν όμως δύο συνθήκες εκχύλισης (πείραμα 3 και 11 από τον πίνακα 5.4) που έχουν θετικό πρόσημο και πιθανόν να δρουν θετικά στην αναστολή του μικροοργανισμού, αν και το ποσοστό αναστολής που εμφανίζουν αυτά τα εκχυλίσματα είναι ιδιαίτερα μικρό. Οι συνθήκες των πειραμάτων αυτών είναι για το πείραμα 3 (8h, 2,5% αναλογία σπόρων/διαλύτη w/v, 5,5 pH) και για το πείραμα 11 (24h, 5% αναλογία σπόρων/διαλύτη, 5,5 pH).

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα του πίνακα 5.4 προέκυψαν από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Statistica τα ακόλουθα: εξίσωση για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης κατά του *B.cereus*, ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων, το ραβδόγραμμα Pareto, τα διαγράμματα επιφανειών απόκρισης, rsm, και ο πίνακας βέλτιστων

συνθηκών για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής των εκχυλισμάτων Jalapeño ενάντια του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

Παρακάτω παρατίθεται η εξίσωση από το Box-Behnken με τα δεδομένα του πίνακα ANOVA

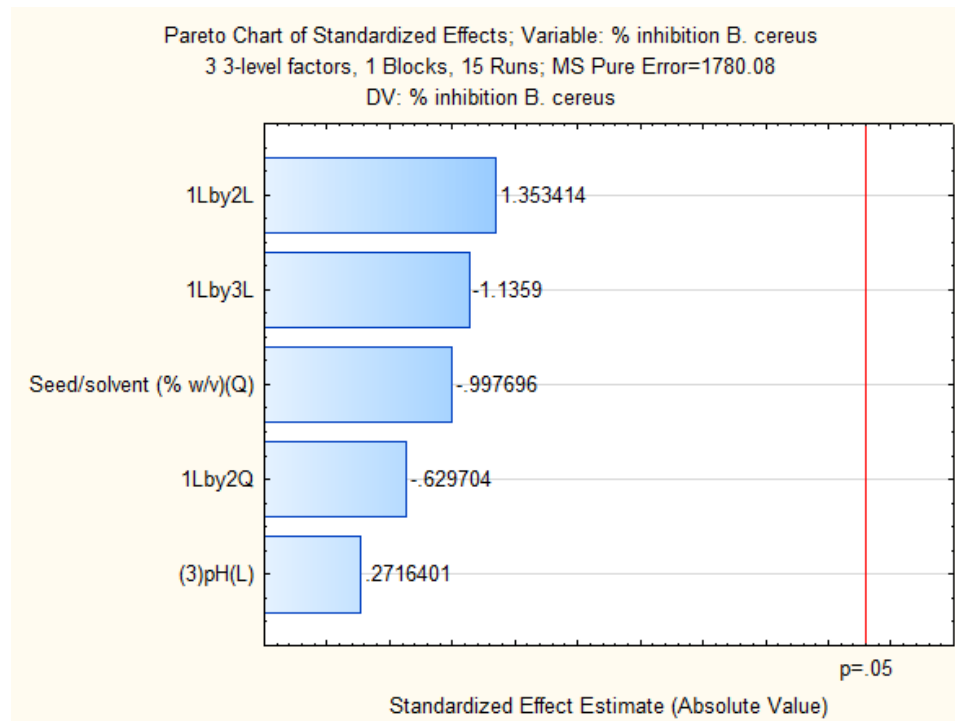
$$\% B. cereus = -107,7 - 2,2 x_2^2 + 18,7 x_3 - 0,32 x_1x_2 + 0,32 x_1x_2^2 - 0,7 x_1x_3$$

Πίνακας 5. 5: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής κατά του *B. cereus*

Effect Estimates; Var.:% inhibition B. cereus; R-sq=.55289; Adj. 30449 (3 factor Box-Behnken design, 1 block , 15 runs (No. 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Residual=840.118 DV: % inhibition B. cereus										
Factor	Effect	Std.Err.	t(9)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	-42.9106	7.75865	-5.53068	0.000365	-60.462	-25.3593	-42.9106	7.75865	-60.4619	-25.3593
Seed/solvent (% w/v)(Q)	-22.9224	15.78385	-1.45227	0.180380	-58.628	12.7831	-11.4612	7.89193	-29.3140	6.3916
(3)pH (L)	8.7002	22.00309	0.39541	0.701752	-41.074	58.4746	4.3501	11.00154	-20.5371	29.2373
1L by 2L	48.5012	24.61909	1.97006	0.080334	-7.191	104.1934	24.2506	12.30954	-3.5955	52.0967
1L by 2Q	-17.1507	18.71090	-0.91661	0.383250	-59.478	25.1763	-8.5753	9.35545	-29.7388	12.5882
1L by 3L	-44.1185	26.68266	-1.65345	0.132628	-104.479	16.2419	-22.0592	13.34133	-52.2394	8.1209

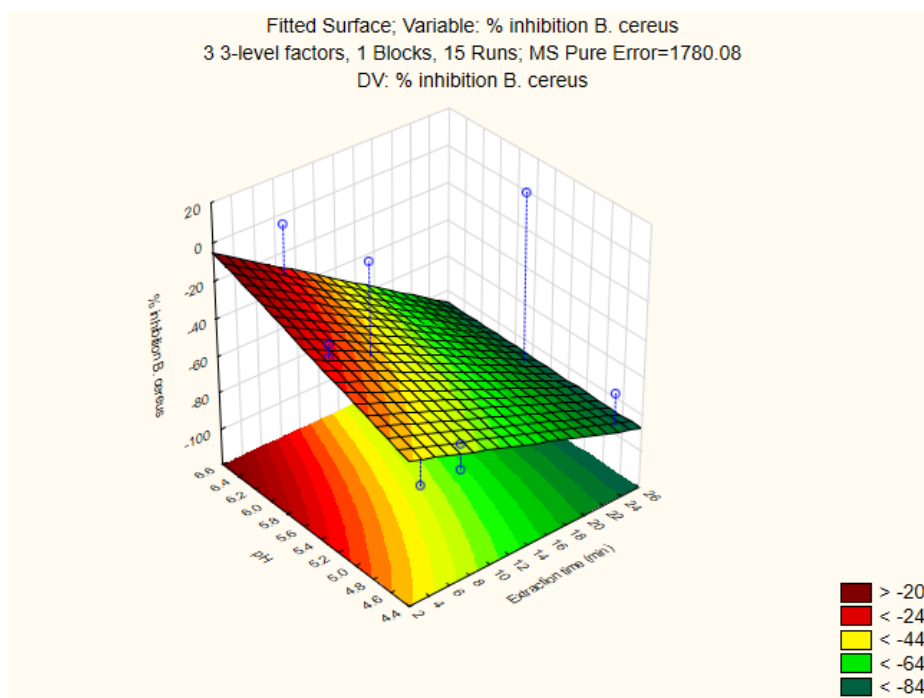
(L): Όρος γραμμικής μορφής, (Q): Όρος τετραγωνικής μορφής

Με κόκκινο επισημαίνονται οι παράγοντες με σημαντική επίδραση (p-value≤0,05).

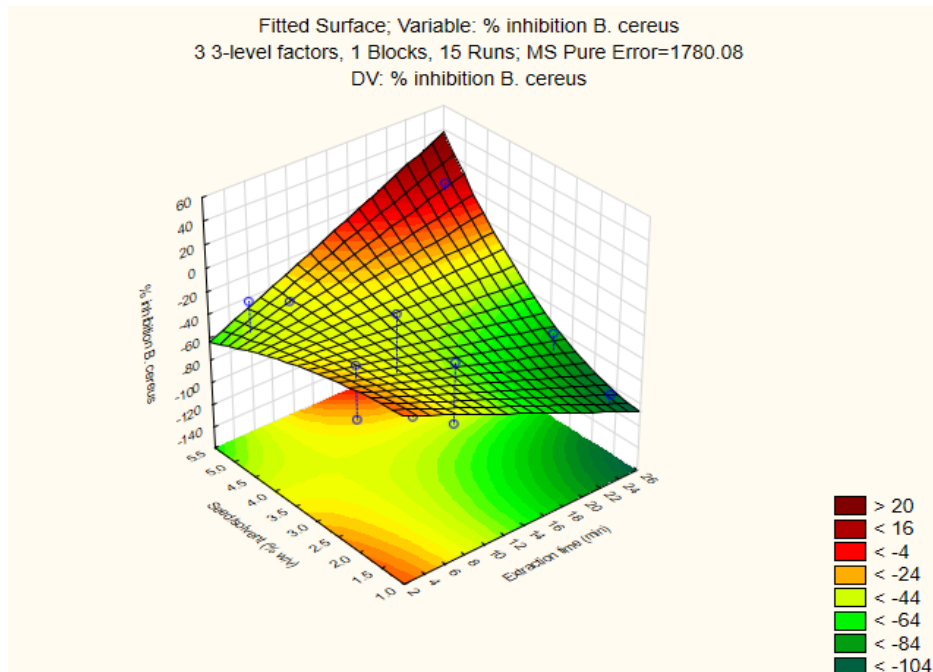


Ραβδόγραμμα 5. 2: Ραβδόγραμμα Pareto για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής έναντι του *B.cereus*

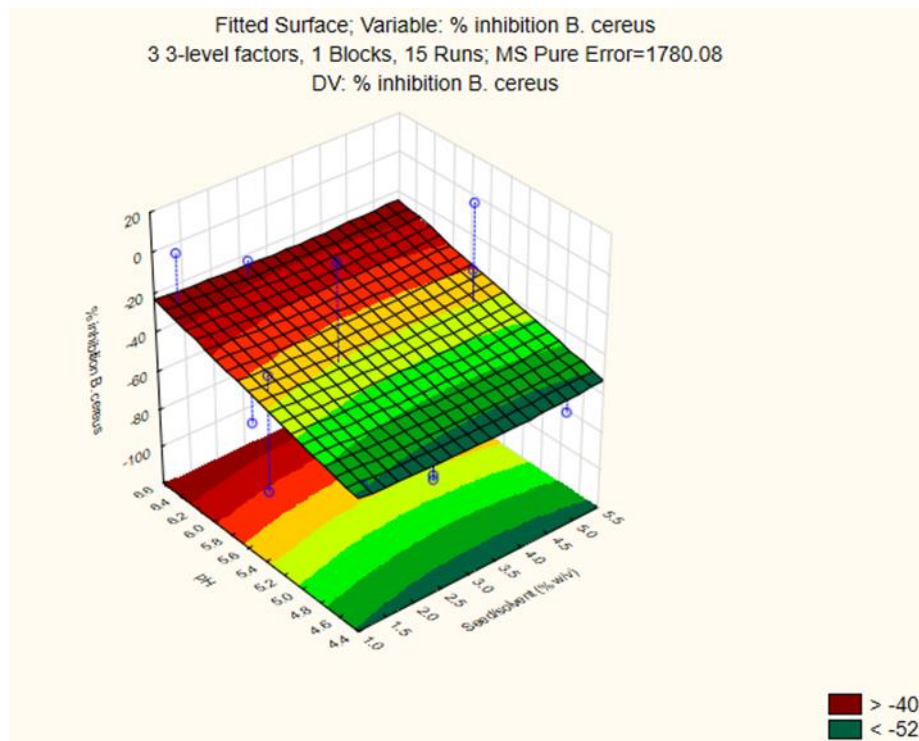
Σύμφωνα με τον παραπάνω ραβδόγραμμα 5.2 Pareto αποδεικνύεται πως το συγκεκριμένο μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο για την πρόβλεψη αναστολής του *B.cereus* από τα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς. Κανένας όρος από την εξίσωση Box-Behnken για τον μικροοργανισμό *B. cereus* δεν είναι σημαντικός και δεν επιδρά στο αποτέλεσμα αφού κανένας δεν ξεπερνά το επίπεδο εμπιστοσύνης ($p < 0,05$). Από τον πίνακα 5.4 προκύπτει ότι τα ποσοστά αναστολής για το βακτήριο *B.cereus* είναι αρνητικά στις περιπτώσεις και το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση. Επίσης ο συντελεστής παλινδρόμησης (R^2) είναι 55,28% και ο διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης (R^2_{adj}) = 30,44% (πίνακας 5.5), οπότε και επαληθεύεται η παραπάνω υπόθεση. Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα πιπεριών *Jalapeño* φαίνεται να δρουν ως παράγοντες ανάπτυξης παρά ως παράγοντες αναστολής του *B. cereus*. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση της αναστολής του συγκεκριμένου μικροοργανισμού προϋποθέτει την μελέτη επιπλέον παραγόντων εκχύλισης ή τη ρύθμιση των μελετούμενων παραμέτρων σε άλλα επίπεδα τιμών.



Διάγραμμα 5. 4.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (χρόνος εκχύλισης και pH) για την αναστολή του *B. cereus*



Διάγραμμα 5. 5.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του *B. Cereus*



Διάγραμμα 5. 6.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του *B. cereus*

Στα παραπάνω διαγράμματα Contour Plot (Διαγράμματα 5.4, 5.5 και 5.6) αναπαριστώνται οι επιδράσεις του συνδυασμού συνθηκών εκχύλισης ως προς την αναστολή του *B. Cereus*. Πρώτον, το διάγραμμα (Διάγραμμα 5.4) αφορά την επίδραση του συνδυασμού της αναλογίας χρόνου εκχύλισης και pH και η μέγιστη αναστολή του μικροοργανισμού απεικονίζεται στο σκούρο κόκκινο, δηλαδή για υψηλότερες τιμές pH άνω του 6 και μικρό χρόνο εκχύλισης, λιγότερο των 2 ωρών. Στο δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.5) απεικονίζεται ο συνδυασμός αναλογίας σπόρων/διαλύτη και του χρόνου εκχύλισης με μέγιστο ποσοστό αναστολής σε δύο περιπτώσεις. Η μία είναι για μικρό χρόνο εκχύλισης κάτω από 2 ώρες και χαμηλή αναλογία σπόρων/διαλύτη μικρότερη από 2,5%w/v και η άλλη για μεγάλο χρόνο εκχύλισης δεκατεσσάρων ωρών και πάνω και μεγάλη αναλογία σπόρων/διαλύτη μεγαλύτερη από 5,0% w/v. Άρα οι δύο αυτοί παράγοντες είναι ανάλογοι μεταξύ τους ως προς την επίδρασή τους στην αναστολή του *B.cereus*. Το τρίτο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.6) αφορά το συνδυασμό αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH, στο οποίο παρατηρείται πως δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σημαντικά και η αναστολή του μικροοργανισμού δεν επηρεάζεται καθόλου από την αναλογία σπόρων/ διαλύτη παρά μόνο από το pH, βάση του χρωματικού κώδικα. Δηλαδή, η αναστολή φαίνεται να αυξάνεται μόνο σε υψηλές τιμές pH και συγκεκριμένα πάνω από 6,5. Όμως να σημειωθεί πως με βάση τον πίνακα 5.4 όπου οι περισσότερες περιπτώσεις του ποσοστού αναστολής είναι αρνητικές γίνεται κατανοητό πως το μοντέλο δεν είναι αποτελεσματικό ώστε να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της αναστολής του *B.cereus* από εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς. Επίσης σε τιμές pH μεγαλύτερες του 4,9 γνωστό είναι πως ευνοείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και όχι η αναστολή, οπότε το μοντέλο δεν προτείνει αξιόπιστες τιμές.

Πίνακας 5. 6: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του *B.cereus*

ΠΡΟΤΕΙΝΟ ΜΕΝΗ ΣΥΝΘΗΚΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (h)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΩΝ/ ΔΙΑΛΥΤΗ (%w/v)	pH	% ΑΝΑΣΤΟΛ Η <i>B.CEREUS</i>
37,271	26	5.5	6.5	37,27

Με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα του Statistica (Πίνακας 5.6) και συγκρίνοντας με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν για το ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού *B.cereus* (Πίνακας 5.4) μπορούν να γίνουν τα εξής σχόλια:

- Ο χρόνος εκχύλισης του πειράματος 11 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού είναι 24 ώρες, ενώ ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι 26 ώρες.
- Η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v) διαφέρει ελάχιστα αφού η προτεινόμενη τιμή από το πρόγραμμα Statistica είναι 5,5 % w/v, και η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα 11 ήταν 5% w/v.
- Το pH των δυο αυτών συνθηκών επίσης διαφέρει κατά μια μονάδα καθώς στο πείραμα 11 χρησιμοποιήθηκε pH 5,5 ενώ το πρόγραμμα Statistica προτείνει PH 6,5.
- Τέλος με βάση τις παραπάνω διαφοροποιήσεις στις συνθήκες των 2 πειραμάτων προκύπτουν και διαφορετικά ποσοστά αναστολής του μικροοργανισμού, στο πείραμα 11 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής είναι 9,39% ενώ στις συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι 37,27%. Η μεγάλη αυτή διαφορά πιθανόν να οφείλετε στον μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα αλλά και στο μεγαλύτερο pH συγκρίνοντας το με το PH του πειράματος 11. Παρόλα αυτά και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να μην επηρεάζει το αποτέλεσμα η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v).

5.1.2. Staphylococcus aureus

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.4, προκύπτει ότι τα ποσοστά αναστολής για το βακτήριο *S.aureus* είναι αρνητικά, εκτός από 3, αφού το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση του μικροοργανισμού από τα εκχυλίσματα Jalapeño. Οι συνθήκες εκχύλισης (πείραμα 8, 10, 12 του Πίνακα 5.4) πιθανώς δρουν θετικά στην αναστολή του μικροοργανισμού καθώς έχουν θετικό πρόσημο στο ποσοστό αναστολής. Τα πειράματα αυτά έγιναν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες για το πείραμα 8 (4h, 5% αναλογία σπόρων/διαλύτη, 5,5 pH), για το πείραμα 10 (24h 2,5% αναλογία σπόρων/διαλύτη, 4,5 pH) και για το πείραμα 12 (8h, 2,5% αναλογία σπόρων/διαλύτη, 5,5 pH).

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα του πίνακα 5.4 προέκυψαν από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Statistica τα ακόλουθα: εξίσωση για τον προσδιορισμό της ανιμιεροβιακής δράσης κατά του *S. Aureus*, ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων, το ραβδόγραμμα Pareto, και ο πίνακας βέλτιστων συνθηκών για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής ενάντια του συγκεκριμένου μικροβίου.

Η παρακάτω εξίσωση προέκυψε από το μοντέλο Box-Behnken:

$$\%S. aureus = -42,5 + 0,87 x_2^2 + 1,97 x_3 + 3,2 x_1x_2 - 0,6 x_1x_2^2 - 0,52 x_1x_3$$

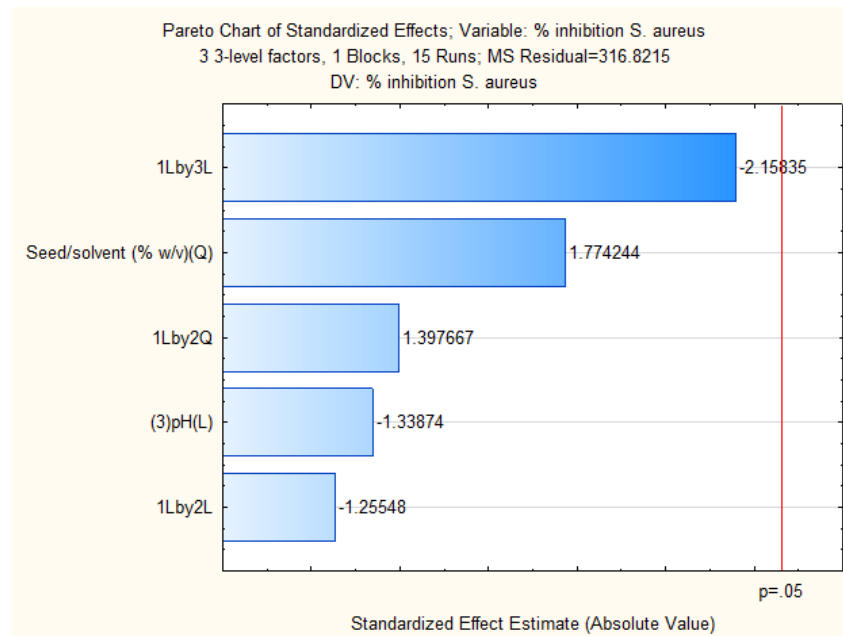
Πίνακας 5. 7: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του *S.aureus*

Effect Estimates; Var.:% inhibition *S. aureus*; R-sqr=.56082; Adj.:.31682 (3 factor Box-Behnken design, 1 block , 15 runs ([No active dataset]) in Jalaper
3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Residual=316.8215
DV: % inhibition *S. aureus*

Factor	Effect	Std.Err.	t(9)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	-19.9231	4.76457	-4.18150	0.002371	-30.7013	-9.14486	-19.9231	4.764568	-30.7013	-9.14486
Seed/solvent (% w/v)(Q)	17.1974	9.69282	1.77424	0.109769	-4.7293	39.12411	8.5987	4.846411	-2.3646	19.56206
(3)pH (L)	-18.0891	13.51203	-1.33874	0.213487	-48.6554	12.47729	-9.0445	6.756017	-24.3277	6.23865
1L by 2L	-18.9809	15.11851	-1.25548	0.240922	-53.1814	15.21952	-9.4905	7.559257	-26.5907	7.60976
1L by 2Q	16.0596	11.49031	1.39767	0.195706	-9.9333	42.05253	8.0298	5.745157	-4.9666	21.02627
1L by 3L	-35.3662	16.38575	-2.15835	0.059226	-72.4333	1.70095	-17.6831	8.192875	-36.2167	0.85048

(L): Όρος γραμμικής μορφής, (Q): Όρος τετραγωνικής μορφής

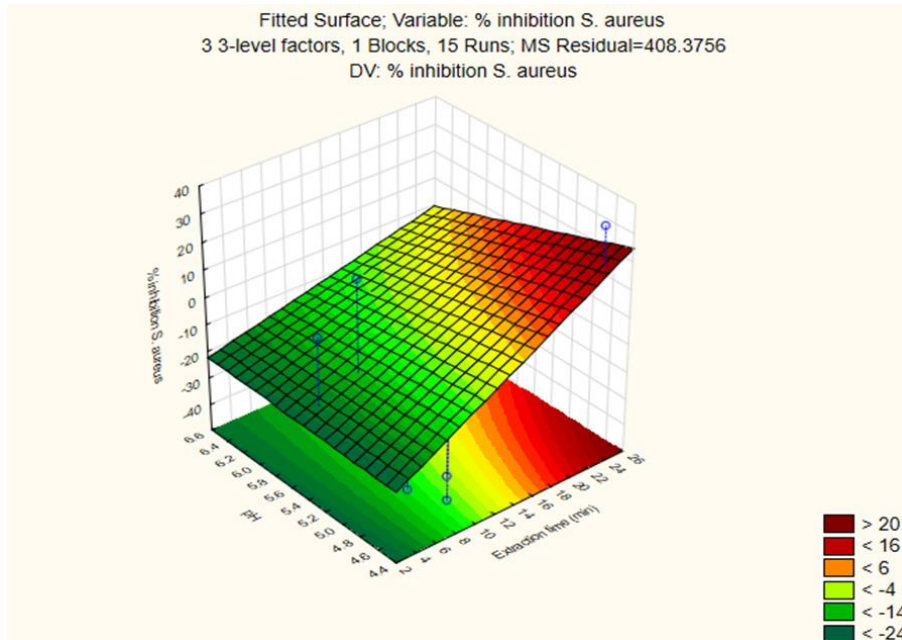
Με κόκκινο επισημαίνονται οι παράγοντες με σημαντική επίδραση ($p\text{-value} \leq 0,05$).



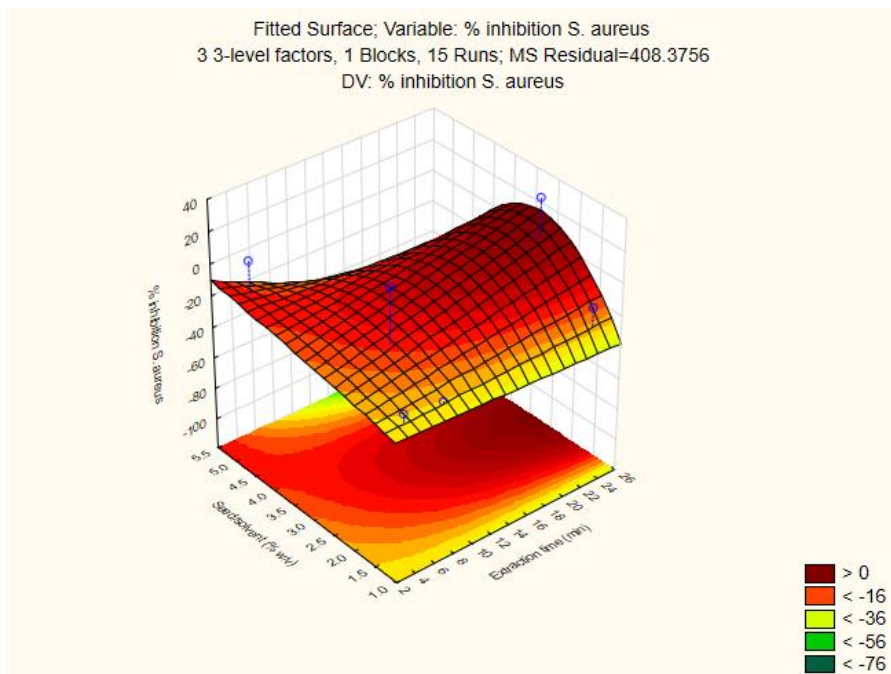
Ραβδόγραμμα 5. 3: Ραβδόγραμμα Pareto για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του *S. Aureus*

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα διακύμανσης παραγόντων (Πίνακας 5.7) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 5. 4) συμπεραίνουμε ότι κανένας όρος δεν ξεπερνά τον επίπεδο εμπιστοσύνης που έχει δοθεί $p < 0,05$. Ο συνδυασμός των παραγόντων χρόνου εκχύλισης και pH φαίνεται να είναι πιο επιδραστικός, συγκριτικά με τους υπόλοιπους παράγοντες. Συμπληρωματικά, από τον πίνακα 5.7 ANOVA ο συντελεστής παλινδρόμησης R^2 είναι μόλις 56,08 % και ο διορθωμένος συντελεστής παλινδρόμησης (R^2_{ad}) είναι 31,68%.

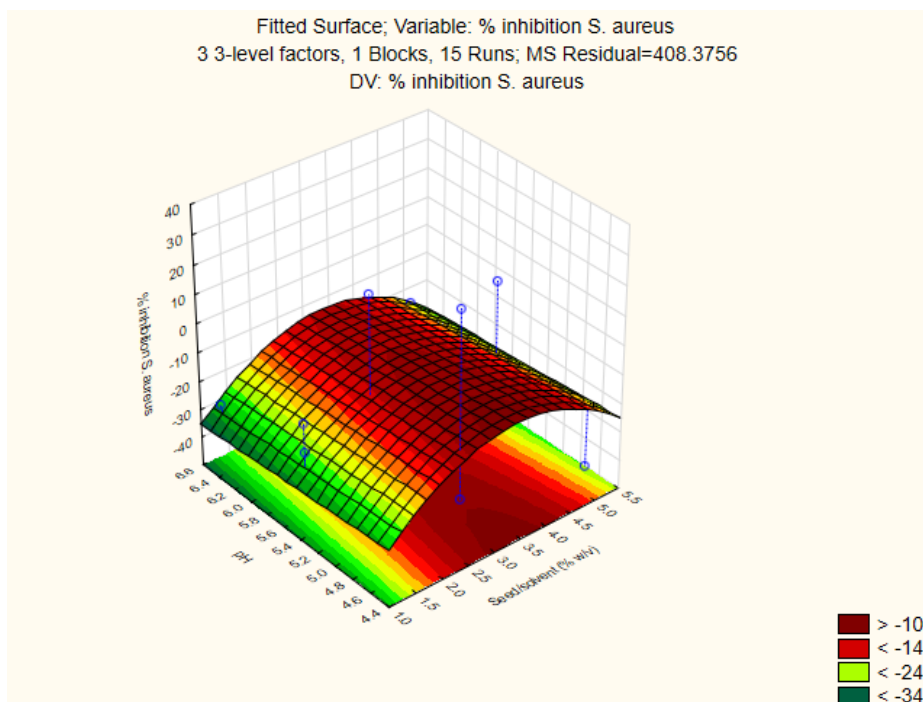
Επομένως κανένας όρος δεν είναι σημαντικός και δεν επιδρά στο αποτέλεσμα. Συνεπώς χρειάζεται νέα προσαρμογή των παραμέτρων εκχύλισης ή μελέτη των εκχυλισμάτων σπόρων *Jalapeño*, ως παράγοντες ανάπτυξης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.



Διάγραμμα 5. 7.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (pH και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του *S. aureus*



Διάγραμμα 5. 8.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του *S. aureus*



Διάγραμμα 5. 9.: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του *S. aureus*

Στα παραπάνω διαγράμματα Contour Plot (Διαγράμματα 5.7, 5.8 και 5.9) αναπαριστώνται οι επιδράσεις του συνδιασμού συνθηκών ως προς την αναστολή του *S. Aureus*. Στο πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.7) αναπαρίσταται η συνδυαστική επίδραση του pH και χρόνου εκχύλισης στο ποσοστό αναστολής του *S. Aureus*, όπου με βάση το σκούρο κόκκινο χρώμα είναι μέγιστη για μικρές τιμές pH και μεγάλο χρόνο. Η ιδανική περιοχή για μέγιστα ποσοστά αναστολής είναι σε τιμές pH μικρότερες του 4,5 και αντίστοιχα χρόνου μεγαλύτερου από 20 ώρες. Έτσι, σύμφωνα με το γράφημα αυτό, ένας πιθανός συνδυασμός συνθηκών που θα μπορούσε να αποφέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι pH 4 και χρόνος εκχύλισης 26 ώρες. Τέτοια τιμή pH συνάδει ως προς την αναστολή του μικροοργανισμού, αφού η ανάπτυξη του ευνοείται σε μεγαλύτερες τιμές από αυτή. Όσον αφορά το δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.8), αυτό απεικονίζει την επίδραση αναλογίας σπόρων/ διαλύτη και χρόνου εκχύλισης. Η πιο σκούρα κόκκινη περιοχή του συγκεκριμένου διαγράμματος επιφανειών απόκρισης, *rsm*, εντοπίζεται για μεγάλους χρόνους εκχύλισης άνω των 18 ωρών και για τιμές αναλογίας σπόρων/ διαλύτη μεταξύ 2,5 – 4% w/v. Το τρίτο και τελευταίο διάγραμμα Contour Plot (Διαγράμμα 5.9) αφορά την συνδυαστική επίδραση αναλογίας σπόρων/ διαλύτη και pH, στο οποίο τα όρια των ιδανικών συνθηκών για μέγιστη αναστολή είναι σε σχετικά χαμηλές τιμές pH, μικρότερες του 5, και τιμές αναλογίας σπόρων/ διαλύτη σε εύρος μεταξύ 2,5 – 4% w/v. Όμως να σημειωθεί και σε αυτή την περίπτωση πως με βάση τον πίνακα 5.4 όπου οι περισσότερες περιπτώσεις του ποσοστού αναστολής είναι αρνητικές είναι φανερό πως το μοντέλο δεν είναι ικανοποιητικό γιατί δεν εμφανίζεται αναστολή σε όλες τις περιπτώσεις. Παρά ταύτα ο συνδυασμός επίδρασης της αναλογίας σπόρων/ διαλύτη και χρόνου εκχύλισης φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός για να εμφανιστεί αναστολή του *S. Aureus*, βάση των διαγραμμάτων που αναλύθηκαν.

Πίνακας 5. 8: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του *S. aureus*

ΠΡΟΤΕΙΝΟ ΜΕΝΗ ΣΥΝΘΗΚΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (h)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΩΝ/ΔΙ ΑΛΥΤΗ (%w/v)	pH	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ <i>S.aureus</i>
26,250	26	3	4,5	26,25

Με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα του Statistica (Πίνακας 5.8) και συγκρίνοντας με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν για το ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού *S.aureus* (Πίνακας 5.4) μπορούν να γίνουν τα εξής σχόλια:

- Ο χρόνος εκχύλισης του πειράματος 10 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού είναι 24 ώρες, ενώ ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι 26 ώρες.
- Η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v) διαφέρει ελάχιστα αφού η προτεινόμενη τιμή από το πρόγραμμα Statistica είναι 3 % w/v, και η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα 10 ήταν 2,5% w/v.
- Το pH των δυο αυτών διαφορετικών πειραμάτων είναι ίδιο, 4,5.
- Τέλος με βάση τις παραπάνω διαφοροποιήσεις στις συνθήκες των 2 πειραμάτων προκύπτουν και διαφορετικά ποσοστά αναστολής του μικροοργανισμού, στο πείραμα 10 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής είναι 34% ενώ στις συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι αρκετά μικρότερο, 26,25%.

5.1.3. *Listeria monocytogenes*

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.4 προκύπτει ότι τα ποσοστά αναστολής για το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι αρνητικά, εκτός από 3, αφού το αρνητικό πρόσημο δείχνει ότι δεν υπάρχει ανασταλτική δράση στις περισσότερες συνθήκες εκχύλισης. Οι συνθήκες εκχύλισης αυτών των πειραμάτων (πείραμα 3, 13, 15 του Πίνακα 5.4) δρουν θετικά στην αναστολή του μικροοργανισμού καθώς έχουν θετικό πρόσημο στο ποσοστό αναστολής. Τα πειράματα αυτά έγιναν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες για το πείραμα 3 (8h, 2,5% αναλογία σπόρων διαλύτη, 5,5 pH), για το πείραμα 13 (24h, 2,5% αναλογία σπόρων διαλύτη, 6,5 pH) και για το πείραμα 15 (4h, 1,25% αναλογία σπόρων διαλύτη, 5,5 pH). Το πείραμα 13 εμφανίζει μεγάλο ποσοστό ανασταλτικής δράσης 81,5%, το οποίο και είναι εξαιρετικά σημαντικό. Οπότε η αναστολή του μικροοργανισμού αυτού επηρεάζεται έντονα από τους διαφορετικούς παράγοντες και τη διαφοροποίηση του συνδιασμού τους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα προέκυψαν από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Statistica τα ακόλουθα: η εξίσωση για τον προσδιορισμό της ανιμιεροβιακής δράσης κατά του *L.monocytogenes*, ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων, το ραβδόγραμμα Pareto, τα διαγράμματα δύο διαστάσεων (Contour Plot) και ο πίνακας βέλτιστων συνθηκών για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του συγκεκριμένου μικροβίου.

Η παρακάτω εξίσωση προέκυψε από το μοντέλο Box-Behnken:

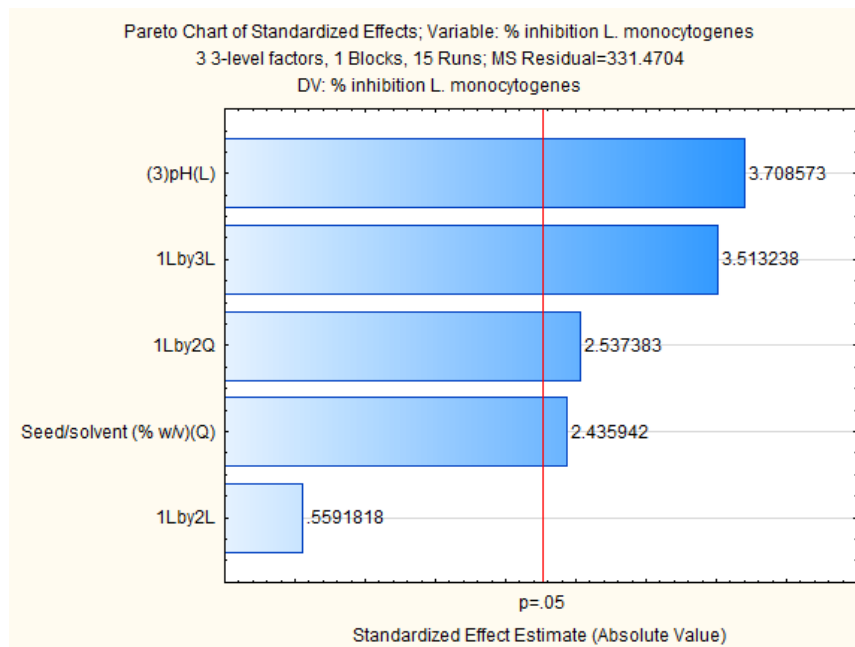
$$\% L. monocytogenes = -105,2 - 0,26 x_2^2 + 14,5 x_3 + 0,65 x_1x_2 - 0,17 x_1x_2^2 + 0,2 x_1x_3$$

Πίνακας 5. 9: Ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του *L. monocytogenes*

Factor	Effect	Std.Err.	t(9)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	-16.3919	4.87347	-3.36349	0.008343	-27.4165	-5.36733	-16.3919	4.873474	-27.4165	-5.36733
Seed/solvent (% w/v)(Q)	24.1508	9.91437	2.43594	0.037614	1.7230	46.57871	12.0754	4.957187	0.8615	23.28936
(3)pH (L)	51.2558	13.82088	3.70857	0.004856	19.9907	82.52077	25.6279	6.910442	9.9954	41.26039
1L by 2L	8.6472	15.46408	0.55918	0.589679	-26.3350	43.62942	4.3236	7.732042	-13.1675	21.81471
1L by 2Q	29.8217	11.75295	2.53738	0.031847	3.2347	56.40877	14.9109	5.876476	1.6174	28.20438
1L by 3L	58.8829	16.76028	3.51324	0.006585	20.9685	96.79726	29.4414	8.380142	10.4842	48.39863

(L): Όρος γραμμικής μορφής, (Q): Όρος τετραγωνικής μορφής

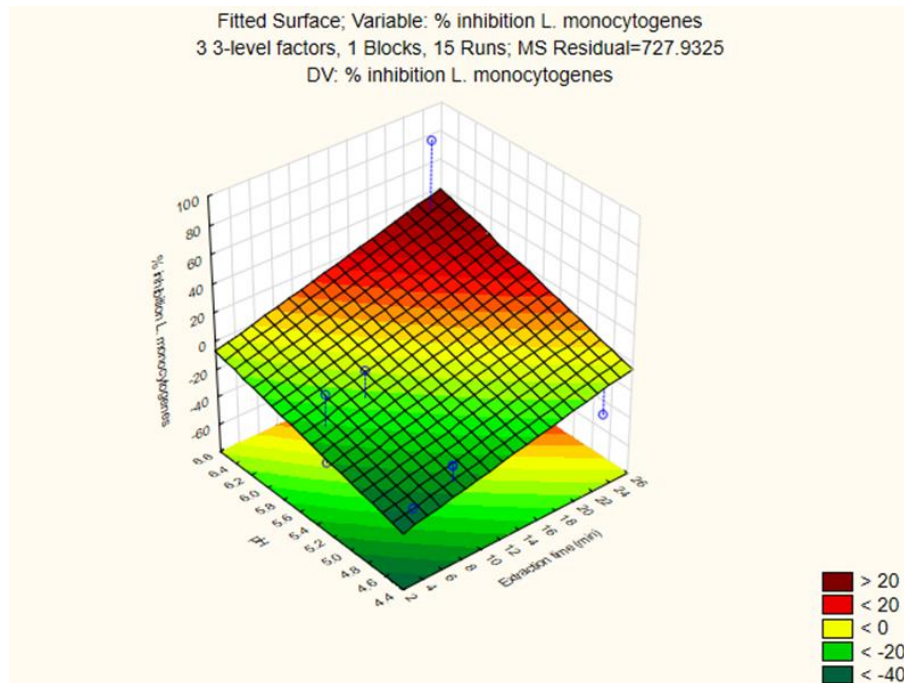
Με κόκκινο επισημαίνονται οι παράγοντες με σημαντική επίδραση ($p\text{-value} \leq 0,05$).



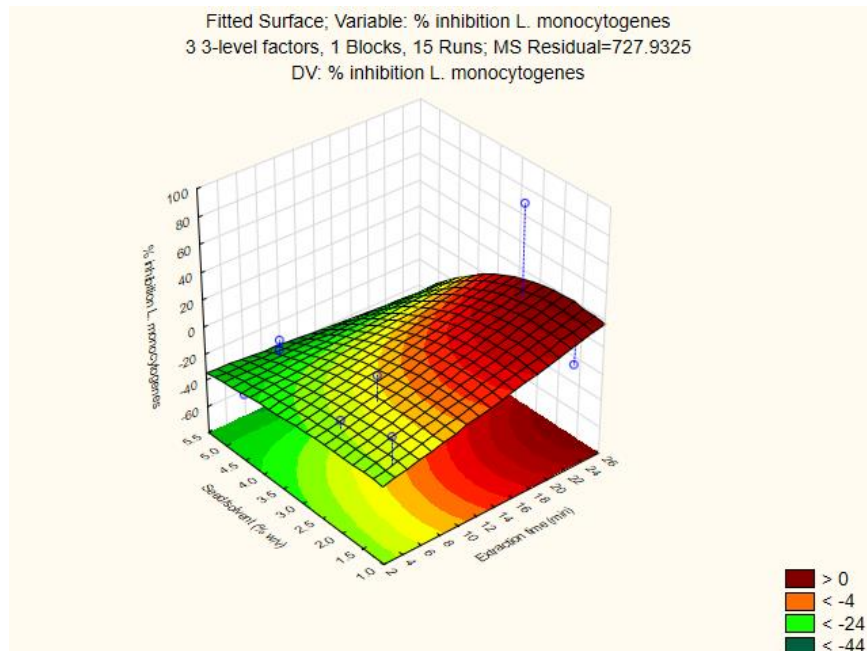
Ραβδόγραμμα 5. 5: Ραβδόγραμμα Pareto για την εύρεση του ποσοστού αναστολής κατά του *L. monocytogenes*

Σύμφωνα με το πίνακα 5.9 ANOVA και το ραβδόγραμμα Pareto 5.4 συνοψίζονται ότι οι κυριότεροι παράμετροι για τον προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής κατά της *L. monocytogenes* είναι: α) ο γραμμικός όρος του pH β) η αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου και του pH, γ) η αλληλεπίδραση του χρόνου με το τετράγωνο της αναλογίας του σπόρου του διαλύτη w/v, δ) το τετράγωνο της αναλογίας σπόρου/διαλύτη. Επιπλέον, από τις τιμές του στατιστικού ελέγχου ($R^2 = 76,09\%$ και $R^2_{adj} = 62,80\%$) είναι φανερό πως το εν λόγω μοντέλο είναι αρκετά ικανοποιητικό, αφού ο συντελεστής παλινδρόμησης R^2 δεν απέχει πολύ από το

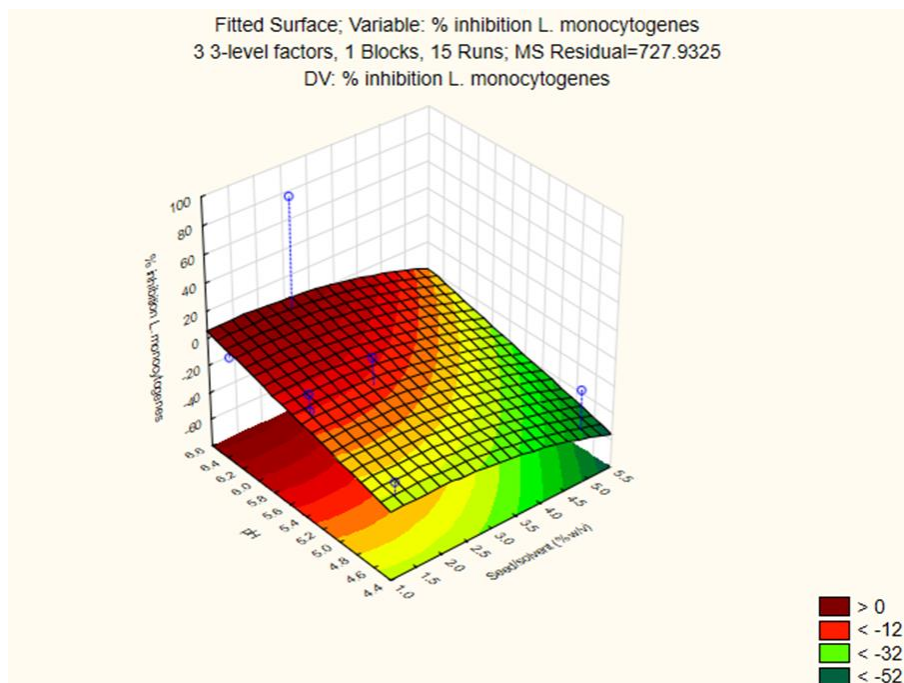
100% και η διαφορά του από τον διορθωμένο συντελεστή παλινδρόμησης R^2_{adj} είναι μικρότερη από 20% μονάδες.



Διάγραμμα 5. 10: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (pH και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του *L. monocytogenes*



Διάγραμμα 5. 11: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) για την αναστολή του *L. monocytogenes*



Διάγραμμα 5. 12: Διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm* (αναλογία σπόρων/ διαλύτη και pH) για την αναστολή του *L. monocytogenes*

Στα παραπάνω διαγράμματα επιφανειών απόκρισης, *rsm*, (Διαγράμματα 5.10, 5.11 και 5.12) αναπαριστώνται οι επιδράσεις του συνδυασμού συνθηκών ως προς την αναστολή του *L. monocytogenes*. Στο πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.10) αναπαρίσταται η συνδυαστική επίδραση του pH και χρόνου εκχύλισης στο ποσοστό αναστολής του *L. monocytogenes*, όπου με βάση το σκούρο κόκκινο χρώμα είναι μέγιστη για μεγάλες τιμές pH και μεγάλο χρόνο. Η ιδανική περιοχή για μέγιστα ποσοστά είναι σε pH μεγαλύτερα του 6,5 και χρόνους εκχύλισης μεγαλύτερους των 26 ωρών. Ένας πιθανός συνδιασμός με υψηλή αναστολή της *L. monocytogenes* θα μπορούσε να είναι 30 ώρες με pH 7 με βάση το μοντέλο. Όμως είναι γνωστό πως σε τιμές pH άνω του 4 ευνοείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού, άρα το μοντέλο δεν επαληθεύεται ως προς το pH, αλλά λειτουργεί κατασταλτικά ο συνδυασμός χρόνου εκχύλισης με pH. Όσον αφορά το δεύτερο διάγραμμα (Διάγραμμα 5.11), αυτό απεικονίζει την επίδραση αναλογίας σπόρων/ διαλύτη και χρόνου εκχύλισης. Η πιο σκούρα κόκκινη περιοχή του συγκεκριμένου διαγράμματος επιφανειών απόκρισης, *rsm*, εντοπίζεται για μεγάλους χρόνους εκχύλισης άνω των 18 ωρών και για χαμηλές τιμές αναλογίας σπόρων/ διαλύτη μικρότερες από 2% w/v. Το τρίτο και τελευταίο διάγραμμα επιφανειών απόκρισης, *rsm*, (Διάγραμμα 5.12) αφορά την συνδυαστική επίδραση αναλογίας σπόρων/ διαλύτη και pH, στο οποίο τα όρια των ιδανικών συνθηκών για μέγιστη αναστολή είναι σε υψηλές τιμές pH μεγαλύτερες του 6,5 και τιμές αναλογίας σπόρων/ διαλύτη μικρότερες του 2% w/v. Από τα διαγράμματα (Διαγράμματα 5.10, 5.11 και 5.12) που σχολιάσαμε συμπεραίνουμε το γεγονός ότι οι παράγοντες του pH και του χρόνου εκχύλισης ήταν πιο καθοριστικοί. Παράλληλα να σημειωθεί και σε αυτή την περίπτωση πως με βάση τον πίνακα 5.4 όπου οι περισσότερες περιπτώσεις του ποσοστού αναστολής είναι αρνητικές κατανοούμε πως το μοντέλο δεν είναι ικανοποιητικό γιατί δεν εμφανίζεται αναστολή σε όλες τις περιπτώσεις, ωστόσο έχουμε καλύτερα αποτελέσματα αναστολής του μικροοργανισμού αυτού (μεγαλύτερη αναστολή μικροοργανισμού 80%) συγκριτικά με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις μικροοργανισμών. Έτσι οι παράμετροι εκχύλισης και ο συνδιασμός τους δρούν πιο αποτελεσματικά και αποδοτικά στην αναστολή της *L. monocytogenes*.

Πίνακας 5. 10: Πιθανές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ποσοστού αναστολής κατά του *L. monocytogenes*

ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΣΥΝΘΗΚΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (h)	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΩΝ/ΔΙΑΛΥΤΗ (%w/v)	pH	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ <i>L.monocytogenes</i>
	26	2	6,5	39,2%

Με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα του Statistica (Πίνακας 5.10) και συγκρίνοντας με τις πειραματικές τιμές που προέκυψαν για το ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* (Πίνακας 5.4) μπορούν να γίνουν τα εξής σχόλια:

- Ο χρόνος εκχύλισης του πειράματος 13 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής του μικροοργανισμού είναι 24 ώρες, ενώ ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι μεγαλύτερος 26 ώρες.
- Η αναλογία σπόρων/ διαλύτη (%w/v) διαφέρει ελάχιστα αφού η προτεινόμενη τιμή από το πρόγραμμα Statistica είναι 2 % w/v, και η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα 13 ήταν 2,5% w/v.
- Το pH των δυο αυτών πειραμάτων είναι ίδιο, 6,5.
- Τέλος με βάση τις παραπάνω διαφοροποιήσεις στις συνθήκες των 2 πειραμάτων προκύπτουν και διαφορετικά ποσοστά αναστολής του μικροοργανισμού, στο πείραμα 13 που φέρει και το μέγιστο ποσοστό αναστολής είναι 81,49% ενώ στις συνθήκες που προτείνει το πρόγραμμα Statistica είναι 39,2%. Παρόλο που οι συνθήκες εκχύλισης είναι παρόμοιες παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην θεωρητική τιμή με αυτή που προβλέπεται από το πρόγραμμα Statistica, αυτό ίσως οφείλεται στο ότι στο μοντέλο το R^2 δεν είναι κοντά στο 0,9 άρα και η πρόβλεψη του είναι λιγότερο αξιόπιστη.

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

Τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου που παραλήφθηκαν από τα εκχυλίσματα σπόρων της πιπεριάς *Capsicum annum* (*Jalapeño*) ήταν αρκετά ικανοποιητικά. Στο πείραμα 8 με βάση τον πίνακα 5.1 σε συνθήκες χρόνου εκχύλισης 4 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 5% w/v και pH 5,5 παρατηρείται η μέγιστη απόδοση φαινολικών ενώσεων, η οποία ήταν 0,495 mg GAE/g seed.

Ο χρόνος εκχύλισης ως παράμετρος που επηρεάζει την απόδοση των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται κυρίως από την κατηγορία της χρησιμοποιούμενης τεχνικής (συμβατική ή μη συμβατική). Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τις συμβατικές τεχνικές, οι μη συμβατικές απαιτούν πολύ σύντομους χρόνους εξαγωγής περίπου 60 λεπτών λόγω της χρήσης ενέργειας όπως μικροκύματα και υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες επιταχύνουν τη διαδικασία. Σε αυτή τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στερεού-υγρού που ανήκει στη συμβατική τεχνική (Sik et al. 2020) επομένως, δικαιολογείται η απαίτηση μεγάλου χρόνου εκχύλισης για την επίτευξη του μέγιστου δυνατού φαινολικού περιεχομένου. Το ίδιο πόρισμα προκύπτει και από ακόμη μια 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).

Επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε είναι η επίδραση της αναλογίας διαλύτη/δείγματος. Αυτή έχει διερευνηθεί από τους Pinelo et al. (2005a) και από άλλους συγγραφείς για διαφορετικά υποστρώματα (Herodež et al., 2003, Cacace and Mazza, 2003): όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία, τόσο μεγαλύτερη είναι η συνολική ποσότητα εκχυλιζόμενων ενώσεων που λαμβάνεται, παρά τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, σύμφωνα με τις αρχές μεταφοράς μάζας. Σε αυτή την περίπτωση η αύξηση παρατηρείται σε συγκεκριμένο εύρος μεταξύ 2,5 – 4,5% w/v (Διαγράμματα 5.2 και 5.3). Σε έρευνες των Tri Nhut Pham et al. και Cai-Ning Zhao et al. διαπιστώθηκε πως η αύξηση της αναλογίας στερεού-διαλύτη αυξάνει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων (σπόροι και διαλύτης) (Pham et al. 2020; C.-N. Zhao et al. 2018).

Τέλος, το pH φαίνεται να μην είναι καθοριστικός παράγοντας για τα φαινολικά, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα ANOVA (Πίνακας 5.2). 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) επαληθεύει αυτή την διαπίστωση. Επακριβώς, 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). Το τσίπουρο αποτελείται από 40% αιθανόλη ποσοστό σημαντικό που μεγιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης και έχει υψηλή διαλυτική ικανότητα για πολλές χημικές ενώσεις, όπως αλδεΐδες, αιθέρες και αμίνες. Έτσι και αποδείχθηκε καλός διαλύτης το τσίπουρο για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου καθότι πέτυχε ικανοποιητικά αποτελέσματα όπως φαίνεται και από τον πίνακα 5.1.

Από την άλλη πλευρά, σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της πράσινης πιπεριάς Jalapeño, προκύπτουν ιδανικές συνθήκες εκχύλισης για την βελτιστοποίηση του ποσοστού αναστολής των υπό εξέταση μικροοργανισμών, οι οποίες κιάλας διέφεραν μεταξύ των μικροοργανισμών.

Πιο συγκεκριμένα:

1. Για τον *B. cereus*: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 5% w/v και pH 5,5
2. Για τον *S. aureus*: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,5% w/v και pH 4,5
3. Για την *L. monocytogenes*: χρόνος εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,5% w/v και pH 6,5

Η αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών αυτών επαληθεύθηκε από τα ποσοστά αναστολής που προέκυψαν με μέγιστη τιμή το 81.49% για την *L. monocytogenes*, 34.01% για τον *S. aureus* και 9.39% για τον *B. Cereus*. Παρ' όλα αυτά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως δεν παρουσιάστηκε ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών σε όλα τα εκχυλίσματα, γεγονός που οφείλεται στις διαφορετικές επιδράσεις των παραγόντων. Όσον αναφορά τον χρόνο εκχύλισης, μεγάλοι χρόνοι εμφάνισαν καλύτερα αντιμικροβιακά αποτελέσματα σε σχέση με μικρότερους χρόνους, δηλαδή εκχύλιση 24 ωρών είχε μεγαλύτερη επίδραση στην ανασταλτική δράση των μικροοργανισμών. Η έρευνα των Nihal Turkmen et al. επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση με τη δοκιμή εκχυλισμάτων μαύρου τσαγιού σε διάφορους 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). Έπειτα η αναλογία σπόρων/διαλύτη φαίνεται να μην καθορίζει άμεσα την ικανότητα αναστολής των μικροοργανισμών. Ο παράγοντας αυτός συνδέεται άμεσα με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων των σπόρων της πιπεριάς *Jalapeño*, που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Επομένως, η σύνδεση της ανωτέρω παραμέτρου με την ικανότητα αναστολής επιτυγχάνεται με βάση το φαινολικό περιεχόμενο, δηλαδή όσο αυξάνεται η αναλογία σπόρων/διαλύτη αυξάνεται και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, και εν συνεχεία η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων, μέχρι να επέλθει ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων (σπόροι και διαλύτης). Όμως εφόσον η αύξηση συνεχιστεί πέρα από αυτό το σημείο οδηγεί σε μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Gao et al. 2021; Jovanović et al. 2021). Μεταξύ των μικροοργανισμών παρατηρείται πως χαμηλή αναλογία σπόρων/διαλύτη επιφέρει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση με κατάλληλο συνδυασμό συνθηκών, όπως φαίνεται για την *L. monocytogenes* και τον *S.aureus* στα εκχυλίσματα με την υψηλότερη αναστολή. Παράλληλα, μεγάλη αναλογία ύψους 5% w/v δίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων, αλλά σε σύγκριση με τους μικροοργανισμούς εμφανίζονται διαφορετικές περιπτώσεις για τον καθένα. Για παράδειγμα στο εκχύλισμα 8, όπου εμφανίζεται η μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων εντοπίζεται η μεγαλύτερη ανάπτυξη ως προς την *L. monocytogenes* και μικρή ανάπτυξη του *B. Cereus*, ενώ για τον *S.aureus* φαίνεται να είναι ένα από τα εκχυλίσματα που υπάρχει ανασταλτική δράση. Ένα συμπέρασμα που μπορεί να προκύψει από αυτή την παρατήρηση είναι ότι πολύ πιθανόν η ύπαρξη κάποιων φαινολικών ενώσεων να λειτουργεί ως τροφή για την *L. monocytogenes* και τον *B. Cereus*. Τελευταία παράμετρος το pH κατέχει καθοριστικό ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων, διότι επηρεάζει την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών. Γνωστό είναι πως η ανάπτυξη τους ευνοείται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH=4,5-8, ενώ σε τιμές pH<4,0 δεν παρατηρείται βακτηριακή δραστηριότητα. Στα μελετούμενα εκχυλίσματα καλύτερες τιμές pH για αναστολή φαίνεται να είναι 5,5 για τον *B. Cereus*, 4,5 για τον *S. aureus* και 6,5 για την *L. Monocytogenes* με βάση τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων με την υψηλότερη ανασταλτική δράση. Αναλυτικά, οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν έχουν τις εξής ελάχιστες τιμές pH για ανάπτυξη τους:

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

Επομένως φαίνεται να μην συνάδουν οι βιβλιογραφικές ελάχιστες τιμές pH με τα προκύπτοντα βέλτιστα pH για αναστολή από τα πειραματικά μοντέλα. Οπότε η αναστολή που παρατηρείται προκύπτει από την συνδυαστική επίδραση των παραμέτρων και όχι από το pH μόνο.

5.3. Φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Συνολικά 27 (πολυ)φαινολικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα της πράσινης πιπεριάς Jalapeño. Περισσότερη σημασία συγκεντρώνει η μελέτη των φαινολικών ενώσεων που εμφανίζονται στα εκχυλίσματα με τις υψηλότερες και τις χαμηλότερες τιμές (Πίνακας 5.11) όσον αναφορά την περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων (TPC) και το ποσοστό αναστολής για τους τρεις μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν. Στα εκχυλίσματα μέσω LC-MS ταυτοποιήθηκαν φλαβονοειδείς ενώσεις, αλλά και άλλες ενώσεις, από τις οποίες κυριαρχούν οι μη φλαβονοειδείς. Πιο συγκεκριμένα, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.12) οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα υπό μελέτη εκχυλίσματα.

Οι συνθήκες εκχύλισης μεταξύ των εκχυλισμάτων που θα σχολιαστούν παρακάτω φαίνονται στον πίνακα 5.11.

Πίνακας 5. 11: Συνθήκες εκχύλισης υψηλότερων και χαμηλότερων εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	Υψηλότερη/Χαμηλότερη τιμή	Χρόνος εκχύλισης (h)	Αναλογία σπόρων/διαλύτη(% w/v)	pH
J15	Min TPC	4	1,25	5,5
J2	Max TPC	8	1,25	6,5
J4	Min <i>S.aureus</i>	8	5	4,5
J10	Max <i>S.aureus</i>	24	2,5	4,5
J13	Min <i>B.cereus</i> /Max <i>L.monocytogenes</i>	24	2,5	6,5
J11	Max <i>B.cereus</i>	24	5	5,5
J8	Min <i>L.monocytogenes</i>	4	5	5,5

*max= Υψηλότερη τιμή περιεκτικότητας φαινολικών/ποσοστού αναστολής μ.ο.(μικροοργανισμού)
min= Χαμηλότερη τιμή περιεκτικότητας φαινολικών/ποσοστού αναστολής μ.ο

Πίνακας 5. 12: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα με ονομασία

Μη Φλαβονοειδή			Φλαβονοειδή		
Κατηγορία ένωσης	Συντομογραφία	Ονομασία	Κατηγορία ένωσης	Συντομογραφία	Ονομασία
<u>Βενζοτριόλες</u>	βενζ-1,2,3-τριόλη		Φλαβονόνες	NarGE	Ναριγγενίνη
<u>Βενζοϊκά οξέα</u>	3-OH-BA	3-υδροξυβενζαλδεΐδη		IsorhTN	ισοραμνετίνη
	4-OH-BA	4-υδροξυβενζαλδεΐδη	Φλαβόνες	Apig-8-C-GlucSD	Απιγενίνη-8-C-γλυκοζίτης
	2,5-diOH-BA	2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ	Φλαβονόλες	Querc-3-O-GlucSD	Κουερσετίνη
	3,4-diOH-BA	3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ			Ισοκουερσετίνη
	3-MetOH-BA-4-O-GlucSD	3-Μεθοξυβενζοϊκό οξύ 4-O-γλυκοζίτης			
<u>Κινναμικά οξέα</u>	4'-OH-CA	4'-υδροξυκινναμωμικό οξύ			
	CA-4'-O-GlucSD	κινναμωμικό-4'-γλυκοζίτης			
	3',4'-diOH-CA	3',4'-Διυδροξυκινναμωμικό οξύ			
	4'-OH-CA-3'-O-GlucSD	4'-Υδροξυκινναμωμικό-3-O-γλυκοζίτης			
	3'-MetOH-CA-4'-O-GlucSD	3'-μεθοκινναμικό οξύ-4'-O- γλυκοζίτης			
	4'-OH-3',5'-diMetOH-CA	4'-υδροξυ-3',5'-διμεθοξυκινναμικού οξύ			
	3',5'-diMetOH-CA-4'-O-GlucSD	3', 5'-διμεθοξυκινναμικό οξύ-4'-O-γλυκοζίτης			
		Φερουλοϋλοεξοζίτης			

<u>Ακυλο-κινικά οξέα</u>	4-CQA	4-Καφεοϋλκινικό οξύ			
	5-CQA	5-Καφεοϋλκινικό οξύ			
<u>Άλλα φαινολικά οξέα</u>	4-OH-1,2-BenzPyON	4-υδροξυ-1,2-βενζοπυρόνη			
	2'-OH-4'MetOH-Ac-phON	2'-υδροξυ-4'-μεθοξυακετοφαινόνη			

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της μελέτης ερευνητών για την πιπεριά Piquillo, τα κινναμωμικά οξέα περιγράφηκαν ως ενώσεις υψηλής παρουσίας μεταξύ των φαινολικών οξέων στην ακατέργαστη πιπεριά, συμπεριλαμβανομένου του καφεϊκού οξέος (3',4'-διυδροξυκινναμωμικό οξύ), του φερουλικού οξέος, π-κουμαρικό οξύ (4'-υδροξυκινναμωμικό οξύ) και οι αντίστοιχες γλυκοσίδες τους. Παράλληλα, η ισοραμνετίνη έχει προταθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση και ότι αποτρέπει το οξειδωτικό στρες και την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η (πολυ)φαινολική περιεκτικότητα του πιπεριού μπορεί είναι εξαιρετικά μεταβλητή, καθώς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως την ποικιλία, την κατάσταση ωρίμανσης και τη χώρα προέλευσης, καθώς και τις διαδικασίες εκχύλισης που εφαρμόζονται (Del Burgo-Gutiérrez C, Cid C, Ludwig IA, De Peña MP, 2023).

Έτσι στον παρακάτω πίνακα 5.13 απεικονίζονται οι περιεχόμενες ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα αυτά.

Πίνακας 5. 13: Ταυτοποίηση ενώσεων μέσω φασματομετρία μάζας (LC-MS) στα υψηλότερα – χαμηλότερα εκχυλίσματα

<i>Ενώσεις</i>	<i>J15 min TPC</i>	<i>J2 max TPC</i>	<i>J4 min S. aureus</i>	<i>J10 max cereus – max L. monocytogenes</i>	<i>J13 min B. cereus – max L. monocytogenes</i>	<i>J11 max L. monocytogenes</i>	<i>J8 min L. monocytogenes</i>
Ασκορβικό οξύ	✓	✓		✓			
Ισοραμνετίνη (IsorhTN)	✓	✓			✓	✓	
βενζ-1,2,3- τριόλη	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
κινναμωμικό-4'-Ο-γλυκοζίτης	✓	✓		✓	✓	✓	
3',4'-διυδροξυκινναμωμικό οξύ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

4'-
Υδροξυκινναμωμικό-
3-O-γλυκοζίτης

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

Ναριγγενίνη

✓

5-Καφεοϋλκινικό οξύ
(5-CQA)

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

4-Καφεοϋλκινικό οξύ

✓ ✓ ✓ ✓

Καφεϊκό οξύ

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

Ροσμαρινικό οξύ

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

4'-
υδροξυκινναμωμικό
οξύ

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

3-Μεθοξυβενζοϊκό
οξύ 4-O-γλυκοζίτης

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

3-
υδροξυβενζαλδεΰδη

✓ ✓ ✓

4-
υδροξυβενζαλδεΰδη

✓

2,5-διυδροξυβενζοϊκό
οξύ

✓ ✓ ✓ ✓

Φερουλοϋλοεξοζίτης

✓ ✓ ✓ ✓

3,4-διυδροξυβενζοϊκό
οξύ

✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓

3'-μεθοκινναμικό
οξύ-4'-O- γλυκοζίτης

✓ ✓ ✓ ✓ ✓

4-υδροξυ-1,2-
βενζοπυρόνη

✓ ✓ ✓ ✓ ✓

2'-υδροξυ-4'-

✓

μεθοξυακετοφαινόνη			
4'-υδροξυ-3',5'- διμεθοξυκινναμικό οξύ	✓		
Κερσετίνη-3-O- γλυκοζίτης	✓		
Απιγενίνη-8-C- γλυκοζίτης	✓		
Ισοκουερσετίνη	✓		✓
Βιτεξίνη	✓	✓	

*max= Υψηλότερη τιμή περιεκτικότητας φαινολικών/ποσοστού αναστολής μ.ο.(μικροοργανισμού)

min= Χαμηλότερη τιμή περιεκτικότητας φαινολικών/ποσοστού αναστολής μ.ο.

*J15 = εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 15

J2= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 12

J4= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 4

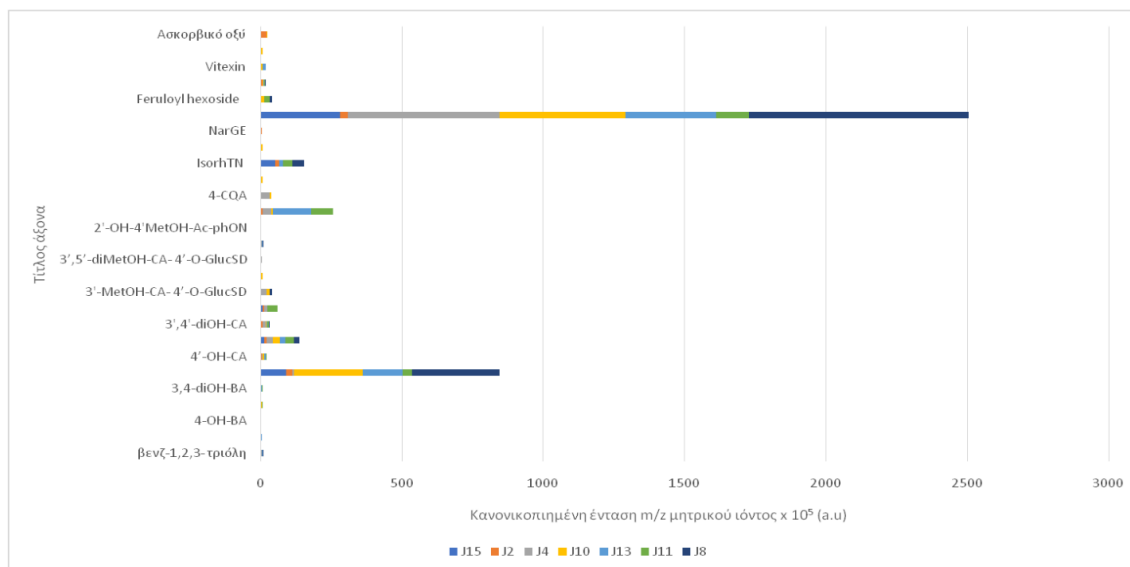
10= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 10

J13= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 13

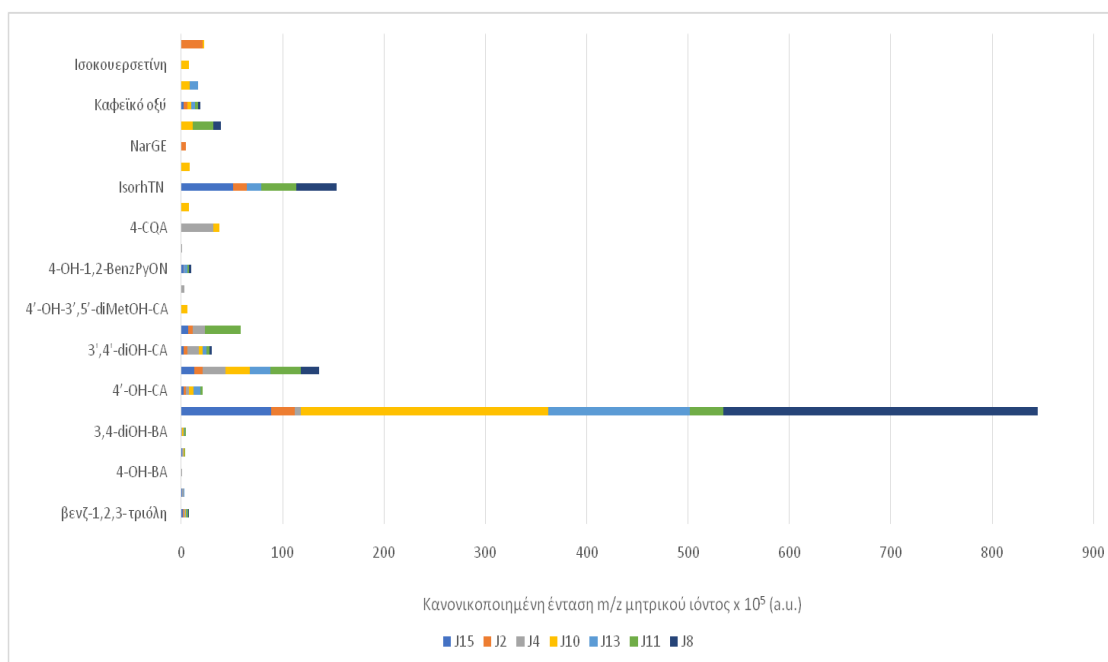
J11= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 11

J8= εκχύλισμα Jalapeño σειρά πειράματος 8

Στην συνέχεια, παρουσιάζονται δυο διαγράμματα, το πρώτο (Εικόνα 5. 1) απεικονίζει το σχετικό περιεχόμενο όλων των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με βάση τις εντάσεις των μητρικών ιόντων, ενώ στην δεύτερη (Εικόνα 5. 2) έχουν αφαιρεθεί 3 ενώσεις με τις πιο μεγάλες εντάσεις ώστε να διευκολύνεται και η σύγκριση μεταξύ των υπολοίπων.



Εικόνα 5. 2: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς *Jalarpeños*



Εικόνα 5. 3: Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα σπόρων πιπεριάς *Jalarpeños*, έχοντας αφαιρεθεί οι 3 με τις πιο μεγάλες εντάσεις

Κάποιες αξιοσημείωτες παρατηρήσεις από τον παραπάνω πίνακα 5.13 και τις εικόνες 5.1, 5.2 είναι πως:

- Το εκχύλισμα J13 εμφανίζεται ως το καλύτερο για την αναστολή του *L. monocytogenes* και ως το χειρότερο για τον *B. Cereus*. Αυτό σημαίνει πως κάποιες από τις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις δρούν ανασταλτικά για τον *L. monocytogenes*, ενώ τον *B. Cereus* τον βοηθούν να αναπτυχθεί το οποίο σημαίνει ότι τρέφεται από το συγκεκριμένο εκχύλισμα. Με βάση τις εντάσεις που εμφανίζουν, επιδρούν σημαντικά για τον κάθε μικροοργανισμό αντίστοιχα, κατά κύριο λόγο οι ενώσεις: ροσμαρινικό οξύ, 3-

μεθοξυβενζοϊκό οξύ 4-O-γλυκοζίτης, 5-Καφεοϋλκινικό οξύ, κινναμωμικό-4'-γλυκοζίτης. Το ροσμαρινικό οξύ και το 5-Καφεοϋλκινικό οξύ πιθανά να συνεισφέρουν στην αναστολή της *L. Monocytogenes*, χωρίς όμως να είναι οι κύριες ενώσεις που την προκαλούν, ενώ οι γλυκοζίτες πιθανόν τρέφουν τον *B. Cereus*.

- Οι ενώσεις βενζ-1,2,3- τριόλη, 3',4'-διυδροξυκινναμωμικό οξύ, 5-Καφεοϋλκινικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, 4'-υδροξυκινναμωμικό οξύ και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ εμφανίζονται σε όλα τα εκχυλίσματα, οπότε φαίνεται ότι δεν εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση για του μικροοργανισμούς, αφού υπάρχουν και στα εκχυλίσματα με χαμηλή ανασταλτική δράση.
- Στο ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζονται υψηλές εντάσεις. Υψηλότερες είναι οι εντάσεις στα εκχυλίσματα με χαμηλότερο ποσοστό περιεκτικότητας ολικών φαινολικών ενώσεων και ανασταλτικής δράσης από ότι σε αυτά με το υψηλότερο. Η επίδραση της στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρατηρείται σημαντική, ενώ στην ανασταλτική δράση των μικροοργανισμών δεν φαίνεται να ισχύει αυτό, διότι βρίσκεται και σε δείγματα με χαμηλή ανασταλτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη ένταση εντοπίζεται στο εκχύλισμα J8 για το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο είναι το χειρότερο ως προς την αναστολή της *L. monocytogenes*.
- Για την ένωση 3-Μεθοξυβενζοϊκό οξύ-4-O-γλυκοζίτης (3-MetOH-BA-4-O-GlucSD) εμφανίζονται υψηλές εντάσεις σε όλα τα εκχυλίσματα
- Από τις υψηλότερες εντάσεις για αρκετά από τα εκχυλίσματα εμφανίζονται επίσης και για το 5-καφεοϋλκινικό οξύ (5-CQA).
- Η μικρότερη ένταση εντοπίζεται σε 4 εκχυλίσματα το J10, J11, J15 και το J13 για τις αντίστοιχες ενώσεις: την βενζ-1,2,3-τριόλη, το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (2,5-diOH-BA) που εμφανίζεται σε δύο εκχυλίσματα και την 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (3,4-diOH-BA).
- Οι ενώσεις ισοκουερσετίνη (J10), Αrig-8c-GlucSD (J10), Querc-3-o-GlucSD (J10), 4'-OH-3',5'-diMetOH-CA (J10), Βιτεξίνη (J10-J13), Ασκορβικό οξύ (J10), ταυτοποιήθηκαν μόνο σε εκχυλίσματα με καλή ανασταλτική δράση, οπότε είναι αυτές που πιο πιθανόν αναστέλουν τους αντίστοιχους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.
- Οι ενώσεις Narge (J2) και Ασκορβικό οξύ (J2) ταυτοποιήθηκαν ως μοναδικές στο εκχύλισμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Σημαντικό ρόλο έχουν επίσης οι συνθήκες εκχύλισης για την ύπαρξη των ενώσεων στα εκχυλίσματα. Αρχικά παρατηρείται πως ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σύμφωνα με τα αποτελέσματα του LCMS υπάρχουν διαφορές στις ενώσεις που περιέχονται στα εκχυλίσματα (J15, J2) με το J15 να είναι το εκχύλισμα με την ελάχιστη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις και το J2 με τη μέγιστη. Όπως φαίνεται και στις εικόνες παραπάνω (Εικόνα 5.1, 5.2) το εκχύλισμα J2, το οποίο απεικονίζεται στη μπάρα με το πορτοκαλί χρώμα εμφανίζεται σε πλήθος ενώσεων σε σύγκριση με το J15. Αυτό σημαίνει πως στο J2 περιέχονται παραπάνω φαινολικά. Επίσης οι συνθήκες εκχύλισης των δυο δειγμάτων είναι διαφορετικές παρά μόνο η αναλογία διαλύτη σπόρων (1,2% w/v) παραμένει ίδια μεταξύ εκχυλισμάτων με υψηλό και χαμηλό TPC. Στη συνέχεια για τα εκχυλίσματα του *S. Aureus* (J4, J10) παρατηρούνται περισσότερες διαφορές στις περιεχόμενες ενώσεις. Μοναδική κοινή συνθήκη εκχύλισης είναι η

τιμή του pH (4,5). Για τα εκχυλίσματα που αφορούν τον *B. Cereus* (J11, J13) έχουμε κοινή συνθήκη τον χρόνο εκχύλισης (24 ώρες) και παρατηρούνται μικρές διαφορές στις περιεχόμενες ενώσεις. Τέλος για τα εκχυλίσματα που σχετίζονται με την *L. Monocytogenes* (J13, J8) υπάρχουν διαφορές στις ενώσεις που περιέχουν, αλλά και οι κοινές είναι αρκετές. Ως προς τις συνθήκες εκχύλισης παρατηρήθηκαν όλες διαφορετικές.

Παρατηρώντας τις συνθήκες εκχύλισης μεταξύ των υψηλότερων και χαμηλότερων εκχυλισμάτων και συγκρίνοντας τις διαφορές ως προς τις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις είναι κατανοητό πως αυτές επηρεάζονται από τους παράγοντες εκχύλισης. Για παράδειγμα, ίδιες παραμένουν οι περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις στα J15, J2, όπου ο μόνος παράγοντας που παραμένει σταθερός σε τιμή είναι η αναλογία διαλύτη/σπόρων. Έπειτα επηρεάζονται από την διάρκεια της εκχύλισης, διότι μικρες είναι οι διαφοροποιήσεις στα J11, J13 όταν ο χρόνος παραμένει ίδιος, ενώ μεγαλύτερες είναι οι διαφοροποιήσεις στις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις στα J4, J10 που ο χρόνος εκχύλισης αλλάζει κατά αρκετές ώρες και η αναλογία σπόρων διαλύτη αλλάζει και στις δυο περιπτώσεις το ίδιο.

5.4. Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύει στη μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης των σπόρων της πιπεριάς *Jalapeño* χρησιμοποιώντας βρώσιμους διαλύτες, όπως είναι το τσίπουρο. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Jalapeño*:

- Το τσίπουρο ως διαλύτης αποδείχθηκε καλός για την εκχύλιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου αφού πέτυχε ικανοποιητικά αποτελέσματα (Πίνακας 5.1)
- Ο καλύτερος συνδυασμός συνθηκών εκχύλισης για την μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (0,495 mg GAE/g σπόρου) ήταν: 4 ώρες, αναλογία σπόρων διαλύτη 5% w/v, pH 5,5.
- Οι συμβατικές τεχνικές απαιτούν μεγάλους χρόνους εκχύλισης εξαιτίας της απουσίας ενέργειας και θερμοκρασίας, για την μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.
- Η αύξηση της αναλογίας σπόρων/διαλύτη αυξάνει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.
- Το pH ως παράμετρος εκχύλισης δεν ασκεί σημαντική επίδραση στο αποτέλεσμα ($p\text{-value}=0,968$)

Αναφορικά με την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων της πιπεριάς *Jalapeño*:

- Τα εκχυλίσματα πιπεριάς εμφάνισαν επαρκή ανασταλτική δράση κατά της *L. monocytogenes*. Αντίθετα, ο *S. aureus* και ο *B. cereus* φαίνεται σε κάποιες περιπτώσεις να χρησιμοποιούν τα εκχυλίσματα ως θρεπτικό υλικό προκειμένου να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός (όπου αρνητικό ποσοστό αναστολής) με λίγες εξαιρέσεις που παρατηρείται όντως ανασταλτική δράση.
- Οι ιδανικές συνθήκες για την αναστολή της *L. monocytogenes* βρέθηκαν σε 3 συνδυασμούς συνθηκών εκχύλισης που πέτυχαν το υψηλότερο ποσοστό αναστολής. Ο πρώτος είχε χρόνο 8 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,5% w/v και pH 5,5, ο δεύτερος είχε χρόνο εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,5% και pH 6,5 ενώ ο τρίτος που έδειξε πολύ μικρή αλλά θετική αναστολή είχε χρόνο εκχύλισης 4 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 1,25% w/v και pH 5,5.
- Τα εκχυλίσματα πιπεριάς εμφάνισαν ποσοστό αναστολής για την *L. monocytogenes* 81,49%, για τον *S. aureus* 34%, ενώ για τον *B. cereus* το ποσοστό αναστολής είναι μόνο 9,39%.
- Οι συνθήκες εκχύλισης του πειράματος 13 (χρόνο εκχύλισης 24 ώρες, αναλογία σπόρων/διαλύτη 2,5% και pH 6,5) αποδείχθηκαν οι καλύτερες για την αναστολή της *L. monocytogenes* και ταυτόχρονα οι βέλτιστες για την ανάπτυξη του *B. cereus*.
- Οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης έδωσαν καλύτερα αντιμικροβιακά αποτελέσματα στα εκχυλίσματα της πιπεριάς Jalapeño.
- Η αναλογία σπόρων/διαλύτη επιδρά έμμεσα την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων από την επίδραση που εμφανίζει στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.
- Το τσίπουρο περιέχει 40% αιθανόλης και είναι γνωστό πως αιθανόλη ή αλλιώς αιθυλική αλκοόλη συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 20%, αποτρέπει την ανάπτυξη μούχλας και βακτηρίων.

Από την εφαρμογή της φασματομετρίας (LC-MS) προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μικρότερη ένταση εντοπίζεται σε 4 εκχυλίσματα το J10, J11, J15 και το J13, τα οποία αφορούν το μέγιστο ποσοστό αναστολής των μικροοργανισμών, εκτός από το J15 που αφορά το εκχύλισμα με το ελάχιστο φαινολικό περιεχόμενο. Η υπόθεση που μπορεί να προκύψει είναι πως δεν είναι ανάλογη η σχέση της έντασης που παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις με το ποσοστό αναστολής των συγκεκριμένων μικροοργανισμών που μελετάμε ή η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται σε άλλες ενώσεις που υπάρχουν αλλά δεν ταυτοποιήθηκαν.
- Μάλλον οι ενώσεις: βενζ-1,2,3- τριόλη, 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (2,5-diOH-BA) και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (3,4-diOH-BA), δεν έχουν μεγάλη επίδραση στο ποσοστό αναστολής των μικροοργανισμών που μελετάμε.
- Ενώ οι ενώσεις ισοκουερσετίνη, Βιτεξίνη, Ασκορβικό οξύ, Apig-8c-GlucSD, Querc-3-o-GlucSD, 4'-OH-3',5'-diMetOH-CA αναστέλουν τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, αφού είναι μοναδικές σε εκχυλίσματα με υψηλά ποσοστά αναστολής.

- Οι ενώσεις Narge και Ασκορβικό οξύ καθορίζουν κατά βάση την υψηλή περιεκτικότητα σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο.
- Η μεγαλύτερη ένταση εντοπίζεται στο εκχύλισμα J8 για το ροσμαρινικό, το οποίο είναι το χειρότερο ως προς την αναστολή της *L. monocytogenes*.
- Στο ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζονται από τις υψηλότερες εντάσεις, ακόμα όμως και στα εκχυλίσματα που δεν έχουν καλή αντιμικροβιακή δράση, άρα η επίδραση της ένωσης αυτής δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά ως προς την αναστολή των μικροοργανισμών.

5.5. Μελλοντικοί στόχοι

Από τα συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής προκύπτουν κάποιοι μελλοντικοί στόχοι για περαιτέρω μελέτη και κατανόηση της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων της πράσινης πιπεριάς Jalapeño. Πιο συγκεκριμένα:

- Αναζήτηση και άλλων αλκοολούχων αποσταγμάτων για μελλοντική χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων ως διαλύτες κατά την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. βότκα)
- Έρευνα για επιπρόσθετους παραμέτρους εκχύλισης (π.χ. θερμοκρασία)
- Μελέτη της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων της πράσινης πιπεριάς Jalapeño και σε άλλα στελέχη βακτηρίων που συμμετέχουν στην αλλοίωση των τροφίμων. (π.χ. *E. coli*)
- Ανάπτυξη νέου πειραματικού σχεδιασμού και εύρεση νέων παραγόντων, που να επιδρούν με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στα εκχυλίσματα της πράσινης πιπεριάς Jalapeño για την αναστολή ανάπτυξης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών.

BIBLIOGRAFIA

- João P. Trigo, Elisabete M. C. Alexandre, Jorge A. Saraiva & Manuela E. Pintado (2020) High value-added compounds from fruit and vegetable by-products – Characterization, bioactivities, and application in the development of novel food products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:8, 1388-1416, <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1572588>
- Schanes, K., Dobernig, K., & Gözet, B. (2018). Food waste matters-A systematic review of household food waste practices and their policy implications. *Journal of cleaner production*, 182, 978-991. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.030>
- Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-food byproducts as a new source of natural food additives. *Molecules*, 24(6), 1056. <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>
- Valdez-Morales, M., Sandoval-Castro, C.J., Gutiérrez-Dorado, R. *et al.* Oil Recovery from Jalapeño Pepper By-Products and Analysis of the Industrial Scalding Process on Its Nutraceutical Potential. *Waste Biomass Valor* 12, 4475–4487 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01323-8>
- O'Shea, N., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002>
- Muntean, M. V., Fărcaș, A. C., Medeleanu, M., Salanță, L. C., & Borșa, A. (2022). A sustainable approach for the development of innovative products from fruit and vegetable by-products. *Sustainability*, 14(17), 10862. <https://doi.org/10.3390/su141710862>
- Espinosa-Alonso, L.G., Valdez-Morales, M., Aparicio-Fernandez, X., Medina-Godoy, S. and Guevara-Lara, F. (2020). Vegetable By-products. In *Food Wastes and By-products* (eds R. Campos-Vega, B.D. Oomah and H.A. Vergara-Castañeda). <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch8>
- Ma, Y., Wu, X., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2019). Comparison of the compounds and characteristics of pepper seed oil by pressure-assisted, ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Innovative food science & emerging technologies*, 54, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.011>
- Supalkova, V., Stavelikova, H., Krizkova, S., Adam, V., Horna, A., Havel, L., ... & Kizek, R. (2007). Study of capsaicin content in various parts of pepper fruit by liquid chromatography with electrochemical detection. *Acta Chimica Slovenica*, 54(1). Paper based on a presentation at the 12th International Symposium on Separation Sciences, Lipica, Slovenia, September 27–29, 2006.
- LEE, Y., HOWARD, L.R. and VILLALÓN, B. (1995), Flavonoids and Antioxidant Activity of Fresh Pepper (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Food Science*, 60: 473-476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09806.x>
- da Silveira Agostini-Costa, T., da Silva Gomes, I., de Melo, L. A. M. P., Reifschneider, F. J. B., & da Costa Ribeiro, C. S. (2017). Carotenoid and total vitamin C content of peppers from selected Brazilian cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.020>
- Katajamaa, M., Orešič, M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* 6, 179 (2005). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-179>

Manousi, Natalia, Ioannis Sarakatsianos, and Victoria Samanidou. "Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants." *Engineering tools in the beverage industry*. Woodhead Publishing, 2019. 283-314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X>

Ben Attia I, Zucca P, Cesare Marincola F, Piras A, Rosa A, Chaieb M, Rescigno A. Chemical Composition and Antioxidant Potential Differences between *Cynomorium coccineum* L. Growing in Italy and in Tunisia: Effect of Environmental Stress. *Diversity*. 2018; 10(3):53. <https://doi.org/10.3390/d10030053>

Λαμπούση, Νικολέτα. "Μέθοδοι εκχύλισης και βιολογικές ιδιότητες αιθέριων ελαίων και βιοδραστικών ουσιών από παραπροϊόντα αρωματικών φυτών." (2022). <http://dx.doi.org/10.26265/polynoe-3153>

Σαρόγλου, Β., & Αναγνωστοπούλου, Α. (2023). Μελέτη της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης κόκκινων πιπεριών του γένους *Capsicum annum* με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία MIR. <http://dx.doi.org/10.26265/polynoe-4572>

Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>

Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Vo, D. V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 3409-3443.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.060>

Tena N, Asuero AG. Up-To-Date Analysis of the Extraction Methods for Anthocyanins: Principles of the Techniques, Optimization, Technical Progress, and Industrial Application. *Antioxidants*. 2022; 11(2):286. <https://doi.org/10.3390/antiox11020286>

Ελένη Αλοΐζου 2022 Πτυχιακή Εργασία: Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων με εφαρμογή στο χαρούπι

Astrid Spielmeier, Marc F. Schetelig, Josiane Etang, 2019 High-throughput analysis of insecticides on malaria vectors using liquid chromatography tandem mass spectrometry <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211064>

Del Burgo-Gutiérrez C, Cid C, Ludwig IA, De Peña MP. LC-MS/MS Analysis Elucidates the Different Effects of Industrial and Culinary Processing on Total and Individual (Poly)phenolic Compounds of Piquillo Pepper (*Capsicum annum* cv. Piquillo). *J Agric Food Chem*. 2023 Apr 4;71(15):6050–60. doi: 10.1021/acs.jafc.2c07829.

Manousi, Natalia, Ioannis Sarakatsianos, and Victoria Samanidou. "Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants." *Engineering tools in the beverage industry*. Woodhead Publishing, 2019. 283-314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X>

Sánchez Toledano, B. I., Camarena Gómez, D. M. J., López Santiago, M. A., & Cuevas Reyes, V. (2023). Consumer Preferences of Jalapeño Pepper in the Mexican Market. *Horticulturae*, 9(6), 684. DOI: 10.3390/d10030053

Παφύλη, Μ. *Η βιταμίνη Α στη διατροφή και την κοσμητολογία* (Doctoral dissertation).

Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 4299-4315.

DOI 10.1002/fsn3.423

Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., Krause, E., & Bohn, T. (2010). Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of food science*, 75(1), C55-C61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x>

Bankova, V., Christoy, R., Stoev, G., & Popov, S. (1992). Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 607(1), 150-153. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87067-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87067-1)

Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2), 177-184. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00826-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00826-8)

Coscollà, C., Navarro-Olivares, S., Martí, P., & Yusà, V. (2014). Application of the experimental design of experiments (DoE) for the determination of organotin compounds in water samples using HS-SPME and GC-MS/MS. *Talanta*, 119, 544-552. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.052>

Murray, P. M., Bellany, F., Benhamou, L., Bučar, D. K., Tabor, A. B., & Sheppard, T. D. (2016). The application of design of experiments (DoE) reaction optimisation and solvent selection in the development of new synthetic chemistry. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(8), 2373-2384. DOI: [10.1039/C5OB01892G](https://doi.org/10.1039/C5OB01892G)

Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*, 93(1), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>

- Zhang, Y., & Zhang, J. (2008). Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design. *Analytica chimica acta*, 627(2), 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.014>
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., ... & Zaidul, I. S. M. (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>
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of food protection*, 59(2), 204-216. <https://doi.org/10.3390/ijerph16030477>
- Leroy, F., Degeest, B., & De Vuyst, L. (2002). A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 251-259. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00657-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00657-2)
- Beuchat, L. R. (1996) Rasul 2018; Sridhar et al. 2021)
- Bacon, K., Boyer, R., Denbow, C., O'Keefe, S., Neilson, A., & Williams, R. (2017). Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food Science & Nutrition*, 5(3), 730-738. <https://doi.org/10.1002/fsn3.453>
- Howard, L. R., & Hernandez-Brenes, C. (1998). Antioxidant content and market quality of jalapeno pepper rings as affected by minimal processing and modified atmosphere packaging. *Journal of Food Quality*, 21(4), 317-327. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1998.tb00525.x>
- Cutter, C. N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601-607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.601>
- <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.509896>
- Koffi-Nevry, R., Kouassi, K. C., Nanga, Z. Y., Koussémon, M., & Loukou, G. Y. (2012). Antibacterial activity of two bell pepper extracts: *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens*. *International journal of food properties*, 15(5), 961-971.
- Cichewicz, R. H., & Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 52(2), 61-70. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01384-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01384-0)
- Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., & Patil, B. S. (2012). Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food chemistry*, 134(4), 1912-1918.

Zhang, C., Gu, F., Hu, W., Wu, G., Chen, W., Dong, C., & Niu, Z. (2022). Effect of extraction technique on chemical compositions and antioxidant activities of freeze-dried green pepper. *Frontiers in Nutrition*, 9, 998840.

(Torres-León et al. 2018)