



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* (σαμπούκος) με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού “



ΠΙΛΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ Α.Μ : 19684076

ΡΟΥΣΣΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Α.Μ : 19684083

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια :

ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023



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

Diploma Thesis

**‘ Extraction of phenolic compounds from by-products of the aromatic plant
Sambucus nigra using model experimental design ‘**

PILATOS SPYRIDON RN : 19684076

ROUSSOS IOANNIS RN : 19684083

Supervisor :

TSIAKA THALIA

Athens, September 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

“ Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* (σαμπούκος) με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού “

Μέλη εξεταστικής επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

A/a	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Τσιάκα Θάλεια	Διδακτικό Προσωπικό ΕΣΠΑ/ Επιβλέπουσα	
2.	Σινάνογλου Βασιλεία	Καθηγήτρια – Κοσμήτορας της Σχολής Επιστημών Τροφίμων/ Μέλος	
3.	Μπρατάκος Σωτήρης	Μέλος Ε.ΔΙ.Π.	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Πιλάτος Σπυρίδων του Ιωάννη και Ρούσσος Ιωάννης του Δημήτριου με αριθμό μητρώου 19684076 και 19684083 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».

Ο Δηλών

ΠΙΛΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ



Ο Δηλών

ΡΟΥΣΣΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ



Ευχαριστίες

Θεωρούμε χρέος μας να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Τσιάκα Θάλεια για την καθοδήγηση της και για την αμέριστη υπομονή και διάθεση που μας έδειξε σε όλη την διάρκεια συγγραφής της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Το γνωστικό υπόβαθρο που μας προσέφερε, μας έκανε καλύτερους φοιτητές και μας γέμισε αυτοπεποίθηση για το επαγγελματικό μας μέλλον. Θα θέλαμε επίσης να ευχαριστήσουμε την διεύθυνση του τμήματος για την διάθεση των εργαστηρίων καθώς και τις οικογένειες μας για την στήριξη και την κατανόηση καθ' όλη την φοιτητική μας πορεία!

Περίληψη

Με το πέρασμα των χρόνων οι εφαρμογές των αρωματικών φυτών σε κλάδους όπως, η βιομηχανία των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών πολλαπλασιάζονται. Η παραγωγή παραπροϊόντων από την απόσταξη αρωματικών φυτών για την παραλαβή αιθέριων ελαίων, μάλιστα, αποτελεί σημαντική βιομηχανική δραστηριότητα για την εξαγωγή και αξιοποίηση φυτικών ελαίων με αρωματικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Η παρούσα πτυχιακή εργασία, επικεντρώνεται στην βελτιστοποίηση της εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* (σαμπούκος) με χρήση μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού και στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής δράσης επιλεγμένων εκχυλισμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ανάγκη αξιοποίησης των παραπροϊόντων που προκύπτουν από την απόσταξη των αρωματικών φυτών, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στο φυτό *Sambucus nigra* L. και στις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχει. Στη συνέχεια, γίνεται ειδική αναφορά στις φαινολικές ενώσεις του σαμπούκου, στις βιολογικές τους ιδιότητες και στις τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή τους. Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση 4 παραμέτρων (περιεκτικότητα αιθανόλης, χρόνος εκχύλισης, ενέργεια υπερήχων, αναλογία διαλύτη/δείγματος) της εκχύλισης με υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE) με χρήση του μοντέλου Box-Behnken. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (total phenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων δρόγης σαμπούκου και παραπροϊόντων προσδιορίστηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ η αντιοξειδωτική και η αντιριζική δράση επιλεγμένων εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο FRAP και ABTS, αντίστοιχα. Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων προέκυψε πως οι βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή εκχυλισμάτων πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις ήταν : 54 % v/v περιεκτικότητα σε αιθανόλη στον διαλύτη, 40 λεπτά διάρκεια εκχύλισης, 80% ενέργεια των υπερήχων (W) και 37 mL/g αναλογία διαλύτη/δείγματος, ενώ η περιεκτικότητα αιθανόλης στο διαλύτη της εκχύλισης αναδείχθηκε ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων. Όσον αφορά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, μετά από εφαρμογή της δοκιμής Folin-Ciocalteu, στην ξηρή δρόγη βρέθηκαν $24,3 \pm 1,6$ mg GAE/g δείγματος ενώ στο παραπροϊόν 39 ± 1 mg GAE/g δείγματος. Το αυξημένο φαινολικό περιεχόμενο του παραπροϊόντος, πιθανόν, οφείλεται στην ήπια διαδικασία της ατμοαπόσταξης σε σύγκριση με άλλες μεθόδους (π.χ. υδροαπόσταξη) κατά την οποία η αύξηση της θερμοκρασίας λόγω του βρασμού του διαλύτη δε γίνεται απευθείας στο δείγμα, καθώς δε βρίσκεται εντός του διαλύτη απόσταξης. Παρόλα αυτά οι θερμοί ατμοί είναι αυτοί που διέρχονται στη συνέχεια από το δείγμα του σαμπούκου, αποστάζοντας τα αιθέρια

έλαια και δημιουργώντας το στερεό παραπροϊόν. Η ήπια λοιπόν αυξημένη θερμοκρασία λόγω των ατμών μπορεί να μην καταστρέφει τα φαινολικά της αρχικής δρόγης, αλλά αντιθέτως να διασπά και κάποιους γλυκοζίτες φαινολικών ενώσεων, απελευθερώνοντας ελεύθερες μορφές φαινολικών (είτε οξέα είτε φλαβονοειδή) αυξάνοντας έτσι το φαινολικό περιεχόμενο του παραπροϊόντος.

Λέξεις κλειδιά: παραπροϊόντα απόσταξης αρωματικών φυτών, *Sambucus nigra* L. (σαμπούκος), ολικό φαινολικό περιεχόμενο, εκχύλιση με υπερήχους, μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, αντιριζική δράση, αντιοξειδωτική δράση

Abstract

Over the years, the applications of aromatic plants in industries such as the food, pharmaceutical and cosmetic industries are multiplying. The production of by-products from the distillation of aromatic plants to obtain essential oils is, in fact, an important industrial activity for the recovery and utilization of plant oils with aromatic and therapeutic properties. This thesis focuses on the optimization of the extraction of phenolic compounds from by-products of the aromatic plant *Sambucus nigra* (elder) using experimental design models and on the determination of the antioxidant and antiradical activity of selected extracts. Initially, a literature review was carried out regarding the need to exploit the by-products resulting from the distillation of aromatic plants, giving particular emphasis to the plant *Sambucus nigra* L. and the bioactive compounds it contains. Then special reference is made to the phenolic compounds of elder, their biological properties and the extraction techniques for their recovery. More specifically, in the context of the present research, the optimization of 4 parameters (ethanol content, extraction time, ultrasound energy, solvent/sample ratio) of ultrasound-assisted extraction (UAE) was carried out using the Box-Behnken model. The total phenolic content (TPC) of elderberry extracts and by-products was determined by the Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant and antiradical activity of selected extracts was assessed by the FRAP and ABTS methods, respectively. From the study of the results, it emerged that the optimal conditions for obtaining extracts rich in phenolic compounds were: 54 % v/v ethanol content in the solvent, 40 min extraction duration, 80 % ultrasound energy (W) and 37 mL/g solvent/sample ratio, while the ethanol content in the extraction solvent emerged as the most important factor for the recovery of phenolic compounds. Regarding the total phenolic content, after applying the Folin-Ciocalteu test, 24.3 ± 1.6 mg GAE/g sample were found in the dry herb while 39 ± 1 mg GAE/g sample was found in the by-product. The increased phenolic content of the by-product is probably due to the mild process of steam distillation compared to other methods (e.g. hydrodistillation) in which the increase in temperature due to the boiling of the solvent does not occur directly in the sample, since it is not immersed in the distillation solvent. However, it is the hot vapors that then pass through the elderberry sample, distilling the

essential oils and generating the solid byproduct. Therefore, the mildly increased temperature due to the vapors may not destroy the phenolics of the dry herb, but instead break down some glycosides of phenolic compounds, releasing free forms of phenolics (either acids or flavonoids) increasing, as a result, the phenolic content of the by-product.

Keywords: aromatic plant distillation by-products, *Sambucus nigra* L. (elder), total phenolic content, ultrasound-assisted extraction, Box-Behnken experimental design model, antiradical activity, antioxidant activity

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract	9
1. Παραπροϊόντα τροφίμων : Γενικές πληροφορίες	15
1.1 Σύγχρονες τάσεις αξιοποίησης αποβλήτων και παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων...	19
1.2 Παραπροϊόντα απόσταξης αρωματικών φυτών.....	26
1.3 Το αρωματικό φυτό <i>Sambucus nigra</i> L.	27
1.4 Βιοδραστικές ενώσεις και φυσικές πηγές τους	28
2. Φαινολικές ενώσεις	31
2.1 Φαινολικές ενώσεις στους φυτικούς ιστούς	31
2.2 Τεχνικές και Μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων	34
2.3 Αντιοξειδωτική δράση στα τρόφιμα.....	35
2.4 Αντιμικροβιακή δράση φαινολικών ενώσεων	36
3. Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από φυτικά υποστρώματα	37
3.1 Γενικές Πληροφορίες	37
3.2 Εκχυλίσεις με την χρήση Τεχνικών Υψηλής Ενέργειας.....	39
3.2.1 Εκχύλιση με Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE).....	40
Σκοπός της μελέτης	45
4. Υλικά και Μέθοδοι	46
4.1 Προετοιμασία Δείγματος.....	46
4.2 Εκχύλιση με Υπερήχους.....	46
4.3 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης μέσω μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken	47
4.4 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι	48
4.4.1 Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU	48
4.4.2 Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	49
4.4.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+}	49
4.5 Στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.....	50
5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	52
5.1 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης και μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού	52
5.1.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο ξηρής δρόγης	52

5.1.3 Εξίσωση πρόβλεψης φαινολικών ουσιών.....	58
5.1.4 Ανάλυση της επίδρασης των παραγόντων της εκχύλισης με υπερήχους	60
5.1.5 Αποτελέσματα βελτιστοποίησης απόκρισης μοντέλου Box-Behnken.....	70
5.1.6 Επιλογή βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης με υπερήχους για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	72
5.2 Εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών στα παραπροϊόντα.....	73
5.2.1 Σύγκριση εκχυλισμάτων Sambucus και παραπροϊόντων του ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική και την αντιοξειδωτική τους δράση.....	73
5.2.2 Σύγκριση δοκιμών Folin-Ciocalteu, FRAP, ABTS με χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson	80
6. Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές.....	82
7. Σχετική Βιβλιογραφία.....	86

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1.1 Αναλωμένα σιτηρά από βιομηχανία ζυθοποιίας που έχουν υποστεί ξήρανση.....	20
Εικόνα 1.2 Εκχύλιση και χρήση σπόρων σταφυλιού ως συντηρητικό σε φιλέτα ψαριού που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες	21
Εικόνα 1.3 Το αρωματικό φυτό Sambucus nigra	27
Εικόνα 2.1 : Είδη Φαινολικών ενώσεων	33
Εικόνα 3.1: Σύστημα εκχύλισης με χρήση υπερήχων	41
Εικόνα 4.1: Πειραματική πορεία εκχυλίσεων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων του αρωματικού φυτού S.nigra με συσκευή υπερήχων.....	46
Εικόνα 5.1 : Περίληψη του μοντέλου σχετικά με τον συντελεστή προσδιορισμού R-sq, τον διορθωμένο συντελεστή προσδιορισμού R-sq(adj) καθώς και της ικανότητας πρόβλεψης R-sq(pred).....	55
Εικόνα 5.2 : Εξίσωση πρόβλεψης φαινολικού περιεχομένου μέσω του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken.....	58

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1.1 : Κατηγορίες αποβλήτων και παραπροϊόντων τροφίμων ανάλογα το είδος της βιομηχανίας	16
Πίνακας 1.2 : Εκτιμήσεις οικιακών απορριμμάτων τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο	18
Πίνακας 1.3 : Ποσότητες παραπροϊόντων που παράγονται από την βιομηχανία επεξεργασίας σπωροκηπευτικών	24
Πίνακας 2.1: Ανασκόπηση φαινολικών ενώσεων και των δομών τους.	32
Πίνακας 2.2 : Τεχνικές και μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων.....	35
Πίνακας 3.1 : Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων από τις εκχυλίσσεις υπερήχων (ultrasound-assisted extraction,UAE)	44
Πίνακας 4.1 : Πραγματικά επίπεδα τιμών για τις κωδικοποιημένες τιμές (-1), (0) και (+1)	51
Πίνακας 5.1: Συνθήκες εκχύλισης και ολικό φαινολικό περιεχόμενο πειραμάτων του μοντέλου Box-Behnken.....	52
Πίνακας 5.2 : Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων (ANOVA) για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο	56
Πίνακας 5.3: Προτεινόμενα βέλτιστα πειράματα εκχύλισης φαινολικών ουσιών	70
Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα μεθόδων Folin-Ciocalteu, ABTS•+ και FRAP σε παραπροϊόντα και ξηρή δρόγη του αρωματικού φυτού <i>Sambucus nigra</i> L. σχετικά με το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική και την αντιοξειδωτική τους δράση	74

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Ραβδόγραμμα 5.1 : Διάγραμμα Pareto για την εκτίμηση της επίδρασης των παραμέτρων στην εκχύλιση	57
Διάγραμμα 5.2 : Διάγραμμα επίδρασης των τεσσάρων παραμέτρων εκχύλισης στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου	60
Διάγραμμα 5.3 : Διάγραμμα επίδρασης των αλληλεπιδράσεων των παραμέτρων της εκχύλισης στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου	63
Διάγραμμα 5.4 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης χρόνου και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	64
Διάγραμμα 5.5 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης ενέργειας και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	65
Διάγραμμα 5.6 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης αναλογίας διαλύτη/υποστρώματος και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου	66
Διάγραμμα 5.7 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης ενέργειας και χρόνου για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	67
Διάγραμμα 5.8 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης αναλογίας διαλύτη/δείγματος και χρόνου για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	68
Διάγραμμα 5.9 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων για την αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/δείγματος και της ενέργειας για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου.....	69

Διάγραμμα 5.10 : Συγκριτική απεικόνιση του φαινολικού περιεχομένου, μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg GAE ανά g δείγματος.....	75
Διάγραμμα 5.11 : Συγκριτική απεικόνιση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών, μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg Trolox (Trolox Equivalents,TE) ανά g δείγματος. 78	78
Διάγραμμα 5.12 : Συγκριτική απεικόνιση της ποσότητας Fe(III) που ανήχθη σε Fe(II), μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg Fe(II) ανά g δείγματος	79
Διάγραμμα 5.13 : Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ των φασματοφωτομετρικών μεθόδων FOLIN, FRAP, ABTS σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης Pearson	81

1. Παραπροϊόντα τροφίμων : Γενικές πληροφορίες

Στη σύγχρονη εποχή, στις αναπτυσσόμενες χώρες, μεγάλες ποσότητες αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται καθημερινά από τις βιομηχανίες τροφίμων. Ο όρος 'παραπροϊόν' αντιπροσωπεύει μια ομάδα δευτερογενών προϊόντων που προκύπτουν από μια διαδικασία παραγωγής και θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια πολύτιμη και οικονομικότερη πηγή λειτουργικών συστατικών, όπως είναι τα πεπτίδια, τα καροτενοειδή και οι φαινολικές ενώσεις, προάγοντας έτσι την νοοτροπία της κυκλικής οικονομίας (Faustino et al., 2019).

Η αγορά των τροφίμων εμφανίζει συστηματικά ανοδικές τάσεις λόγω της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, που φέρνει στο προσκήνιο την ανάγκη για δημιουργία νέων λειτουργικών συστατικών, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη πρωτοπόρων λειτουργικών προϊόντων. Το γεγονός αυτό, έχει ως συνέπεια, την στρόφη του ερευνητικού και επιχειρηματικού ενδιαφέροντος στα φυσικά παραπροϊόντα και στις αντίστοιχες εφαρμογές τους (Okino Delgado & Fleuri, 2016).

Μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων ή παραπροϊόντων τροφίμων παράγονται από τις βιομηχανίες, σε ετήσια βάση. Σύμφωνα με έρευνες, 38% του συνόλου των απορριμμάτων τροφίμων προκύπτει αποκλειστικά κατά το στάδιο της επεξεργασίας τους. Τα απορρίμματα αυτά (απόβλητα και παραπροϊόντα) παράγονται από διάφορες πηγές οι οποίες αναφέρονται στον Πίνακα 1.1 :

Πίνακας 1.1 : Κατηγορίες αποβλήτων και παραπροϊόντων τροφίμων ανάλογα το είδος της βιομηχανίας (Bharat Helkar & Sahoo, 2016)

Κατηγορίες απόβλητων τροφίμων ανάλογα την βιομηχανία			
Βιομηχανίες Κρέατος	Γαλακτοβιομηχανίες	Τρόφιμα φυτικής προέλευσης	Θαλασσινά
Δέρμα	Όρος γάλακτος	Σπόροι, Πυρήνες φρούτων	Δέρμα
Εντόσθια	Τυρόπηγμα	Φλούδες	Οστά
Σπλάχνα	Ιλύς γάλακτος	Μίσχοι, Φύλλα	Λάδια
Κόκκαλα	Λίπος	Βιομάζα παραγόμενη μετά την απόσταξη αρωματικών φυτών	Αίμα
Φτερά		Υπολείμματα εκχύλισης χυμού	
Λίπος		Υπολείμματα εκχύλισης σακχάρων	
Κρέας		Υπολείμματα εκχύλισης αμύλου	
Αίμα			

Με βάση έρευνα του ΟΗΕ που πραγματοποιήθηκε το 2019 , καταγράφηκαν 931 εκατομμύρια τόνοι τροφίμων, οι οποίοι κατέληξαν σε κάδους απορριμμάτων νοικοκυριών, λιανοπωλητών, εστιατορίων και άλλων υπηρεσιών του κλάδου.

Η έκθεση Food Waste Index Report 2021, από το Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον (United Nations and Environments Programme, UNEP) και τον συνεργαζόμενο οργανισμό Προγράμματος Δράσης για τα Απόβλητα και τους Πόρους (Waste and Resources Action Programme, WRAP) , παραθέτει στατιστικά στοιχεία σχετικά με την σπατάλη τροφίμων που εμφανίζεται σε εστιατόρια, νοικοκυριά και καταστήματα λιανικής πώλησης συμπεριλαμβάνοντας τόσο τρόφιμα όσο και μη βρώσιμα μέρη, όπως τα οστά. Αποτελεί την πιο ολοκληρωμένη έκθεση έως και σήμερα,

στην μοντελοποίηση, συλλογή και ανάλυση των δεδομένων για την ετήσια σπατάλη τροφίμων.

Η διαπίστωση που προκύπτει από την έκθεση υποδεικνύει ότι τα ποσοστά της σπατάλης των τροφίμων παραμένουν υψηλά σε κάθε χώρα και δεν επηρεάζονται από το επίπεδο του εισοδήματος. Αναλυτικά, προκύπτει ότι την πρώτη θέση στην απόρριψη τροφίμων κρατούν τα νοικοκυριά, με ποσοστό 11% απορριπτόμενων τροφίμων, ενώ παρόμοια κατάσταση επικρατεί σε υπηρεσίες εστίασης και καταστήματα λιανικής με 5% και 2% αντίστοιχα από τα συνολικά διαθέσιμα τρόφιμα. Σε παγκόσμια κλίμακα, 121 κιλά τροφίμων σε επίπεδο καταναλωτή σπαταλούνται κάθε χρόνο, με τα 74 κιλά από αυτά να ανήκουν στα νοικοκυριά. Η έκθεση περιλαμβάνει επίσης περιφερειακές και εθνικές εκτιμήσεις ποσοτήτων τροφίμων που απορρίπτονται από τα νοικοκυριά, οι οποίες περιγράφονται στον Πίνακα 1.2 :

Πίνακας 1.Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το 0 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.**2 : Εκτιμήσεις οικιακών απορριμμάτων τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο (Food Waste Index Report 2021)**

Περιοχή	Κωδικός χώρας για στατιστική χρήση	Χώρα	Εκτίμηση ανά νοικοκυριό (κιλά/έτος)	Συνολική εκτίμηση νοικοκυριών (τόνοι/έτος)
Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία	36	Αυστραλία	102	2.563.110
Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία	554	Νέα Ζηλανδία	61	291.769
Κεντρική Ασία	398	Καζακιστάν	76	1.404.584
Κεντρική Ασία	417	Κιργιστάν	91	583.951
Κεντρική Ασία	762	Τατζικιστάν	97	906.209
Κεντρική Ασία	795	Τουρκμενιστάν	76	449.895
Κεντρική Ασία	860	Ουζμπεκιστάν	91	3.001.868
Ανατολική Ασία	156	Κίνα	64	91.646.213
Ανατολική Ασία	344	Χονγκ Κονγκ	71	530.985
Ανατολική Ασία	446	Μακάου	71	45.728
Ανατολική Ασία	408	Νότια Κορέα	81	2.070.528
Ανατολική Ασία	392	Ιαπωνία	64	8.159.891

Σημαντικό είναι το αντίκτυπο, επομένως, της άφθονης και απερίσκεπτης σπατάλης τροφίμων τόσο σε περιβαλλοντικό, όσο και σε κοινωνικοοικονομικό επίπεδο (*UNEP Food Waste Index Report, 2022*). Οι μεγάλες ποσότητες απορριμμάτων και η μικροβιακή τους αποσύνθεση επιφέρει μόλυνση της ανθρώπινης υγείας όσο και του περιβάλλοντος, ενώ παράλληλα η επεξεργασία των απορριμμάτων είναι πρόσθετο κόστος για τον κατασκευαστή των τροφίμων. Κρίνεται απαραίτητη, εν κατακλείδι, η αποτελεσματική αξιοποίηση των παραπροϊόντων από τις βιομηχανίες για την αντιμετώπιση του φαινομένου.

1.1 Σύγχρονες τάσεις αξιοποίησης αποβλήτων και παραπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων

Φτάνοντας στο σήμερα, όλο και περισσότερες στρατηγικές και τεχνικές έχουν ανακαλυφθεί για να αντιμετωπιστεί η τεράστια συσσώρευση των αποβλήτων και παραπροϊόντων στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, ώστε να μετατραπούν σε τελικά προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας :

Ζυθοποιία και Οινοποιητική Βιομηχανία :

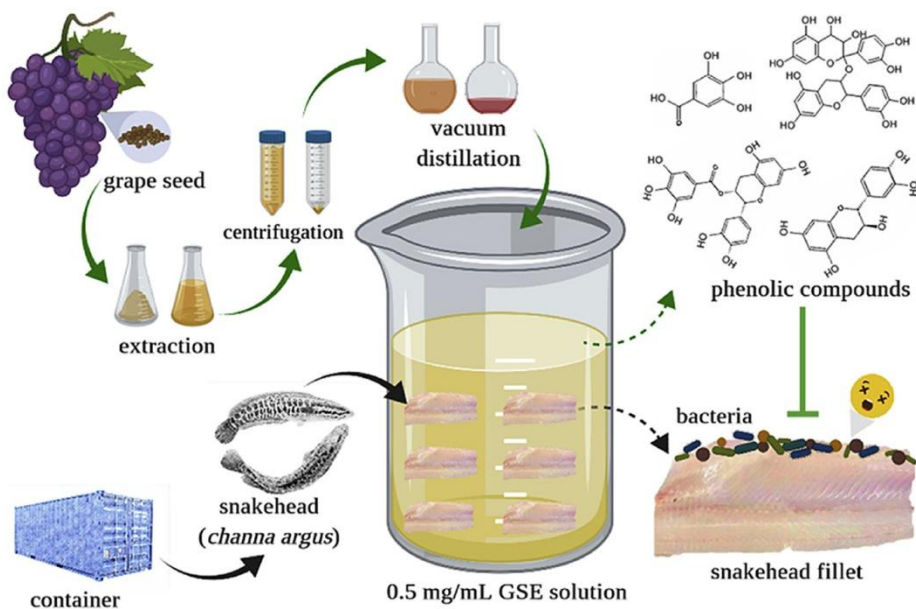
Η μύρα είναι το πέμπτο σε σειρά ρόφημα προτίμησης κατανάλωσης παγκοσμίως. Τα στάδια παρασκευής της είναι υπεύθυνα για την παραγωγή παραπροϊόντων, όπως οι χρησιμοποιημένοι κόκκοι, τα κατάλοιπα της μαγιάς. Για την όσο δυνατόν αποδοτικότερη εκχύλιση του μούστου, οι κόκκοι της βύνης και των δημητριακών θρυμματίζονται σε μια διαδικασία που ονομάζεται πολτοποίηση.



Εικόνα 1.1 Αναλωμένα σιτηρά από βιομηχανία ζυθοποιίας που έχουν υποστεί ξήρανση (What Is "Brewers Spent Grain?" – ReGrained)

Το κύριο παραπροϊόν της πολτοποίησης είναι τα αναλωμένα σιτηρά ή βυθίσματα ζυθοποιίας, τα οποία ουσιαστικά αφορούν στερεά υπολείμματα από φλοιούς κόκκων βύνης κριθαριού καθώς και μέρη του περικαρπίου και αποτελούν πλούσια πηγή φυτικών ινών, πρωτεϊνών, κυτταρίνης και λιγνίνης. Παράλληλα, τα υπολείμματα από την παρασκευή της μαγιάς έχουν ευεργετικές ιδιότητες σε τομείς, όπως η ανθρώπινη διατροφή, η λήψη ενζύμων (λήψη ινβερτάσης από την μαγιά), η παραγωγή αρωματικών παραγόντων και η παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP, Single-cell Protein) . Τα BSG (Brewer's spent grain, αναλωμένα σιτηρά ή βυθίσματα ζυθοποιίας) προσεγγίζουν το 90% των συνολικών απορριμμάτων παραγωγής ζύθου (Aliyu & Bala, 2011).

Στην συνέχεια, μια μεγάλη ποικιλία αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγεται και στην οινοποίηση/αμπελοκαλλιέργεια. Μίσχοι σταφυλιού, κλαδέματα αμπέλου, λύματα και οινολάσπες είναι μόνο λίγα από αυτά. Ο πυρήνας του σταφυλιού είναι πλούσιος σε αιθανόλη, κιτρικό οξύ, έλαια σταφυλιού, διαιτητικές ίνες, τρυγικά και μηλικά οξέα καθώς και υδροκολλοειδή. Οι σπόροι του σταφυλιού (GSE, Grape Seed) εκχυλίζονται προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την αντιοξειδωτική τους δράση σε συμπληρώματα διατροφής. Σε γενικές γραμμές, τα απόβλητα της οινοποιίας μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές πηγές για την παραλαβή φυσικών αντιοξειδωτικών, που τα τελευταία χρόνια φαίνεται να προτιμώνται από τους καταναλωτές και τις εταιρείες σε σχέση με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά (Arvanitoyannis et al., 2006).



Εικόνα 1.2 Εκχύλιση και χρήση σπόρων σταφυλιού ως συντηρητικό σε φιλέτα ψαριού που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Y. Li et al., 2020)

Βιομηχανία επεξεργασίας σιτηρών :

Το *πίτουρο ρυζιού* είναι υποπροϊόν της βιομηχανίας σίτου. Έχει θεραπευτικές ιδιότητες και είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως καροτενοειδή, βιταμίνη E και πολυφαινόλες. Είναι επίσης πλούσιο σε διαιτητικές ίνες και χρησιμοποιείται ως λειτουργικό συστατικό σε κέικ, ζυμαρικά και παγωτά χωρίς να επηρεάζει την υφή και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά.

Το έλαιο από το *πίτουρο ρυζιού* είναι πηγή ορυζανόλης. Η ορυζανόλη χρησιμεύει για την μείωση της χοληστερόλης στο αίμα και παράλληλα έχει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η γ-ορυζανόλη για την ακρίβεια είναι υπεύθυνη για την μείωση του επιπέδου της χοληστερόλης στο ήπαρ. Σημαντική είναι και η συμβολή της στην θεραπεία της νευρικής ανισορροπίας και των διαταραχών της εμμηνόπαυσης.

Η υψηλή περιεκτικότητα των υποπροϊόντων ρυζιού σε αντιοξειδωτικά βοηθά στην καταπολέμηση της εμφάνισης του διαβήτη και της νόσου του Αλτσχάιμερ καθώς και στην πρόληψη του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, μέσα από έρευνες, οι τοκοτριενόλες

φέρονται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόβλεψη της στεφανιαίας νόσου και στην αντιμετώπιση των ελεύθερων ριζών στα κυτταρικά φιλμ. Το φαινολικό περιεχόμενο του σιταριού, αντίστοιχα, φέρεται να προλαμβάνει τη εκδήλωση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, καθώς ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και αυξάνει την παραγωγή της γλυκοκινάσης στο ήπαρ (Gul et al., 2015).

Βιομηχανία Γάλακτος :

Ο όρος γάλακτος είναι ένα από τα σημαντικότερα υποπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας και περιέχει πολλά ωφέλιμα συστατικά, όπως οι διαλυτές πρωτεΐνες (β-λακτοσφαιρίνη, αλακταλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνη, λακτοφερίνη, λακτουπεροξειδάση κλπ.). Ο όρος γάλακτος είναι ευρέως αποδεκτός ως διατροφικό συστατικό τροφίμων (π.χ. συμπληρώματα ζαχαροπλαστικής, αρτοποιίας) και χρησιμοποιείται συνήθως σε ξηρή μορφή, όπως είναι οι σκόνες πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein powder) που έχουν υψηλή βιολογική αξία και συμβάλλουν στην ημερήσια πρόσληψη πρωτεΐνης (Pereira et al., 2016). Ο όρος γάλακτος είναι πλούσιος σε μεταλλικά στοιχεία (ασβέστιο, φώσφορος) και έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αζωτούχες ενώσεις, όπως είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, η ουρία, η κρεατίνη, η αμμωνία και το ουρικό οξύ (Shershenkov & Suchkova, 2015).

Το *τυρόπηγμα* είναι ακόμα ένα παραπροϊόν που δημιουργείται κατά την πήξη του γάλακτος με προσθήκη πυτιάς ή καλλιέργειας μικροοργανισμών. Έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτική λειτουργική τροφή. Τα προβιοτικά ορίζονται ως τα ζωντανά μικροβιακά συστατικά τροφίμων που έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, βελτιώνοντας κυρίως τη μικροβιακή ισορροπία του εντέρου. Συνδέονται με τα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και περιλαμβάνουν μέλη του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacteri*. Τα προβιοτικά λειτουργικά τρόφιμα είναι χρήσιμα στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας όπως είναι η αρτηριακή πίεση, η ελλειμματική απορρόφηση ασβεστίου, η δυσανεξία στην λακτόζη, η διάρροια, η φλεγμονή και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Homayouni et al., 2012).

Βιομηχανία Οπωροκηπευτικών :

Είναι γεγονός ότι από τις βιομηχανίες οπωροκηπευτικών, απορρίπτονται ετησίως τεράστιες ποσότητες υπολειμμάτων, όπως φλούδες, πολτοί, σπόροι που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο έπακρο για την παραλαβή λειτουργικών συστατικών και να μην ρυπαίνουν το περιβάλλον. Τα υπολείμματα αυτά, που χαρακτηρίζονται ως μη βρώσιμο μέρος, αποτελούν το 25 με 30% των συνολικών υπολειμμάτων της βιομηχανίας οπωροκηπευτικών και η μη ανακύκλωση τους είναι ικανή να επιφέρει μεγάλες οικονομικές απώλειες (Ajila et al., 2010).

Τα μη επεξεργασμένα υλικά που προκύπτουν από τις βιομηχανίες αυτές αποτελούν πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων και συμβάλλουν στην δημιουργία διατροφοδραστικών συστατικών (nutraceuticals) και αρκετών λειτουργικών τροφίμων. Έτσι, η κατανάλωση τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά βοηθά στην πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες και έχουν γενικότερα, πολλά οφέλη για την υγεία (Walía, 2011).

Σε παγκόσμια κλίμακα, έχει εκτιμηθεί μετά από έρευνες ότι παράγονται πάνω από 800.000 τόνοι αποβλήτων, σε ετήσια βάση, γενικά σε όλες τις βιομηχανίες τροφίμων (Ayala-Zavala et al., 2010). Σήμερα, ένα μεγάλο μέρος των γεωργικών αποβλήτων διαχειρίζεται με δαπανηρές τεχνικές (παραγωγή κομπόστας, τάισμα ζώων, λίπασμα), και αυτό γιατί γίνονται μεγάλες επενδύσεις σε εξοπλισμούς που αφορούν την ξήρανση, την αποθήκευση και την μεταφορά. Χρήζει, επομένως, η εύρεση πρακτικών έτσι ώστε τα αγρο-παραπροϊόντα να γίνουν βρώσιμα και λειτουργικά με όσο το δυνατόν περιβαλλοντικό και οικονομικό τρόπο (Dulf et al., 2016).

Πίνακας 1.3 : Ποσότητες παραπροϊόντων που παράγονται από την βιομηχανία επεξεργασίας οπωροκηπευτικών (Selvamuthukumaran & Shi, 2017)

Οπωροκηπευτικά	Παραπροϊόντα	Βρώσιμο μέρος	Βιολογικές Δράσεις	Πηγές
Μήλο	11% (πολτός και πυρήνας σπόρων)	89%	Ιξωδοελαστικές ιδιότητες (βελτίωση υφής τροφίμου) Φυτικές ίνες Πολυφαινόλες (συμβάλλουν στην υγεία)	(Ayala-Zavala et al., 2010)
Αγκινάρα	Περίπου 60% (εξωτερικά βράκτια, δοχεία και μίσχοι)	40%	Πλούσια σε φυτικές ίνες, φαινολικές ενώσεις και μέταλλα (φαρμακευτικές ιδιότητες)	(Llorach et al., 2002)
Σπαράγγι	Έως 40%–50% (δόρυ)	50%–60%	Πλούσιο σε βιταμίνες A,C,E,K (ενίσχυση ανοσοποιητικού) Υψηλή περιεκτικότητα σε ασπαραγίνη (αποφυγή λοιμώξεων του ουροποιητικού)	(Rodríguez et al., 2006)
Μπανάνα	Έως 30% (φλούδα)	70%	Πλούσια σε Κάλιο και χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι	(Schieber et al., 2001)

			(καταπολέμηση αρτηριακής πίεσης)	
Καρότο	30%–40% (στέμφυλα)	60%–70%	Πλούσιο σε καροτενοειδή (πρόληψη καρκίνου, ιού HIV, καταρράκτη)	(Schieber et al., 2001)
Πορτοκάλι	66% (φλούδα)	44%	Πλούσιο σε διαιτητικές ίνες (χρήσιμο για προϊόντα που απαιτούν μεγάλη συγκράτηση νερού ή ελαίου)	(B. B. Li et al., 2006)
Παπάγια	6,5% (σπόροι), 8,5% (φλούδες) και 32,1% (άχρηστος πολτός)	53%	Πλούσια σε αντιοξειδωτικά (μείωση κινδύνου εμφάνισης καρκίνου)	(Ayala-Zavala et al., 2010b)
Φρούτα του πάθους	>75% (φλούδα και σπόροι)	25%	Πλούσια σε φυτικές ίνες και αντιοξειδωτικά (μείωση κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και διαβήτη)	(Schieber et al., 2001)
Ανανάς	9,1% (πυρήνας), 13,5% (φλούδες), 14,9% (πάνω) και 14,5% (πολτός)	48%	β-καροτίνη (μείωση κινδύνου εμφάνισης άσθματος)	(Ayala-Zavala et al., 2010)

1.2 Παραπροϊόντα απόσταξης αρωματικών φυτών

Τα αρωματικά φυτά, τα τελευταία χρόνια, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εξέτασης για την παραλαβή φυσικών προϊόντων, μιας και η ζήτηση τους αυξάνεται ραγδαία εις βάρος των χημικών πρόσθετων που δημιουργούν αμφιβολίες στους καταναλωτές όσον αφορά την τοξικότητα και την εξαγωγή διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα. Η πλειοψηφία των αρωματικών φυτών βρίσκεται στην περιοχή της Μεσογείου, στην οποία κατά την αρχαιότητα συλλέγανε τα αρωματικά φυτά άγρια και τα χρησιμοποιούσαν για την θεραπεία ασθενειών τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Πάνω από 1.200 είδη αρωματικών φυτών με θεραπευτικές ιδιότητες βρίσκονται σήμερα στις Μεσογειακές χώρες, τα οποία ανήκουν σε οικογένειες φυτών (π.χ. Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae) που είναι γνωστές για την ευρεία τους χρήση σε βιομηχανίες που αφορούν κλάδους όπως η φαρμακευτική, η αρωματοποιία και η βιομηχανία τροφίμων.

Τα αρωματικά φυτά περιέχουν συμπυκνωμένες ενώσεις που ονομάζονται αιθέρια έλαια και μπορούν να παραληφθούν από διαφορετικά σημεία του φυτού όπως οι σπόροι, τα κλαδιά, ο φλοιός και τα φύλλα. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να εξαχθούν μέσω τεχνικών απόσταξης νερού, εκχύλισης υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (Supercritical Fluid Extraction, SFE) ή με την χρήση οργανικών διαλυτών. Συνήθως προτιμώνται οι τεχνικές απόσταξης νερού (υδροαπόσταξη και ατμοαπόσταξη) από τις οποίες προκύπτουν και οι μεγαλύτερες ποσότητες παραπροϊόντων.

Η απόσταξη των αιθέριων ελαίων έχει μικρά ποσοστά σε απόδοση (4-5 %) γεγονός το οποίο παραπέμπει σε μεγάλες ποσότητες βιομάζας και υπολειμμάτων στα αποστακτήρια. Αυτά τα υπολείμματα μπορούν να επεξεργασθούν περαιτέρω και με την χρήση ειδικών μεθόδων ανάκτησης, να αποτελέσουν πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων. Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την απόσταξη των αρωματικών φυτών είναι φιλικά προς το περιβάλλον, καθώς η ουδετερότητα τους ως προς τον άνθρακα δεν τους επιτρέπει να απελευθερώνουν διοξείδιο του άνθρακα στην ατμόσφαιρα, ενώ παράλληλα μπορούν να αξιοποιηθούν σε θέματα που αφορούν την γεωργία όπως είναι οι τροποποιήσεις εδάφους, οι ζωοτροφές, η παραλαβή βιοενεργών φυτοχημικών καθώς και το λίπασμα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η σύνθεση των παραπροϊόντων επηρεάζεται από

πτυχές όπως η γενετική του ίδιου του αρωματικού φυτού, οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την καλλιέργεια του, καθώς και η τεχνική της απόσταξης των ελαίων (π.χ. η ατμοαπόσταξη είναι πιο ήπια διαδικασία σε σχέση με την υδροαπόσταξη) (de Elguea-Culebras et al., 2022) (Christaki et al., 2012) (Greff et al., 2021).

1.3 Το αρωματικό φυτό *Sambucus nigra* L.



Εικόνα 1.3 Το αρωματικό φυτό *Sambucus nigra* L. (Elder Trees | LoveToKnow)

Το αρωματικό φυτό *Sambucus nigra* L. (σαμπούκος ή κουφοξυλιά), το οποίο μελετάται στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ανήκει στην οικογένεια φυτών Adoxaceae. Έχει μεγάλη προϊστορία ως θεραπευτικό μέσο για ιογενείς λοιμώξεις και θεωρείται ένα από τα φυτά με τις ισχυρότερες φαρμακευτικές δράσεις στον κόσμο. Αναπτύσσεται σε όλη την Ευρώπη, τη βόρεια Αφρική, τη δυτική και κεντρική Ασία και τη Βόρεια Αμερική και η χημική του σύσταση επηρεάζεται από παράγοντες όπως το κλίμα και ο τρόπος της γεωργίας. Το εκχύλισμα από το λουλούδι του είναι πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά και κυρίως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Τα περισσότερα προϊόντα που προκύπτουν από τους καρπούς του, περιέχουν ανθοκυανίνες, που είναι γνωστές για τις αντιϊκές και αντιβακτηριακές τους δράσεις. Εκτός από ανθοκυανίνες στους καρπούς του φυτού εντοπίζονται και σάκχαρα, με πρωταγωνιστές την γλυκόζη και την φρουκτόζη.

Σχετικά με τις εφαρμογές του, υπάρχουν ποικίλοι τρόποι χρήσης του στην καθημερινότητα και ιδιαίτερα στην διατροφή. Τα εκχυλίσματα από τους καρπούς του χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χυμού, ζελέ ή κρασιού. Το τσάι από τους

καρπούς του είναι θεραπευτικό ενάντια σε κρυολογήματα και συμπτώματα όπως ο υψηλός πυρετός, ενώ τα εκχυλίσματα από το φυτό έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, υψηλή αντοχή στην υπεριώδη ακτινοβολία και γενικότερα υψηλή βιολογική αξία που μπορεί να φανεί χρήσιμη σε διάφορους τομείς, όπως η βιομηχανία συμπληρωμάτων διατροφής, η βιομηχανία καλλυντικών, κ.ά.. Τα εκχυλίσματα του *S. nigra* σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλυκόζης στον άνθρωπο και έχουν επίδραση στην μείωση της χοληστερόλης και των λιπιδίων, παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν στην απώλεια βάρους. Γνωστή είναι και η εμφάνιση του φυτού στην σειρά ταινιών “ Harry Potter ” κατά την οποία η κουφοξυλιά χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πιο σπάνιου και ισχυρού ραβδιού στο κόσμο της μαγείας. (Porter & Bode, 2017) (Bartak et al., 2020).

1.4 Βιοδραστικές ενώσεις και φυσικές πηγές τους

Βιοδραστικές ενώσεις, είναι χημικές ενώσεις που παράγονται από ζωντανούς μικροοργανισμούς και έχουν ιδιότητες που μπορούν να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να έχουν φαρμακευτικές, θεραπευτικές, αντιμικροβιακές και άλλες ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία και ευεξία. Η γενική ταξινόμηση των βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να γίνει βάσει διαφόρων κριτηρίων, όπως η χημική δομή, η βιολογική δραστηριότητα και η προέλευση. Οι πιο κοινές μέθοδοι ταξινόμησης βασίζονται στην χημική δομή και έτσι χωρίζονται σε : φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, πολυφαινόλες, αμινοξέα, πεπτίδια, τερπένια, αλκαλοειδή, ταννίνες, λιπαρά οξέα, λιπίδια και άλλα. Η ταξινόμηση τους με γνώμονα την χημική δομή μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των συσχετίσεων μεταξύ της δομής και της βιολογικής δράσης καθώς και στην ανάπτυξη νέων ενώσεων με επιθυμητές βιολογικές ιδιότητες (Azmir et al., 2013). Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να παραληφθούν από τα φυσικά υποστρώματα με διάφορες μεθόδους όπως η εκχύλιση, η διάλυση και η απόσταξη και να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή προϊόντων, όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα, τα συμπληρώματα διατροφής και τα καλλυντικά. Η χρήση τους πρέπει να γίνεται με προσοχή και κατόπιν συνεννόησης με ειδικό, καθώς μπορεί να προκύψουν

δυσμενείς παρενέργειες από την αλληλεπίδραση τους με άλλα φάρμακα ή προϊόντα (Smith, 2003). Πηγή βιοδραστικών ενώσεων αποτελούν οι φυτικοί ιστοί, οι μικροοργανισμοί καθώς και τα φύκη και μικροφύκη.

Φυτικοί Ιστοί :

Οι βιοδραστικές ενώσεις από φυτικούς ιστούς, που έχουν θετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό, βρίσκονται σε φυτικά εκχυλίσματα, φυτικά έλαια και άλλες φυτικές προϊόντα,. Από τους φυτικούς ιστούς μπορεί να παραληφθεί μια πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων και φυτοχημικών, όπως φυτοστερόλες, φαινολικά οξέα και αμινοξέα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να ανακτηθούν από διάφορα μέρη του φυτού όπως φύλλα, φλοιός, ρίζες, άνθη, καρποί και σπόροι. Οι βιοδραστικές ενώσεις των φυτικών ιστών μπορούν να ταξινομηθούν σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες, είναι χημικές ουσίες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φυτού και σε αυτούς υπάγονται ενώσεις όπως τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες και τα αμινοξέα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, παράγονται συνήθως μετά το τέλος του σταδίου της ανάπτυξης του φυτού και συντελούν στην αποτελεσματική αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον του, δηλαδή στην σχέση του με τους μικροοργανισμούς , τα έντομα, τα φυτοφάγα ζώα και τα γειτονικά φυτά. Η βιοσύνθεση τους εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από το είδος του φυτού και το στάδιο ανάπτυξης του (Chandran et al., 2020). Οι βιοδραστικές ενώσεις από φυτικούς ιστούς έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες και την πιθανή χρήση τους στην φαρμακευτική βιομηχανία. Πολλά φυτικά εκχυλίσματα και φυτικά συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί για αιώνες σε παραδοσιακές θεραπείες και η έρευνα σε αυτόν τον τομέα συνεχίζεται καθημερινά, με σκοπό την ανακάλυψη και τον χαρακτηρισμό όλο και περισσότερων βιοδραστικών ενώσεων.

Μικροοργανισμοί :

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να παραληφθούν ως προϊόντα, εκτός από φυτικούς ιστούς και από μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους. Παράγονται από μια μικρή ομάδα μικροοργανισμών, όπως οι μύκητες και τα βακτήρια.

Ορισμένα παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων που παράγονται από μύκητες περιλαμβάνουν τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και κεφαλοσπορίνες , το αντιμυκητικό αμφοτερικίνη, το αντικαρκινικό πακλιταξέλη και τη γλουταθειόνη. Τα πιο γνωστά γένη μυκήτων που ευθύνονται για την παραγωγή αυτών των ενώσεων είναι τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *Streptomyces*. Σε γενικές γραμμές, η έρευνα στον τομέα των βιοδραστικών ενώσεων από μύκητες είναι σημαντική για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και την παρασκευή λειτουργικών προϊόντων, καθώς και για την ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Agora et al., 2004) (Keller & Turner, 2012).

Δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται ακόμη και από τα βακτήρια κατά την διάρκεια της μεταβολικής διαδικασίας τους. Ορισμένα παραδείγματα περιλαμβάνουν τα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη και βανκομυκίνη, τα προβιοτικά γαλακτοολιγοσακχαρίτες και φρουκτοολιγοσακχαρίτες , καθώς και η ταυρίνη και η κολλαγενάση που είναι ενζυμικές ενώσεις που παράγονται από τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Clostridium histolyticum*, αντίστοιχα (Unden et al., 2016).

Φύκη :

Τα φύκη και μικροφύκη είναι μονοκύτταρα φυτά που συναντώνται σε υδάτινο περιβάλλον και την τελευταία δεκαετία έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, καθώς φαίνεται να έχουν δυνατότητες να μετατραπούν σε μια σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων, χάρη στην φωτοσύνθεση τους. Ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες φυκιών, τα μπλε-πράσινα φύκια (κυανοβακτήρια), τα διάτομα (*Bacillariophyta*) και τα δινομαστιγωτά (*Dinophyceae*). Τα εκχυλίσματα από φύκη αποτελούν πηγή διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων όπως αντιοξειδωτικά (πολυφαινόλες, τοκοφερόλες βιταμίνη E, βιταμίνη C, αμινοξέα) και χρωστικές ουσίες, όπως καροτενοειδή (καροτίνη ξανθοφύλλη), γλωροφύλλες και φυκοβιλίνες (φυκοκυανίνη,

φυκοερυθρίνη). Μελέτες αποκαλύπτουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον 50.000 είδη μικροφυκών, ωστόσο ένα μικρό μόνο μέρος από αυτά έχει μελετηθεί και αξιοποιηθεί. Τα εκχυλίσματα από φύκη είναι χρήσιμα για εφαρμογές σε διάφορους αναπτυσσόμενους κλάδους της γεωργίας (βιοδιεγέρτες, βιορυθμιστές, πρόσθετα ζωοτροφών) καθώς και στη φαρμακευτική βιομηχανία (Michalak & Chojnacka, 2015) (Plaza et al., 2010) (Ameen et al., 2021).

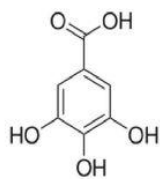
2. Φαινολικές ενώσεις

2.1 Φαινολικές ενώσεις στους φυτικούς ιστούς

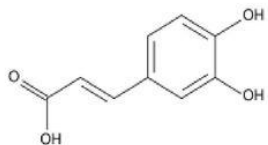
Φαινολικές ενώσεις ονομάζονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα φυτά, όσο αυτά αναπτύσσονται, ακόμα και σε στρεσογόνες καταστάσεις όπως η λοίμωξη, η υπεριώδης ακτινοβολία και ο τραυματισμός. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται παντού στα φυτά και είναι μια πολύ ιδιαίτερη ομάδα φυτοχημικών που παράγονται από τις μεταβολικές οδούς της τυροσίνης και φαινυλαλανίνης. Στα φαινολικά των φυτών υπάρχουν, τα φαινολικά οξέα (παράγωγα βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος), κουμαρίνες, φλαβονοειδή, στιλβένια, υδρολυμένες και συμπυκνωμένες τανίνες, λιγνάνες και λιγνίνες. Οι δράσεις των φαινολικών ενώσεων στα φυτά είναι κυρίως, αντιτροφοδοτικές, αντιοξειδωτικές, προστατευτικές ως προς το υπεριώδες φως, ελκύουν τους επικονιαστές και δρουν ως φυτοαλεξίνες. Στον χώρο των τροφίμων, οι φαινολικές ουσίες συμβάλλουν στην γεύση, τη στυπτικότητα, το χρώμα, την οσμή και την σταθερότητα των τροφίμων όσον αφορά την οξείδωση και το μικροβιακό φορτίο των προϊόντων. Το γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις συμβάλλουν στην προστασία της ανθρώπινης υγείας, καθιστά τα εκχυλίσματα από φυτικούς ιστούς σημαντικό αντικείμενο έρευνας για παραγωγούς και μεταποιητές (Umar Lule et al., 2005).

Πίνακας 2.1: Ανασκόπηση φαινολικών ενώσεων και των δομών τους.

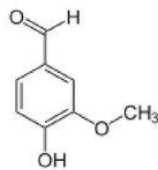
Φαινολικά	Δομή
Απλές φαινόλες	C6
Βενζοϊκά οξέα	C6-C1
Φαινυλοξικά οξέα	C6-C2
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα Φαινυλοπροπένια Κουμαρίνες, Χρωμόνες	C6-C3
Ναφθοκινόνες	C6-C4
Φλαβονοειδή: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόνες, ανθοκυάνες, φλαβανόλες, χαλκόνες	C6-C3-C6
Λιγνάνες	(C6-C3) _n
Διφλαβονοειδή	(C6-C3-C6) ₂
Λιγνίνες	(C6-C3) _n
Πολυμερή φλαβονοειδή	(C6-C3-C6) _n



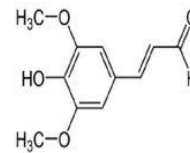
Γαλλικό οξύ



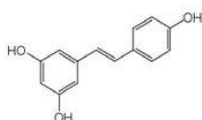
Καφεϊκό οξύ



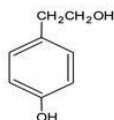
Βανιλίνη



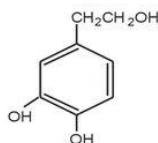
Σιναπαλδεΰδη



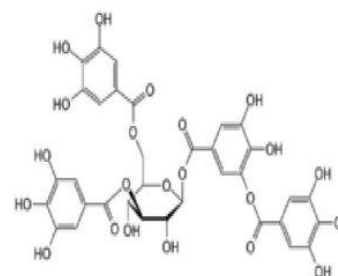
trans-ρεσβερατρόλη



Τυροσόλη



Υδροξυτυροσόλη



Υδρολυόμενη ταννίνη

Εικόνα 2.1 : Είδη Φαινολικών ενώσεων (<https://docplayer.gr/5000601-Fainolikes-enoseis-oi-fainolikes-enoseis-apoteloy-n-mia-apo-tis-kyries-omades-deyterogenon-metavoliton-apoteloyntai-apo-enoseis-me-megali-poikilia.html>)

Η κατανομή των φαινολικών ουσιών στα φυτά δεν είναι ομοιόμορφη σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο. Τα φαινολικά που δεν έχουν διαλυθεί από την έκκριση των φυτών περιέχονται στα κυτταρικά τοιχώματα, ενώ τα διαλυτά φαινολικά βρίσκονται εντός των φυτικών κυττάρων, στα κενοτόπια. Στους ιστούς, τα εξωτερικά στρώματα των φυτών περιέχουν φαινολικά συστατικά αρκετά περισσότερα από εκείνα που βρίσκονται στα εσωτερικά μέρη των φυτών. Στο κυτταρικό τοίχωμα συναντώνται φαινολικές ουσίες, όπως λιγνίνες και υδροξυκινναμωμικά οξέα, οι οποίες συνδέονται με διάφορα κυτταρικά συστατικά. Η μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών εξαρτάται και στηρίζεται από τις ενώσεις αυτές, που παίζουν ρόλο ρύθμισης στην ανάπτυξη και τη μορφογένεση των φυτών, καθώς και στην κυτταρική απόκριση στο στρες και τα παθογόνα. Τα φερουλικά και p-κουμαρικά οξέα, τα οποία είναι μεταξύ των κύριων φαινολικών οξέων, εστεροποιούνται σε πηκτίνες και αραβινοξυλάνες ή διασυνδέονται με τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος και αποκτούν

διμερής δομή . Σύμφωνα με ενδείξεις, αυτοί οι διασταυρούμενοι δεσμοί είναι ικανοί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην συγκόλληση κυττάρου-κυττάρου, να βοηθήσουν στον σχηματισμό λιγνινών καθώς και στην θερμική σταθερότητα της υφής τροφών που προέρχονται από φυτικά προϊόντα.

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων σε φυτικά υποστρώματα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες αναλυτικές τεχνικές. Οι αναλυτικές τεχνικές αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τεχνικών όπου στοχεύουν : α) στον προσδιορισμό συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ουσιών, β) στην ποσοτικοποίηση μεμονωμένου φαινολικού ή μια συγκεκριμένης ομάδας ή κατηγορίας φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη, πριν την ανάλυση των ενώσεων, η εφαρμογή εκχύλισης και παραλαβής τους από τα υπό εξέταση φυτικά υποστρώματα (Naczk Marian et al., 2004).

2.2 Τεχνικές και Μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων

Πολλές είναι οι τεχνικές και οι μέθοδοι προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων, με ευρεία χρήση στην βιομηχανία τροφίμων. Μία από αυτές και ίσως η πιο σημαντική, είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu, η οποία χρησιμοποιείται για την εύρεση της συνολικής φαινολικής περιεκτικότητας σε ένα δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί πως, η πολυπλοκότητα της δομής των φαινολικών ενώσεων, καθιστά αρκετά δύσκολη την ανάλυση τους και για αυτόν τον λόγο έχουν αναπτυχθεί πιο ευαίσθητες τεχνικές όπως είναι η υγρή χρωματογραφία και φασματοφωτομετρία μάζας (LC-MS), που διευκολύνουν την ανίχνευση των βιοδραστικών ενώσεων.

Πίνακας 2.2 Τεχνικές και μέθοδοι ανάλυσης φαινολικών ενώσεων

Αναλυτικές τεχνικές	Φαινολικά	Υπόστρωμα	Αναφορές
Φασματοσκοπία NMR	Φλαβονοειδή	Εκχύλισμα ρίγανης	(Χαρισιάδης, 2011)
Εκχύλιση από υπερήχους (UAE)	Πολυφαινόλες	Σκόνη χαρουπιού	(Χρίστου, 2021)
Folin-Ciocalteu	Γαλλικό οξύ (GAE)	Φλοιός ροδιού	(Καδερίδη, 2014)
Μέθοδος χλωριούχου αργυλίου (AlCl ₃)	Φλαβονοειδή	Συστατικά σκόρδου	(Σανταρόσσα, 2018)

2.3 Αντιοξειδωτική δράση στα τρόφιμα

Ως αντιοξειδωτική ουσία, ορίζεται κάθε ουσία που σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει την ικανότητα να αναστείλλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση ενός υποστρώματος. Η αναστολή ή καθυστέρηση της οξείδωσης μορίων επιτυγχάνεται με παρέμβαση των αντιοξειδωτικών, τα οποία αναστέλλουν την έναρξη ή την διάδοση των οξειδωτικών αλυσιδωτών αντιδράσεων και εμφανίζονται είτε ως ενδογενείς ενώσεις, που έχουν παραχθεί από τον οργανισμό ως μέρος της είτε ως εξωγενείς ενώσεις που προσλήφθηκαν από τη διατροφή.

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα συνθετικά και στα φυσικά. Οι φυσικές πρώτες ύλες μεταβλητής σύνθεσης παράγουν τα φυσικά αντιοξειδωτικά, αντίθετα τα συνθετικά αντιοξειδωτικά διατίθενται από τις καθαρές χημικές ουσίες σταθερής σύστασης. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν στα τρόφιμα όπως και σε άλλα βιολογικά υλικά, προσελκύνοντας το ενδιαφέρον των ερευνητών αφού προσδίδουν ασφάλεια και εμφανίζουν θεραπευτικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Ορισμένα χαρακτηριστικά των τροφίμων, όπως είναι η γεύση και η θρεπτική τους αξία, σχετίζονται άμεσα με τις πολυφαινόλες. Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν αναδείξει την αντιριζική και αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών (Hahidi et al., 2015).

Τα πιο ευρέως διαδεδομένα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι λιπόφιλες τοκοφερόλες και τα πολικότερα εκχυλίσματα δεντρολίβανου και τσαγιού. Φλαβονοειδή και παράγωγα φαινολικού οξέος παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου, όπως και οι κύριες διτερπινικές φαινόλες. Τα φλαβονοειδή φημίζονται για τις αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιγόνες, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες τους ιδιότητες, οι οποίες έχουν θετική επίδραση στην υγεία. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητα συστατικά με ευρεία εφαρμογή σε κλάδους όπως η βιομηχανία τροφίμων, η φαρμακευτική, η ιατρική και η βιομηχανία καλλυντικών (Rocchetti et al., 2022).

2.4 Αντιμικροβιακή δράση φαινολικών ενώσεων

Τα φαινολικά συστατικά αρωματικών φυτών χρησιμοποιούνται συνήθως σε τρόφιμα ως αντιοξειδωτικά. Κάποια όμως δείχνουν και εξίσου σημαντική αντιμικροβιακή δράση, γεγονός το οποίο ελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Για την επίτευξη της σωστής συντήρησης των τροφίμων με φυσικά αντιμικροβιακά συστατικά είναι απαραίτητη η χρήση εμποδίων στην ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών που προκαλούν παθογένειες και αλλοιώσεις. Οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται παραλαμβάνονται από τους φυτικούς ιστούς, είναι κατά κύριο λόγο φαινολικές ενώσεις. Τα τελευταία χρόνια, η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων, κυρίως αιθέριων ελαίων και φαινολικών εκχυλισμάτων, έναντι διαφόρων

μικροοργανισμών έχει ξεκινήσει να μελετάται εκτενώς . Τρεις παράγοντες που είναι σε θέση να προσδιορίσουν τον αντιμικροβιακό μηχανισμό είναι: α) η αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών β) η αποδιοργάνωση της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων γ) η αναστολή της κυτταρικής αναπνοής. Γενικότερα τα Gram-αρνητικά βακτήρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα Gram-θετικά λόγω της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης και των αντιμικροβιακών αντλιών, που απωθούν τις αντιμικροβιακές ουσίες έξω από το κύτταρο. Μάλιστα είναι γνωστό ότι το π-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ, αυξάνουν την διαπερατότητα της μεμβράνης και διαταράσσουν την λειτουργία των ATP-άσων, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, καθώς και τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Παράλληλα, κυριαρχεί η άποψη ότι οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, οδηγώντας σε αύξηση της διαπερατότητας της ή αλλαγές στην λιπιδική και φωσφολιπιδική σύσταση των μικροοργανισμών. Όταν συνδυάζονται με άλλα φυσικά αντιμικροβιακά, για παράδειγμα τη νισίνη ή συνδυάζοντας τα με διαφορετικά εκχυλίσματα φυτών αυξάνεται η αντιμικροβιακή δράση τους. Η αντιμικροβιακή δράση επηρεάζεται, επίσης, από το pH και την θερμοκρασία, καθώς και από την μέθοδο συντήρησης (Rocchetti et al., 2022).

3. Μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από φυτικά υποστρώματα

3.1 Γενικές Πληροφορίες

Τα φαινολικά αποτελούν πολύτιμες βιοδραστικές ενώσεις και έτσι, η παραλαβή τους από παραπροϊόντα φυτικών ιστών καθίσταται αναγκαία. Η φύση του δείγματος που επρόκειτο να αναλυθεί, η μέθοδος η οποία θα χρησιμοποιηθεί αλλά και η το είδος των φαινολικών ενώσεων που εξετάζονται είναι μόνο μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την απομόνωση τους. Η πιο γνωστή μεθόδους φυσικού διαχωρισμού ενώσεων, που είναι βασισμένη στη διαφορετική διαλυτότητα τους σε ένα διφασικό σύστημα υγρού-υγρού ή υγρού-στερεού, είναι η εκχύλιση.

Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευρέως διαδιδόμενη κυρίως λόγω, της ευκολίας που προσφέρει η μεθοδολογία της, την ταχύτητα, την ευελιξία και τη δυνατότητα να εφαρμόζεται σε δείγματα τα οποία περιέχουν ίχνη ή μεγάλες ποσότητες μιας φαινολικής ένωσης ή μίγματος. Η συνηθέστερη τεχνική εκχύλισης είναι η τεχνική εκχύλισης στερεού-υγρού με διαλύτη. Σε αυτή τη διαδικασία και πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης του φυτικού υλικού στο διαλύτη, παρατηρούνται τα φαινόμενα της διόγκωσης και της ενυδάτωσης. Επίσης παρατηρείται η μεταφορά μάζας των συστατικών με ευαισθησία στην διαλυτότητα, τα οποία προέρχονται από το φυτικό ιστό (Vilkhu et al., 2008).

Οι πιο συνήθεις μέθοδοι εκχύλισης φαινολικών συστατικών είναι εκείνες με χρήση κάθετου ψυκτήρα (Soxhlet), η απλή διαβροχή με διαλύτη (maceration) και η εκχύλιση με υδρατμούς (steam distillation). Η εφαρμογή εναλλακτικών μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης με παρόμοια ή ακόμα και υψηλότερη απόδοση, καθιερώθηκε λόγω της εμφάνισης της ανάγκης για μειωμένη χρήση οργανικών διαλυτών, κυρίως για λόγους ασφαλείας και προστασίας του περιβάλλοντος, καθώς και ελάττωσης του κόστους ανάλυσης. Μερικές από τις τεχνικές αυτές είναι η εκχύλιση με υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE), με μικροκύματα (microwave-assisted extraction, MAE), με υπερκρίσιμα υγρά (supercritical fluid extraction, SFE), η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα (enzyme-assisted extraction, EAE), η εκχύλιση υγρού υπό πίεση (pressurized liquid extraction, PLE), η εκχύλιση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (pulsed-electric field extraction, PEF) κ.ά.

Η επιλογή διαλυτών είναι από τις σημαντικότερες παραμέτρους η οποία επηρεάζει την αποτελεσματικότητα μιας οποιασδήποτε εκχύλισης. Ο σημαντικότερος παράγοντας όμως για την επιλογή του διαλύτη είναι η πολικότητα της ένωσης - στόχου που πρόκειται να εκχυλιστεί ή η πολικότητα της ομάδας ενώσεων. Επιπρόσθετα, σημαντικές παράμετροι στην επιλογή διαλύτη για τη διαδικασία εκχύλισης ενώσεων από κάποιο υπόστρωμα είναι η μοριακή συγγένεια ανάμεσα σε διαλύτη και ένωση, η ικανότητα μεταφορά μάζας των υπό μελέτη ενώσεων από το υπόστρωμα στο διαλύτη, καθώς και η περιβαλλοντική προστασία, η τοξικότητα και το κόστος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.

Μερικά από τα μειονεκτήματα των συμβατικών τεχνικών έναντι των μη συμβατικών τεχνικών είναι οι αρκετά μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης, η πιθανή αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων ενώσεων και η χρήση μεγάλων ποσοτήτων από οργανικούς διαλύτες. Παρόλα αυτά, οι μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, και πιο συγκεκριμένα οι εκχυλίσεις με την χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας, είναι ταχύτερες, αποδοτικότερες και δίνουν την δυνατότητα αυτοματοποίησης της διαδικασίας. (Picó et al., 2013).

3.2 Εκχυλίσεις με την χρήση Τεχνικών Υψηλής Ενέργειας

Σύμφωνα και με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, οι τεχνικές εκχύλισης με χρήση υψηλής ενέργειας έχουν αποκτήσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της ταχύτερης εκχύλισης σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές, καθώς και λόγω της υψηλής αποδόσεως, της εύκολης χρήσης των οργάνων, της δυνατότητας προστασίας θερμοευαίσθητων ενώσεων και χρήσης ασφαλών και αναγνωρισμένων οργανικών διαλυτών (Generally Recognizes As Safe, GRAS). Οι τεχνικές αυτές πλεονεκτούν, καθώς επιτρέπουν τη χρήση νέων καινοτόμων «πράσινων» διαλυτών. Τέτοιοι διαλύτες είναι τα ιονικά υγρά (ionic liquids, ILs) και οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (natural deep eutectic solvents, NADES). Επίσης, όταν ανακτώνται ομάδες βιοδραστικών μορίων υψηλής προστιθέμενης αξίας από φυσικές πηγές, όπως για παράδειγμα οι φαινόλες, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, οι πολυσακχαρίτες, κ.ά., χρησιμοποιούνται αυτές οι τεχνικές αρκετά συχνά και μπορούν να αποτελέσουν μια κερδοφόρα και χρήσιμη εμπορική εναλλακτική λύση, λόγω του ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής, ενισχυτικά χρώματος τροφίμων και πρόσθετα σε ζωοτροφές, λειτουργικά τρόφιμα, συντηρητικά, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά (Rostagno et al., 2003).

3.2.1 Εκχύλιση με Υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)

3.2.1.1 Γενικές πληροφορίες για την εκχύλιση με υπερήχους

Ως υπέρηχος (ultrasound) ορίζεται το μηχανικό κύμα το οποίο έχει συχνότητα μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να αντιληφθεί το ανθρώπινο αυτί (πάνω από 16 kHz). Στις μέρες μας, η χρήση των υπερήχων είναι επιτυχής σε αρκετούς τομείς των σύγχρονων επιστημών, όπως η βιολογία, η ιατρική, η γεωλογία, κ.ά., όπως και σε διαδικασίες ανάμιξης, κρυστάλλωσης, φιλτραρίσματος, ξήρανσης και απαέρωσης. Επίσης, η υψηλή απόδοση της εκχύλισης οργανικών και ανόργανων ενώσεων από στερεά υποστρώματα με τη χρήση υγρών διαλυτών οφείλεται στην ακτινοβολία των υπερήχων, κάνοντας πιο γρήγορη την εκχύλιση και βοηθώντας της ποιότητας των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων

Ο μηχανισμός της εκχύλισης με υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE) είναι βασισμένος στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Όταν συστέλλονται και αποσυμπιέζονται οι φυσαλίδες που παράγονται από τα μόρια του διαλύτη όσο διαδίδεται ένα υπερηχητικό κύμα, εμφανίζεται το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Οι φυσαλίδες που σχηματίζονται αποσταθεροποιούνται όταν φτάσουν σε ένα κρίσιμο μέγεθος, το οποίο επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια των κύκλων των υπερήχων με αποτέλεσμα την διάσπαση τους. Η παραγόμενη ενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη της ισχύς των υπερήχων. Το μέγεθος της σπηλαίωσης επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες ,όπως, η ένταση και η ενέργεια των υπερήχων, μαζί με την τάση ατμών, την επιφανειακή τάση, τη θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύτη. Η διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα του υποστρώματος διευκολύνεται με την διαδικασία της σπηλαίωσης, καθώς κατά την διάσπαση των φυσαλίδων απελευθερώνεται ενέργεια. Συνεπώς, επιτυγχάνεται διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και απελευθέρωση ενώσεων-στόχων από το υπόστρωμα στο διαλύτη της εκχύλισης, επειδή αυξάνεται η επιφάνεια επαφής της υγρής με την στερεά φάση (Picó, Y et al. , 2013).



Εικόνα 3.1: Σύστημα εκχύλισης με χρήση υπερήχων (Ultrasonic Processor, Ultrasonic Dispersion Equipment, Ultrasonic Liquid Emulsifier - Hangzhou Precision, hzpmsonic-en.com)

Η εκχύλιση φαινολικών ουσιών από φυτικούς ιστούς μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια υπερήχων. Η απλότητα και η μικρή διάρκεια της UAE, την καθιστά κατάλληλη για εφαρμογή σε μεγάλες βιομηχανικές κλίμακες, λόγω του υψηλού επιπέδου αυτοματισμού, της απόδοσης της.

Καθώς ο χρόνος που απαιτείται για την διαδικασία είναι μικρός (συνήθως από 10 έως 100 λεπτά), μειώνεται η διασπορά των τοξικών ρύπων, επειδή η κατανάλωση του οργανικού διαλύτη μειώνεται σημαντικά, ενώ το κόστος υποδομών της δεν διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από αυτό των συμβατικών τεχνικών. Συμπερασματικά η εκχύλιση με υπερήχους είναι μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.

Ωστόσο, η UAE έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει σημαντικές αποικοδομήσεις και οξειδώσεις στα υποστρώματα που επρόκειτο να εκχυλιστούν λόγω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, ιδιαίτερα όταν το νερό είναι ο διαλύτης της εκχύλισης. Η συσσώρευση των ελευθέρων ριζών πάνω στις φυσαλίδες σπηλαίωσης, είναι ικανή να προκαλέσει αποικοδόμηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων, και έχει ως αποτέλεσμα την εκκίνηση αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης καθώς και υποβάθμιση της ποιότητας του υποστρώματος. Το χρώμα των τροφίμων επηρεάζεται μερικές φορές από την εκχύλιση με υπερήχους όπως και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Επίσης, προκαλείται οξείδωση με παραγωγή πτητικών ενώσεων, που δημιουργούν οσμών και γεύσεων που δεν είναι ευχάριστες, ιδιαίτερα σε τρόφιμα με υψηλές ποσότητες λιπιδίων (Altemimi et al., 2016).

3.2.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με υπερήχους

Η διαδικασία της εκχύλισης με υπερήχους επηρεάζεται από έναν αριθμό παραμέτρων οι οποίες πρέπει να μελετηθούν προσεκτικά. Η συχνότητα, η ισχύς των υπερήχων, η επακόλουθη ένταση και η παλμική ακολουθία υπερήχων είναι παράμετροι που έχουν άμεση συσχέτιση τις διαφορετικές οργανολογίες υπερήχων. Η συχνότητα επιδρά στο μέγεθος των φυσαλίδων σπηλαίωσης αλλά και στην αντίσταση μεταφοράς μάζας. Κατά τη διάρκεια της ταχείας αύξησης των μεταβολών στο δείγμα, λόγω της ισχύς των υπερήχων, παρατηρείται βελτίωση της συχνότητας, η οποία οδηγείται ως προς την ελάχιστη απαιτούμενη ισχύ με στόχο τα καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, η διαδικασία επηρεάζεται από τις προδιαγραφές του αντιδραστήρα που λαμβάνει χώρα η εκχύλιση, όπως και από το σχήμα και τα χαρακτηριστικά του αισθητήρα των υπερήχων.

Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εκχύλιση με υπερήχους είναι : α) η θερμοκρασία, β) η αναλογία διαλύτη/υποστρώματος και γ) χρόνος εκχύλισης.

α) Η θερμοκρασία έχει σημαντική επιρροή στην διαδικασία της εκχύλισης. Σε περιβάλλον θερμοκρασιών άνω των 40-50 °C υπάρχει μεγάλη περίπτωση να προκληθεί

αποσύνθεση της δομής των βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο η υψηλή θερμοκρασία συνεισφέρει στην αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων, αλλά δεν πρέπει να ξεπερνά τους 40-50°C.

β) Με αύξηση του χρόνου εκχύλισης, παρατηρείται και αύξηση στην παραλαβή των βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, εκχυλίσεις με υψηλή ενέργεια υπερήχων δεν χρειάζονται μεγάλη διάρκεια. Η απόδοση του χρόνου εκχυλίσεως εξαρτάται και από το συμμετέχων υπόστρωμα.

γ) Η αναλογία διαλύτη/υποστρώματος επηρεάζει επίσης την απόδοση της εκχύλισης. Σε περιπτώσεις υψηλής αναλογίας διαλύτη/υποστρώματος παρατηρείται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής μεταξύ στερεής και υγρή φάσης και άρα αύξηση της διαλυτότητας του υποστρώματος (Lavilla, I. et al. ,2017).

3.2.1.3 Πλεονεκτήματα της εκχύλισης με υπερήχους

Η εκχύλιση με τη χρήση συσκευής υπερήχων αποτελεί μια πρωτοποριακή μέθοδο και συνιστά θεμέλιο για την αναζήτηση και ανακάλυψη ακόμα πιο αποδοτικών εκχυλίσεων στο άμεσο μέλλον. Η συγκεκριμένη τεχνική χαρακτηρίζεται για τον περιβαλλοντικό της χαρακτήρα (μείωση τοξικών αποβλήτων), την μικρή διάρκεια της συγκριτικά με άλλες τεχνικές καθώς και το χαμηλό κόστος ανάλυσης (δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών). Παράλληλα, προτιμάται από τους επιστήμονες για την αυτοματισμό της και την ευκολία της στην χρήση (Vilkhu, K. et al. ,2008).

Πίνακας 3.1 : Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων από τις εκχυλίσεις υπερήχων (ultrasound-assisted extraction,UAE)

Εκχυλιζόμενα υποστρώματα	Τεχνική εκχύλισης υψηλής ενέργειας	Ενώσεις που εκχυλίστηκαν	Πηγές
Ξηρά παραπροϊόντα ρίγανης	UAE	Φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες.	(Μυλωνάς,Μπαρδούση, 2023)
Φλοιός στέμφυλων (Παραπροϊόντα οίνου)	UAE	Ανθοκυανίνες, φλαβονόλες και φαινολικά οξέα	(Δρεβελέγκα, 2019)
Γιγάρτα (απόβλητα οίνου)	UAE	Ταννίνες	(Τσιβίκη, 2019)
Βύνη ζυθοβιομηχανίας	UAE	Φλαβονειδή	(Σκαλτσάς, 2022)
Απόβλητα οينوποίησης/οينوποιητικά παραπροϊόντα	UAE	Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή	(Μαυρίδου, 2018)
Παραπροϊόντα δεντρολίβανου	UAE	Φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, φαινολικά διτερπένια	(Ζάχος Κ., 2020)

Σκοπός της μελέτης

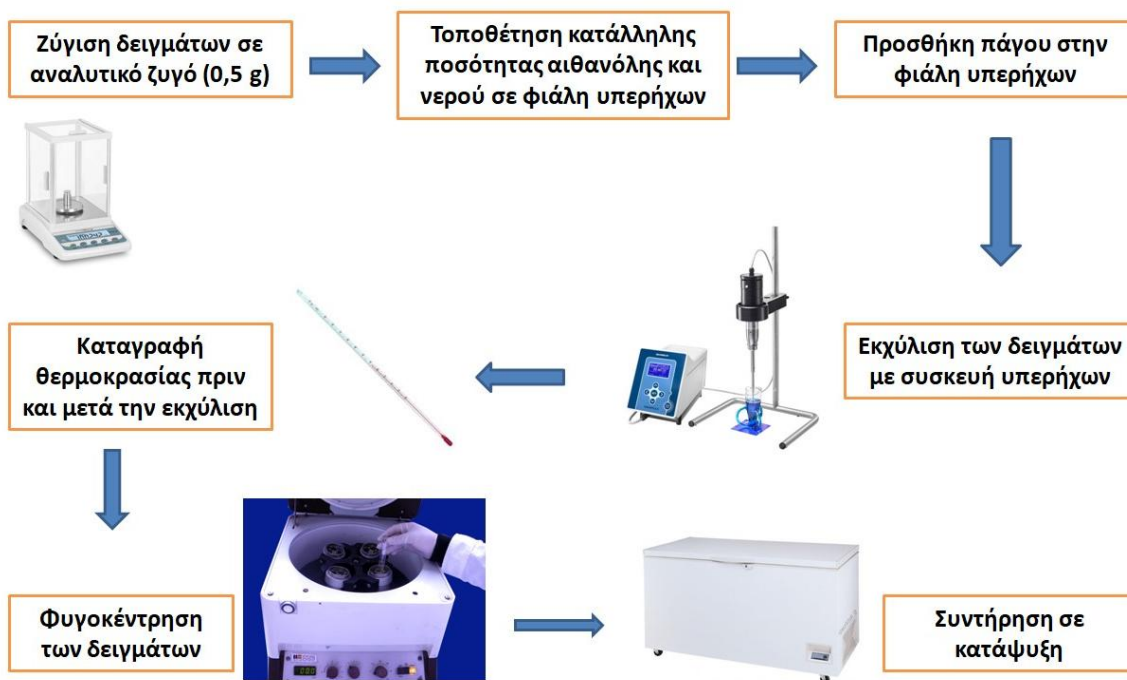
Η παρουσία πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη του φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων παραπροϊόντων και ξηρής δρόγης του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* L. (σαμπούκος) και συγκεκριμένα την βελτιστοποίηση της παραλαβής φαινολικών ουσιών, με την χρήση τεχνικής εκχύλισης υψηλής ενέργειας που στηρίζεται σε υπερήχους (ultrasound-assisted extraction, UAE) και μοντέλων πειραματικού σχεδιασμού. Για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης, εφαρμόστηκε πειραματικός σχεδιασμός σύμφωνα με το μοντέλο Box-Behnken, που στηρίχθηκε σε τέσσερις υπό βελτιστοποίηση παραμέτρους : α) την περιεκτικότητα της αιθανόλης (% v/v) στο διαλύτη της εκχύλισης, β) τον χρόνο της εκχύλισης (min), γ) την ενέργεια των υπερήχων (%) και δ) την αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g). Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού, πρόκειται να αναδειχθούν οι κρίσιμοι παράγοντες εκχύλισης και οι βέλτιστες συνθήκες για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων, που θα προσδιοριστούν με την φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια, θα ακολουθήσει συγκριτική μελέτη του φαινολικού περιεχομένου, της αντιοξειδωτικής και της αντιριζικής δράσης εκχυλισμάτων δρόγης και παραπροϊόντων σαμπούκου, με σκοπό την μελλοντική εφαρμογή τους ως αντιμικροβιακοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες σε προϊόντα κρεατοσκευασμάτων.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Προετοιμασία Δείγματος

Για την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ξηρή δρόγη και παραπροϊόντα από το αρωματικό φυτό *Sambucus nigra* L., τα οποία παραχωρήθηκαν ευγενικά από την εταιρία «Natural Food Additives G.P.» (<https://www.natural-foodadditives.com/>) (Αθήνα, Ελλάδα). Τα δείγματα στερεών παραπροϊόντων που εξετάστηκαν προέκυψαν ως βιομάζα ύστερα από την ατμοαπόσταξη του αρωματικού φυτού για την παραλαβή αιθέριων ελαίων. Τόσο η δρόγη όσο και τα παραπροϊόντα σαμπούκου παραλήφθηκαν σε ξηρή μορφή. Στη συνέχεια, τα δείγματα συντηρήθηκαν σε ψυγείο μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

4.2 Εκχύλιση με Υπερήχους



Εικόνα 4.1 Πειραματική πορεία εκχυλίσεων ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων του αρωματικού φυτού *S.nigra* με συσκευή υπερήχων

Για την διεξαγωγή της εκχυλίσεως με υπερήχους, χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων Sonoplus HD 4400 (Bandelin Sonoplus, Berlin, Germany) με μέγιστη

ονομαστική ενέργεια 400 W. Το μοντέλο των υπερήχων στηρίχθηκε σε 4 παραμέτρους οι οποίες είναι κατά σειρά η % περιεκτικότητα της αιθανόλης (v/v), ο χρόνος της εκχύλισης (min), η % ενέργεια της εκχύλισης (W) και η αναλογία διαλύτη και δείγματος (ml/g). Ζυγίστηκαν 0,5 g δείγματα ξηρής δρόγης και παραπροϊόντος του φυτού *Sambucus nigra* L και τοποθετήθηκαν στη φιάλη υπερήχων με την απαιτούμενη, κάθε φορά ποσότητα αιθανόλης και νερού. Η φιάλη υπερήχων τοποθετήθηκε σε πάγο ώστε να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία εκχύλισης. Ο αισθητήρας υπερήχων εισήχθη στο κέντρο της φιάλης εκχύλισης για να έρχεται άμεση επαφή με το δείγμα και να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Πριν και μετά την πραγματοποίηση της διαδικασίας έγινε καταγραφή της θερμοκρασίας του δείγματος με θερμομέτρο υδραργύρου. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης κυμαινόταν από 8 έως 41 βαθμούς Κελσίου. Μετά το πέρας των εκχυλίσεων, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση σε 3500 rpm για 15 λεπτά και τα υπερκείμενα διατηρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη έως ότου αναλυθούν.

4.3 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης μέσω μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken

Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης των φαινολικών, με την χρήση των ακόλουθων πειραματικών μοντέλων σχεδιασμού :

- 1. Χρήση μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken**, με απώτερο σκοπό την βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης για την παραλαβή του μέγιστου ολικού φαινολικού περιεχομένου, ακολουθώντας την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM). Για την κατασκευή του μοντέλου πραγματοποιήθηκαν 27 πειράματα, σε 3 διαφορετικά επίπεδα τιμών με τις 4 παραμέτρους που προαναφέρθηκαν.

- 2. Εφαρμογή επιβεβαιωτικών πειραμάτων**, για τον εντοπισμό των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης.
- Όλα τα πειραματικά μοντέλα σχεδιασμού κατασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν στατιστικά με την βοήθεια του προγράμματος Minitab Software (δοκιμαστική έκδοση 21.3).

4.4 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

4.4.1 Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU

- **Πειραματική πορεία / Υλικά :**

Σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml, τοποθετήθηκε με την χρήση μικροπιπέτας (0,5-10 μL, 10-100 μL, 100-1000 μL) προκαθορισμένη ποσότητα αραιωμένου δείγματος, 2,500 μL αποσταγμένου νερού καθώς και 200 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Με την χρήση καπακίων, οι κυψελίδες αναδεύτηκαν ήπια, τοποθετήθηκαν σε στατώ δοκιμαστικών σωλήνων και αποθηκεύτηκαν σε σκοτάδι για 8 λεπτά. Ύστερα, προστέθηκαν 500 μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 και το μείγμα αναδεύτηκε ξανά. Έπειτα, όλες οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 40 βαθμούς Κελσίου και αφού αναπτύχθηκε το επιθυμητό μπλε χρώμα, το περιεχόμενο των κυψελίδων αφέθηκε για 5 λεπτά, έτσι ώστε να ανακτήσει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Ύστερα, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο UV-vis Spectro 23RS (LaboMed, Inc., Los Angeles, CA, USA) στα 750 nm. Για την ρύθμιση της τιμής της απορρόφησης και τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε και ένα τυφλό δείγμα, ενώ για κάθε δείγμα οι πειραματικοί προσδιορισμοί και οι διαδικασίες έγιναν εις τριπλούν. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ολικές φαινολικές ουσίες εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE, Gallic Acid Equivalents) ανά γραμμάρια δείγματος.

4.4.2 Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- **Πειραματική πορεία / Υλικά :**

Σε πλαστικές κυψελίδες χωρητικότητας 4,0 ml, προστέθηκαν με χρήση μικροπιπέτας (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL) 50 μL δείγματος, 1950 μL απεσταγμένου νερού, 900 μL διαλύματος FRAP και 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$. Το διάλυμα FRAP προέκυψε μετά από ανάμειξη ρυθμιστικού διαλύματος με διάλυμα $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ και 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (TPTZ). Με την χρήση καπακιών, οι κυψελίδες αναδεύτηκαν ήπια, τοποθετήθηκαν σε στατώ δοκιμαστικών σωλήνων και ύστερα σε υδατόλουτρο για 90 λεπτά στους 40 βαθμούς Κελσίου. Μετά το πέρας των 90 λεπτών, το περιεχόμενο των κυψελίδων αφέθηκε για 5 λεπτά, έτσι ώστε να ανακτήσει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο UV-vis Spectro 23RS (LaboMed, Inc., Los Angeles, CA, USA) στα 595 nm. . Για την ρύθμιση της τιμής της απορρόφησης και τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε και ένα τυφλό δείγμα, ενώ για κάθε δείγμα οι πειραματικοί προσδιορισμοί και οι διαδικασίες έγιναν εις τριπλούν.

4.4.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$

- **Πειραματική πορεία / Υλικά :**

Η δοκιμή της ABTS αποτελεί ένδειξη της αντιριζικής δράσης των δειγμάτων. Πριν από κάθε σειρά πειραμάτων, το διάλυμα της ρίζας αραιώθηκε κατάλληλα με διάλυμα αιθανόλης αναλυτικής καθαρότητας έτσι ώστε να δώσει την επιθυμητή απορρόφηση στα 734 nm. Σε πλαστικές κυψελίδες χωρητικότητας 4,0 ml, προστέθηκε με χρήση μικροπιπέτας (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL) προκαθορισμένη ποσότητα δείγματος, καθώς και 3000 μL αραιωμένου διαλύματος ABTS [2,2'-αζινο-δις(3-αιθυλοβεζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)]. Έπειτα από ανάδευση τα μίγματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι για 1 λεπτό και ύστερα μετρήθηκε η απορρόφηση τους με

φασματοφωτόμετρο UV-vis Spectro 23RS (LaboMed, Inc., Los Angeles, CA, USA) στα 734 nm. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Η έκφραση του αποτελέσματος ορίστηκε σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylicacid 97%, C₁₄H₁₈O₄).

4.5 Στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων

Μετά την διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, μέσω του προγράμματος Minitab, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p\text{-value} \leq 0,05$).

1. Αρχικά καθορίστηκαν οι παράγοντες, όπου **A** : % περιεκτικότητα αιθανόλης (v/v), **B** : χρόνος εκχύλισης (min), **C** : % ενέργεια της εκχύλισης (W) και **D** : αναλογία διαλύτη/ μάζας δείγματος (mL/g).
2. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε, το πειραματικό μοντέλο Box-Behnken, (3 επίπεδα τιμών, 4 παράμετροι), από το οποίο προέκυψαν 27 προτεινόμενα πειράματα διαφορετικών συνθηκών εκχύλισης στα δείγματα της ξηρής δρόγης.
3. Επειδή όλοι οι παράγοντες δεν έχουν τις ίδιες μονάδες μέτρησης ούτε απαραίτητα το ίδιο εύρος τιμών, οι τιμές κωδικοποιήθηκαν για να κανονικοποιηθούν. Τα πραγματικά επίπεδα που αντιστοιχούν στις τιμές (-1), (0) και (+1), αναγράφονται στον Πίνακα 4.1 :

Πίνακας 4.1 : Πραγματικά επίπεδα τιμών για τις κωδικοποιημένες τιμές (-1), (0) και (+1)

Κωδικοποιημένες τιμές	Περιεκτικότητα αιθανόλης v/v (%)	Χρόνος εκχύλισης (min)	% Ενέργεια της εκχύλισης (W)	Αναλογία διαλύτη/μάζας δείγματος (mL/g)
(-1)	20	10	20	20
(0)	60	25	50	40
(+1)	100	40	80	60

Από την στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων προέκυψαν ο πίνακας ANOVA (**Πίνακας 5.5**) , το ραβδόγραμμα Pareto (**Ραβδόγραμμα 5.1**) τα διαγράμματα επιδράσεων κυρίων παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων τους (**Διαγράμματα 5.1 και 5.2 αντίστοιχα**), καθώς και τα διαγράμματα δύο διαστάσεων, Contour Plots (**Διαγράμματα 5.4 έως 5.9**) .

4. Σαν αποτέλεσμα μετά από την στατιστική αυτή ανάλυση, προέκυψαν 3 προτεινόμενα πειράματα ως βέλτιστα, σύμφωνα με το Minitab, τα οποία πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού των παραγόντων που θα δώσει το μέγιστο ολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων.

5. Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης και μοντέλα πειραματικού σχεδιασμού

5.1.1 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο ξηρής δρόγης

Τα 27 πειράματα που προέκυψαν από το μοντέλο Box-Behnken, μετά από εκχύλιση με υπερήχους και εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu, προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο (Total phenolic content, TPC). Στον Πίνακα 5.1, αναγράφονται τα 27 πειράματα με τις συνθήκες τους καθώς και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με τις τυπικές του αποκλίσεις :

Πίνακας 5.1: Συνθήκες εκχύλισης και ολικό φαινολικό περιεχόμενο πειραμάτων του μοντέλου Box-Behnken

Σειρά Εκχύλισης	Περιεκτικότητα αιθανόλης (%) v/v	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ενέργεια υπερήχων % (W)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/g ξηρής δρόγης)
1	60	10	50	60	20.3 ± 3.9
2	60	25	80	20	34.9 ± 3.7
3	100	25	50	60	1.63 ± 0.21
4	100	25	50	20	6.35 ± 0.75
5	20	25	20	40	16.6 ± 1.2
6	60	25	80	60	24.7 ± 8.9
7	60	10	80	40	23.21 ± 0.94
8	100	25	20	40	4.4 ± 1.4

9	20	25	50	60	26.8 ± 2.1
10	100	40	50	40	4.22 ± 0.42
11	20	25	80	40	33.0 ± 9.0
12	60	40	50	20	31.9 ± 4.0
13	60	40	20	40	32.2 ± 5.1
14	60	10	20	40	14.22 ± 0.70
15	20	25	50	20	23.9 ± 5.1
16	60	40	50	60	24.81 ± 0.47
17	60	25	20	20	18.6 ± 3.3
18	60	25	50	40	35.7 ± 5.7
19	100	10	50	40	1.33 ± 0.11
20	60	25	50	40	27.0 ± 1.2
21	60	40	80	40	34.8 ± 7.7
22	60	25	20	60	22.91 ± 0.76
23	20	10	50	40	21.6 ± 7.8
24	60	10	50	20	20.4 ± 3.1
25	100	25	80	40	14.440 ± 0.098
26	20	40	50	40	40.0 ± 2.8
27	60	25	50	40	22 ± 17

Όπως είναι αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 5.1), το ολικό φαινολικό περιεχόμενο διαφέρει ανάλογα με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες εκχύλισης και κυμαίνεται από 1,33 έως 40 mg GAE/g ξηρής δρόγης. Για να περιοριστεί το ευρύ φάσμα των τιμών σε μια περιοχή που θα έχει υψηλότερες αποδόσεις και να προσαρμοστεί καλύτερα το μοντέλο επιφάνειας απόκρισης σε εκείνη, εφαρμόστηκε ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων (3^4) με τυχαία σειρά, για την αποφυγή πιθανών συστηματικών σφαλμάτων. Μάλιστα, 3 από τα 27 συνολικά πειράματα που προέκυψαν από το μοντέλο Box-Behnken είναι πανομοιότυπα και σε κεντρικά σημεία (0,0,0) (πειράματα 18, 20 και 27). Η τιμή της τυπικής απόκλισης των τριών επαναλήψεων είναι ίση με 6,93 και αποτελεί ένδειξη της αξιοπιστίας και της επαναληψιμότητας του μοντέλου.

Για να είναι ένα μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού αξιόπιστο θα πρέπει οι μεταβλητές R-sq και R-sq(adj), που δείχνουν την προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα που προκύπτουν, να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο 1 (δηλαδή το 100%) και να απέχουν λιγότερο από 0,2 (ή 20%). Με βάση την Εικόνα 5.1 παρατηρείται ότι το R-sq έχει τιμή 0,916 και το R-sq(adj) έχει τιμή 0,863. Οι δύο μεταβλητές δηλαδή έχουν διαφορά $0,916 - 0,863 = 0,053$ δηλαδή μικρότερη του 0,2 και πλησιάζουν και οι δύο την μονάδα. Αντίστοιχα, η μεταβλητή R-sq(pred), αποτελεί ένδειξη της ικανότητας του μοντέλου να προβλέπει με αξιοπιστία το ολικό φαινολικό περιεχόμενο ενός νέου εκχυλίσματος σαμπούκου ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης που επιλέγονται ή να προτείνει με ποιες συνθήκες εκχύλισης θα παραληφθεί εκχύλισμα με το επιθυμητό (όχι κατ' ανάγκη το βέλτιστο) περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Η τιμή του είναι πάνω από 80% και θεωρείται ικανοποιητική, άρα ως συμπέρασμα εξάγεται ότι το μοντέλο διακρίνεται για την εγκυρότητα και την αξιοπιστία του και το αυξημένο ποσοστό επιτυχούς πρόβλεψης του ολικού φαινολικού περιεχομένου ενός άγνωστου δείγματος σαμπούκου ή/και των συνθηκών εκχύλισης που πρέπει να εφαρμοστούν.

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4,04813	91,56%	86,29%	81,59%

Εικόνα 5.1 : Περίληψη του μοντέλου σχετικά με τον συντελεστή προσδιορισμού R-sq, τον διορθωμένο συντελεστή προσδιορισμού R-sq(adj) καθώς και της ικανότητας πρόβλεψης R-sq(pred)

Για να θεωρηθεί ότι μια παράμετρος επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση θα πρέπει, με γνώμονα τον πίνακα ANOVA, να έχει τιμή p-value μικρότερη ή ίση του 0,05. Από τον πίνακα ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων ANOVA (Πίνακας 5.2) προκύπτει ότι οι παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση των υπερήχων είναι : α) η % περιεκτικότητα της αιθανόλης (v/v) (p-value = 0.000), β) ο τετραγωνικός όρος της περιεκτικότητας της αιθανόλης AA (p-value = 0.000), γ) ο χρόνος της εκχύλισης (p-value = 0,000) και δ) η % ενέργεια της εκχύλισης (W) (p-value = 0,001). Τέλος, ο δείκτης Lack of fit, εκφράζει το πόσο αποτελεσματικά προσαρμόστηκε το τελικό μοντέλο στα δεδομένα. Η τιμή 0,962 (p-value \geq 0,05) υποδηλώνει ότι το μοντέλο δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική έλλειψη προσαρμογής στα δεδομένα και άρα είναι αξιόπιστο.

Έτσι, με γνώμονα τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, εφαρμόστηκε ένα νέο πειραματικό μοντέλο Box-Behnken, με όλες τις παραμέτρους και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, από το οποίο αφαιρέθηκαν οι παράμετροι με p-value \geq 0,4 γιατί θεωρούνται στατιστικά ασήμαντοι. Η διαδικασία αυτή οδήγησε, στο τελικό πειραματικό μοντέλο καθώς και στον πίνακα ανάλυση της διακύμανσης των παραγόντων ANOVA (Πίνακας 5.2).

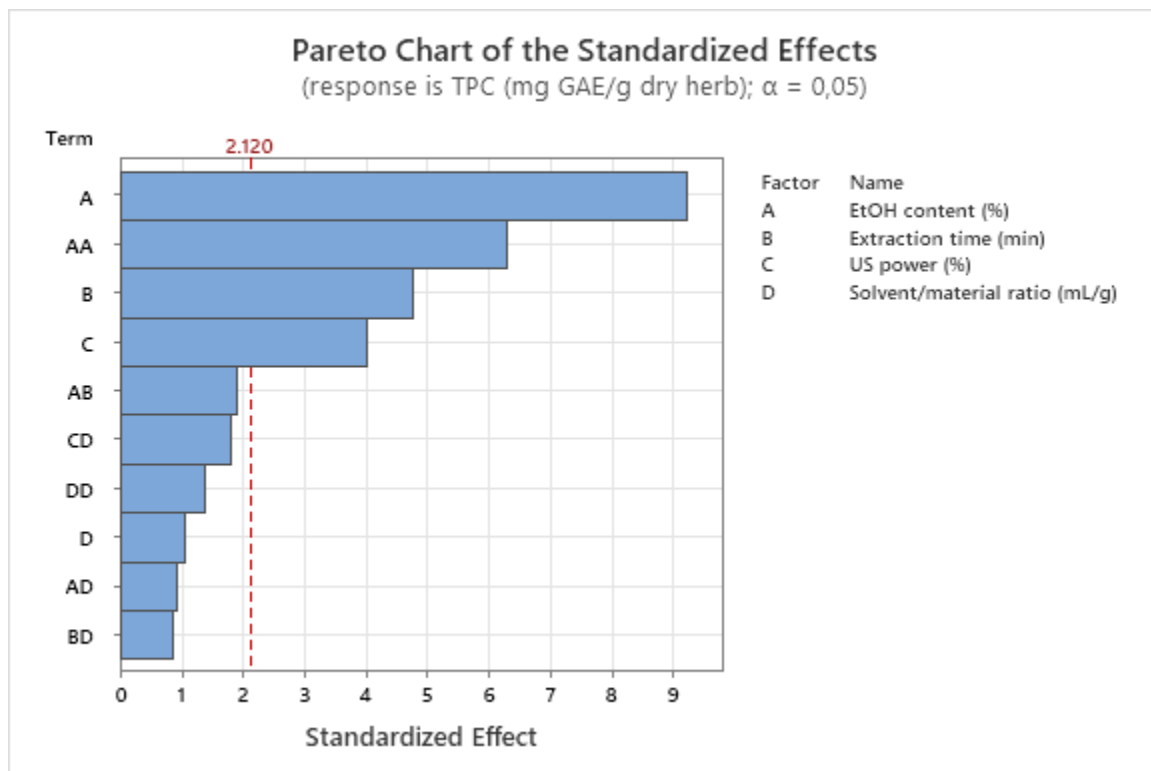
Πίνακας 5.2 : Ανάλυση διακύμανσης παραγόντων (ANOVA) για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS
Model	10	2844,88	284,49
Linear	4	2052,73	513,18
EtOH content (%)	1	1398,53	1398,53
Extraction time (min)	1	372,01	372,01
US power (%)	1	263,62	263,62
Solvent/material ratio (mL/g)	1	18,58	18,58
Square	2	652,87	326,43
EtOH content (%)*EtOH content (%)	1	652,56	652,56
Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)	1	31,90	31,90
2-Way Interaction	4	139,28	34,82
EtOH content (%)*Extraction time (min)	1	59,87	59,87
EtOH content (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	1	14,43	14,43
Extraction time (min)*Solvent/material ratio (mL/g)	1	12,11	12,11
US power (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	1	52,88	52,88
Error	16	262,20	16,39
Lack-of-Fit	14	164,15	11,72
Pure Error	2	98,05	49,03
Total	26	3107,08	

Source	F-Value	P-Value
Model	17,36	0,000
Linear	31,32	0,000
EtOH content (%)	85,34	0,000
Extraction time (min)	22,70	0,000
US power (%)	16,09	0,001
Solvent/material ratio (mL/g)	1,13	0,303
Square	19,92	0,000
EtOH content (%)*EtOH content (%)	39,82	0,000
Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)	1,95	0,182
2-Way Interaction	2,12	0,125
EtOH content (%)*Extraction time (min)	3,65	0,074
EtOH content (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	0,88	0,362
Extraction time (min)*Solvent/material ratio (mL/g)	0,74	0,403
US power (%)*Solvent/material ratio (mL/g)	3,23	0,091
Error		
Lack-of-Fit	0,24	0,962
Pure Error		
Total		

Επιπλέον, το διάγραμμα Pareto αναπαριστά κατά φθίνουσα σειρά σημαντικότητας τις παραμέτρους της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, οι σημαντικές παράμετροι είναι αυτές που ξεπερνούν την κάθετη κόκκινη γραμμή, που υποδεικνύει το επίπεδο σημαντικότητας ($p\text{-value} \leq 0.05$) και παρουσιάζονται στο (Ραβδόγραμμα 5.1) :



Ραβδόγραμμα 5.1 : Διάγραμμα Pareto για την εκτίμηση της επίδρασης των παραμέτρων στην εκχύλιση

Έχοντας, επομένως, υπόψη τα παραπάνω δεδομένα , συμπεραίνεται ότι από τις 4 παραμέτρους που ορίστηκαν για την εφαρμογή των εκχυλίσεων, οι 3 ασκούν σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα και αυτές είναι με φθίνουσα σειρά σημαντικότητας, η % περιεκτικότητα σε αιθανόλη (v/v), ο χρόνος εκχύλισης και η % ενέργεια της εκχύλισης (W). Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο, ενώ από την άλλη πλευρά, η παράμετρος που αφορά

την αναλογία του διαλύτη με το δείγμα δεν επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση ($p\text{-value} = 0,303 > 0,05$).

5.1.3 Εξίσωση πρόβλεψης φαινολικών ουσιών

Από το μοντέλο πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken προέκυψε η παρακάτω εξίσωση πρόβλεψης του συνολικού φαινολικού περιεχομένου

Regression Equation in Uncoded Units

$$\begin{aligned} \text{TPC (mg GAE/g dry herb)} = & -36,3 + 0,744 \text{ EtOH content (\%)} + 0,990 \text{ Extraction time (min)} \\ & + 0,399 \text{ US power (\%)} + 0,975 \text{ Solvent/material ratio (mL/g)} \\ & - 0,00631 \text{ EtOH content (\%)*EtOH content (\%)} \\ & - 0,00558 \text{ Solvent/material ratio (mL/g)*Solvent/material ratio (mL/g)} \\ & - 0,00645 \text{ EtOH content (\%)*Extraction time (min)} \\ & - 0,00237 \text{ EtOH content (\%)*Solvent/material ratio (mL/g)} \\ & - 0,00580 \text{ Extraction time (min)*Solvent/material ratio (mL/g)} \\ & - 0,00606 \text{ US power (\%)*Solvent/material ratio (mL/g)} \end{aligned}$$

Εικόνα 5.2 : Εξίσωση πρόβλεψης φαινολικού περιεχομένου μέσω του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken

Η μεταβλητές σε αυτήν την εξίσωση ορίζονται ως :

- **EtOH content (%) v/v/ A** : ο γραμμικός όρος της επί τις εκατό περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη (v/v)
- **Extraction time (min) B** : ο γραμμικός όρος του χρόνου της εκχύλισης σε λεπτά

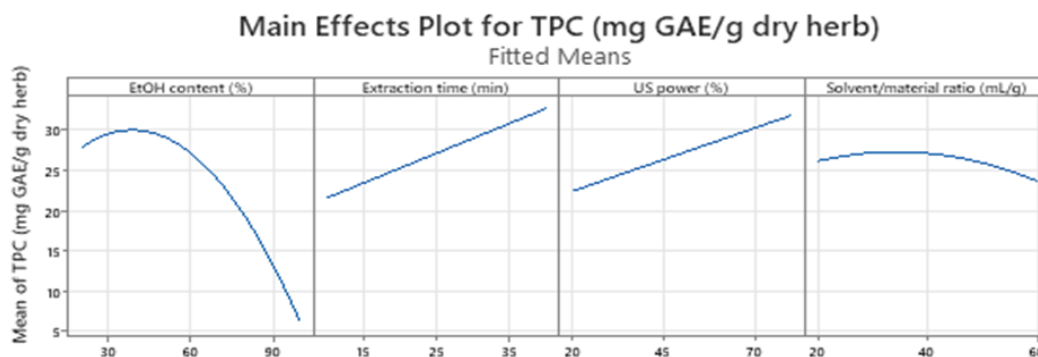
- **US power (%) C** : ο γραμμικός όρος της επί τις εκατό ενέργειας των υπερήχων της εκχύλισης (W)
- **Solvent/material ratio (mL/g) D** : ο γραμμικός όρος της αναλογίας του διαλύτη/δείγματος
- **EtOH content (% v/v)*EtOH content (%) AA** : ο τετραγωνικός όρος της επί τις εκατό περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη
- **Solvent/material ratio (mL/g)* Solvent/material ratio (mL/g) DD** : ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας διαλύτη/δείγματος
- **EtOH content (% v/v)*Extraction time (min) AB** : η αλληλεπίδραση της επί τις εκατό περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη με τον χρόνο της εκχύλισης
- **EtOH content (% v/v)*Solvent/material ratio (mL/g) AD** : η αλληλεπίδραση της επί τις εκατό περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη με την αναλογία διαλύτη/δείγματος
- **Extraction time (min)*Solvent/material ratio (mL/g) BD** : η αλληλεπίδραση του χρόνου της εκχύλισης με την αναλογία διαλύτη/δείγματος

- **US power (%) * Solvent/material ratio (mL/g) CD** : η αλληλεπίδραση της επί τις εκατό ενέργειας των υπερήχων της εκχύλισης (W) με την αναλογία διαλύτη/δείγματος

Με βάση την παραπάνω εξίσωση, δίνεται η δυνατότητα ρύθμισης των συνθηκών εκχύλισης ώστε να ληφθεί το επιθυμητό, σε κάθε περίπτωση, εκχύλιμα σαμπούκου με καθορισμένο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

5.1.4 Ανάλυση της επίδρασης των παραγόντων της εκχύλισης με υπερήχους

5.1.4.1 Επίδραση παραγόντων (Factorial Plots for TPC)



Διάγραμμα 5.2 : Διάγραμμα επίδρασης των τεσσάρων παραμέτρων εκχύλισης στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει την επίδραση των τεσσάρων παραμέτρων, ξεχωριστά, στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων σαμπύκου. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται πως όσο αυξάνεται το ποσοστό αιθανόλης μειώνεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ωστόσο, τόσο ο χρόνος εκχύλισης όσο και η ενέργεια εκχύλισης προκαλούν εκθετική αύξηση στην τιμή των TPC όσο αυξάνεται η τιμή τους. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, η μέγιστη απόδοση σε φαινολικά επιτυγχάνεται γύρω στα 35 - 40 λεπτά εκχύλισης, ενώ όσον αφορά την ενέργεια υπερήχων η αντίστοιχη τιμή κυμαίνεται κοντά στο 80%. Επιπροσθέτως, όσον αφορά την παράμετρο αναλογίας διαλύτη/δείγματος, η αύξηση ή μείωση της εμφανίζεται να μη διαφοροποιεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνει το ότι η παράμετρος αυτή δεν επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών.

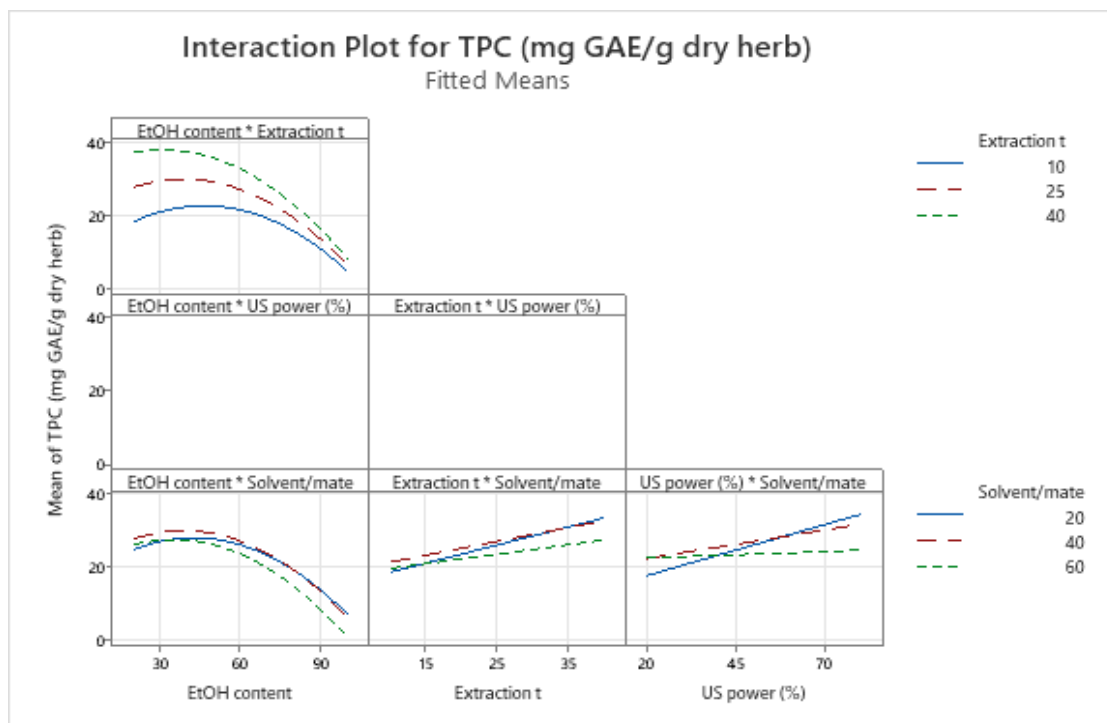
Σχετικά με την περιεκτικότητα της αιθανόλης στον διαλύτη, η μέγιστη αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου σε 40% περιεκτικότητα σε αιθανόλη και η ακόλουθη ελάττωση του, είναι φυσιολογική και οφείλεται στο γεγονός ότι οι φαινόλες εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες και στο συγκεκριμένο συνδυασμό διαλυτών (νερό και αιθανόλη), το νερό είναι περισσότερο πολικό από την αιθανόλη. Η δομή των φαινολικών ενώσεων αποτελείται από υδροξυλομάδες που τις καθιστούν πιο ευαίσθητες στην εκχύλιση από πολικούς διαλύτες. Έτσι, όταν το νερό υπερσχύει της αιθανόλης σε περιεκτικότητα στον διαλύτη, η εκχύλιση αποδίδει καλύτερα και προκύπτει υψηλό φαινολικό περιεχόμενο.

Έπειτα, όσον αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης, στην εκχύλιση με την χρήση υπερήχων ο χρόνος ακολουθεί δύο σημαντικά στάδια. Το αρχικό στάδιο διαρκεί 20 έως 30 λεπτά και είναι το στάδιο με την μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης σε βιοδραστικές ενώσεις (στην προκειμένη περίπτωση φαινολικά), ενώ το δεύτερο στάδιο χαρακτηρίζεται ως στάδιο “αργής εκχύλισης”, διαρκεί από 60 έως 100 λεπτά και η απόδοση της εκχύλισης ελαττώνεται, καθώς οι ενώσεις μεταφέρονται από την μήτρα στον διαλύτη με διάχυση (Medina-Torres et al., 2017). Επομένως, επειδή για το συγκεκριμένο πείραμα ορίστηκε ως μέγιστο όριο χρόνου εκχύλισης τα 40 λεπτά, καμία

εκχύλιση δεν έφτασε στο δεύτερο στάδιο, γεγονός που δικαιολογεί την εκθέτικη αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (Brahmi et al., 2022).

Στη συνέχεια, σχετικά με την επίδραση της ενέργειας των υπερήχων στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, η υπερηχητική ισχύς αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο για την βελτίωση της εκχύλισης φαινολικών από φυτικούς ιστούς καθώς όσο αυξάνεται η ισχύς, τόσο ενισχύεται η διαδικασία μεταφοράς μάζας, γεγονός που επιβεβαιώνει την εκθέτικη αύξηση του φαινολικού περιεχομένου, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5.1. Βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι, η απόδοση της εκχύλισης σε περιβάλλον ενισχυμένης υπερηχητικής ισχύος εξαρτάται και από το είδος των φαινολικών ενώσεων και την σταθερότητα τους σε αυτές τις συνθήκες (π.χ. το p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ με την άνοδο της υπερηχητικής ισχύς εκχυλίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με άλλα φαινολικά οξέα) (Ma et al., 2009) (Wang et al., 2013).

Τέλος, εστιάζοντας στην παράμετρο της αναλογίας διαλύτη/δείγματος, η αύξηση της αναλογίας υγρού/στερεού πιθανών να οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών, λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας των ενώσεων με τον διαλύτη, ενισχύοντας την διαλυτότητα τους στα φυτικά κύτταρα (El Baakili et al., 2023). Ωστόσο στην συγκεκριμένη περίπτωση, η αναλογία διαλύτη/δείγματος φέρεται να μην επηρεάζει αισθητά την απόδοση της εκχύλισης.

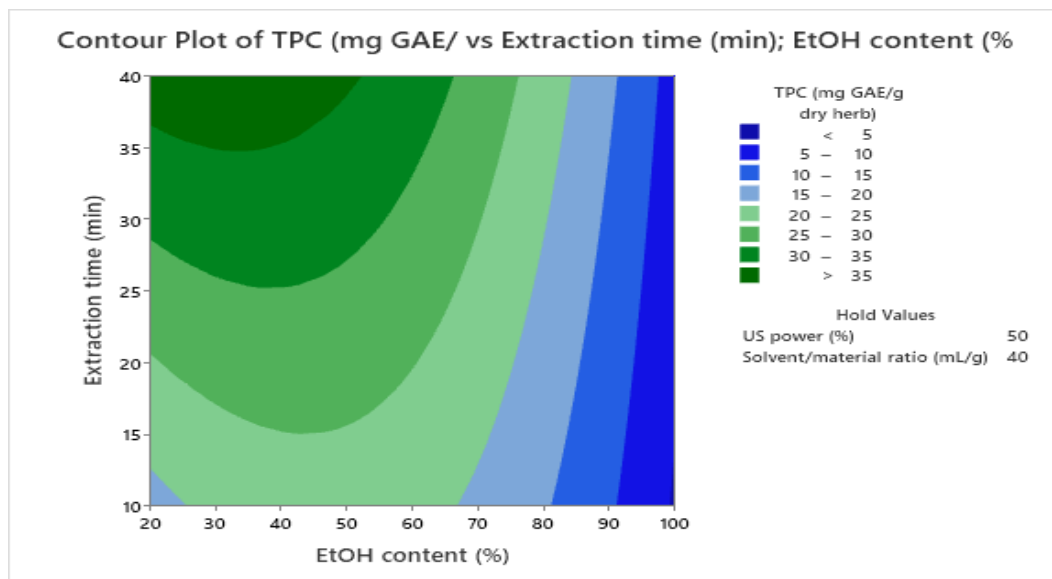


Διάγραμμα 5.3 : Διάγραμμα επίδρασης των αλληλειδράσεων των παραμέτρων της εκχύλισης στην ποσότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μελέτη της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τεσσάρων παραμέτρων εκχύλισης κατά ζεύγη στο TPC των εκχυλισμάτων σαμπούκου. Ειδικότερα, όσον αφορά την συνδυαστική επίδραση ποσοστού διαλύτη και χρόνου εκχύλισης προκύπτει ιδανική ποσότητα φαινολικών με μείωση της ποσότητας αιθανόλης κάτω από το 30% και αύξηση του χρόνου στα 40 λεπτά. Για την αλληλεπίδραση του ποσοστού αιθανόλης και της αναλογίας διαλύτη/φυτού, μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο ποσοστού φαινολικών φαίνεται να προκύπτει πάλι σε χαμηλό ποσοστό αιθανόλης και σε αναλογία διαλύτη/δείγματος γύρω στα 40 ml/g. Επιπλέον, όσον αφορά την αλληλεπίδραση του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας διαλύτη/δείγματος, η μεγιστοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου παρατηρείται κοντά στα 40 λεπτά με 20 ml διαλύτη ανά γραμμάριο δείγματος. Τέλος, σχετικά με την αλληλεπίδραση της ενέργειας υπερήχων και της αναλογίας διαλύτη/δείγματος, η βέλτιστη τιμή TPC παρατηρείται σε υψηλά ποσοστά ενέργειας της τάξης των 75 - 80% με 20 ml διαλύτη ανά γραμμάριο δείγματος.

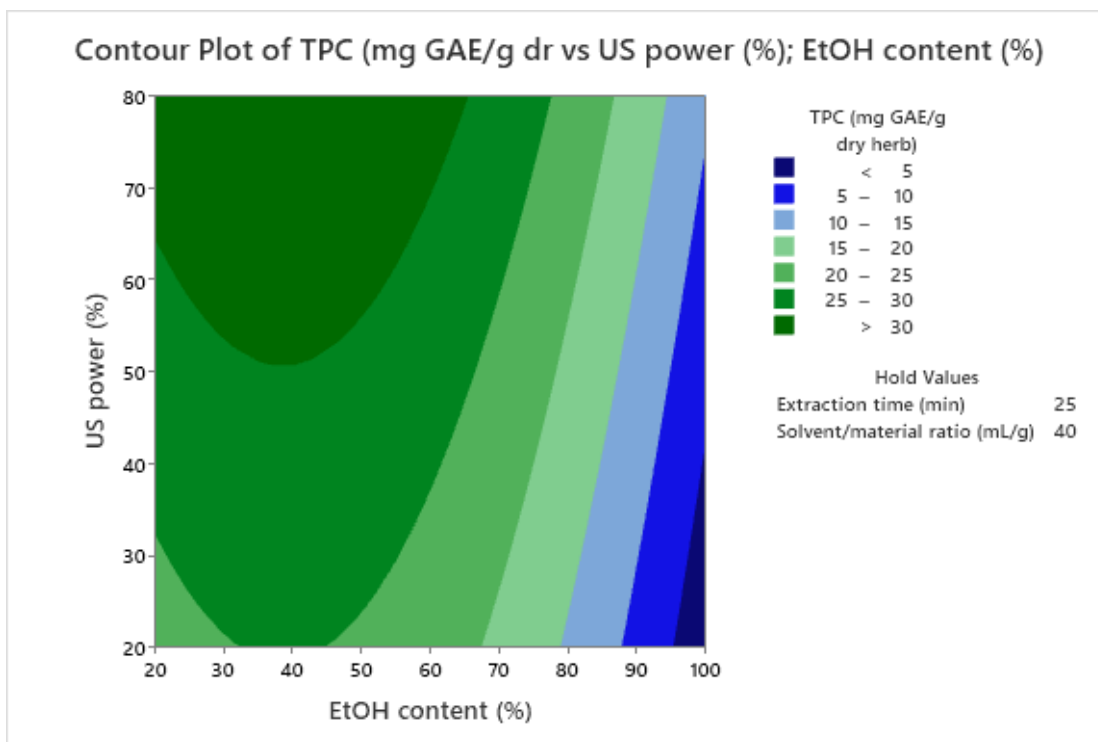
5.1.4.2 Αξιολόγηση αλληλεπίδρασης παραμέτρων εκχύλισης με διδιάστατο διάγραμμα 2D (Contour plots of TPC)

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, απεικονίζονται όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των παραγόντων της εκχύλισης και η αλληλεπίδραση τους στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ως γενικό κανόνα, και σύμφωνα με το υδατογράφημα του TPC (Total Phenolic Content), η περιοχή με το σκούρο πράσινο χρώμα θεωρείται η βέλτιστη και επομένως οι συνθήκες εκχύλισης που αναλογούν σε αυτή, είναι οι ιδανικές :



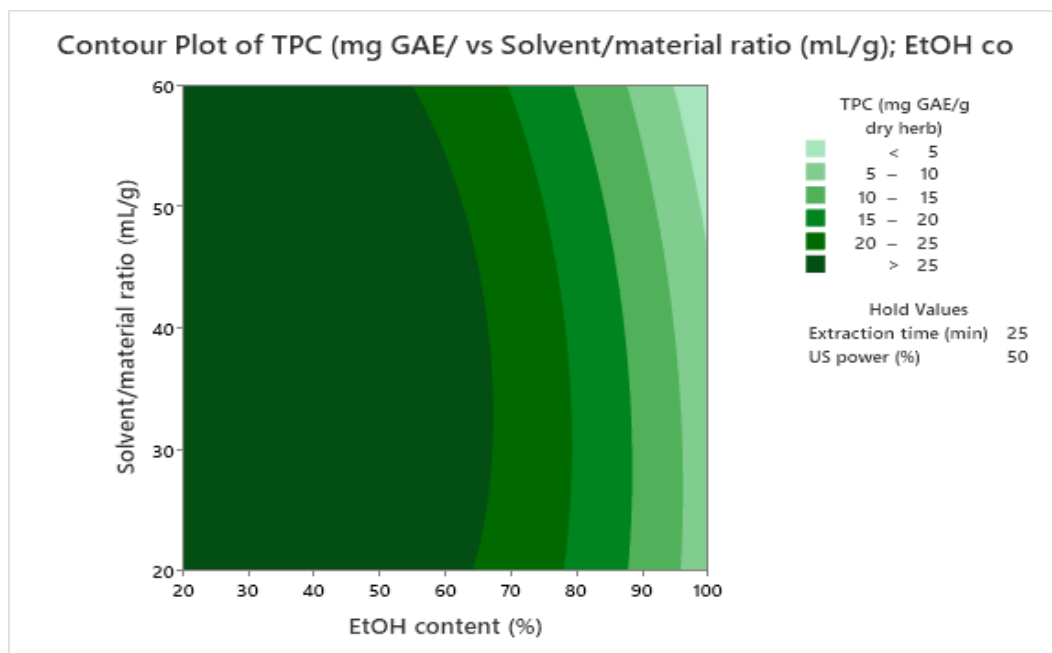
Διάγραμμα 5.4 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης χρόνου και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.4) απεικονίζεται ο συνδυασμός του χρόνου εκχύλισης με την % περιεκτικότητα της αιθανόλης στον διαλύτη, με σταθερή ενέργεια (US power) 50% και αναλογία διαλύτη/μάζας παραπροϊόντος 40 mL/g. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, ως ιδανική περιοχή για την ανάκτηση των περισσότερων φαινολικών είναι η περιοχή με συνθήκες χρόνου εκχύλισης περίπου 40 λεπτά και περιεκτικότητας σε αιθανόλη στον διαλύτη περίπου 20 % (v/v).



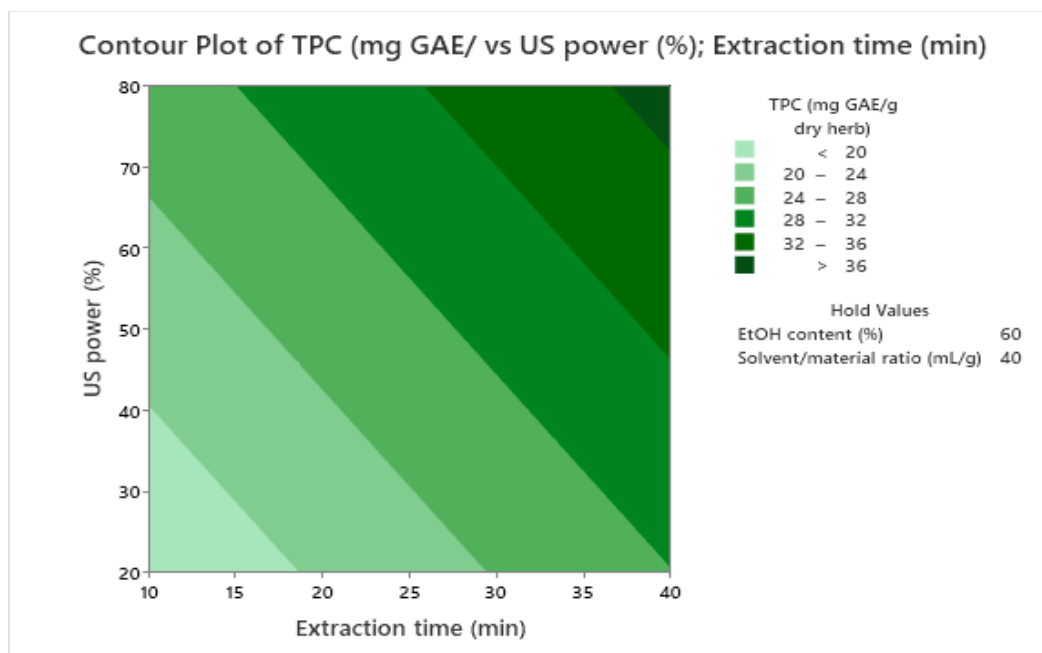
Διάγραμμα 5.5 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης ενέργειας και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση της % ενέργειας των υπερήχων (W) με την % περιεκτικότητα της αιθανόλης στον διαλύτη για την εκχύλιση φαινολικών, σε περιβάλλον χρόνου ίσο με 25 λεπτά και αναλογίας διαλύτη/δείγματος 40 mL/g. Με βάση το χρωματικό κώδικα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι μεγάλα ποσοστά ενέργειας της τάξης του 55 – 80 % αντιστοιχούν περιεκτικότητα αιθανόλης περίπου 20% με 55% (v/v). Στο πλαίσιο αυτών των τιμών, εμφανίζεται σκούρο πράσινο χρώμα, που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες αυτές είναι οι ιδανικότερες για την ανάκτηση υψηλού φαινολικού περιεχομένου. Ένας πιθανός συνδυασμός από τον οποίο θα μπορούσαν να προκύψουν τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής : 80 % ενέργεια των υπερήχων (W) και 20 % περιεκτικότητα της αιθανόλης στην διαλύτη (v/v).



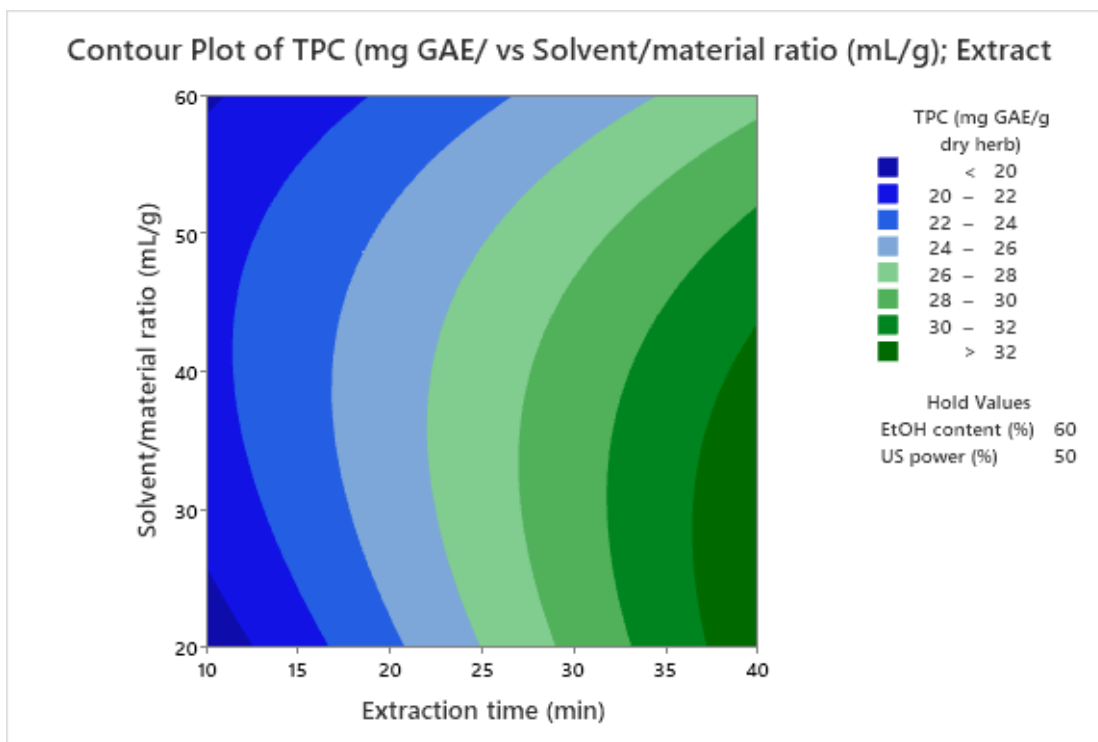
Διάγραμμα 5.6 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης αναλογίας διαλύτη/υποστρώματος και περιεκτικότητας αιθανόλης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Στο Διάγραμμα 5.6 παρουσιάζεται η συνδυαστική επίδραση της αναλογίας διαλύτη/φυτού και της % περιεκτικότητας της αιθανόλης στον διαλύτη (v/v), όσον αφορά την ανάκτηση φαινολικών, με σταθερό χρόνο εκχύλισης 25 λεπτά και ενέργεια επίσης σταθερή στην τιμή των 50%. Από την μελέτη του διαγράμματος, θα μπορούσε να επισημανθεί πως οι ιδανικές τιμές ανάκτησης φαινολικών έχουν μεγάλο εύρος και στις δύο παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, η σκούρα πράσινη περιοχή αποτυπώνεται σε περιεκτικότητα της αιθανόλης 20% έως 65% (v/v) και αναλογίας διαλύτη/δείγματος 20-60 mL/g. Ένας πιθανός συνδυασμός από τον οποίο θα μπορούσαν να προκύψουν τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής : 20% περιεκτικότητα σε αιθανόλη (v/v) και 40 mL/g αναλογία διαλύτη/δείγματος.



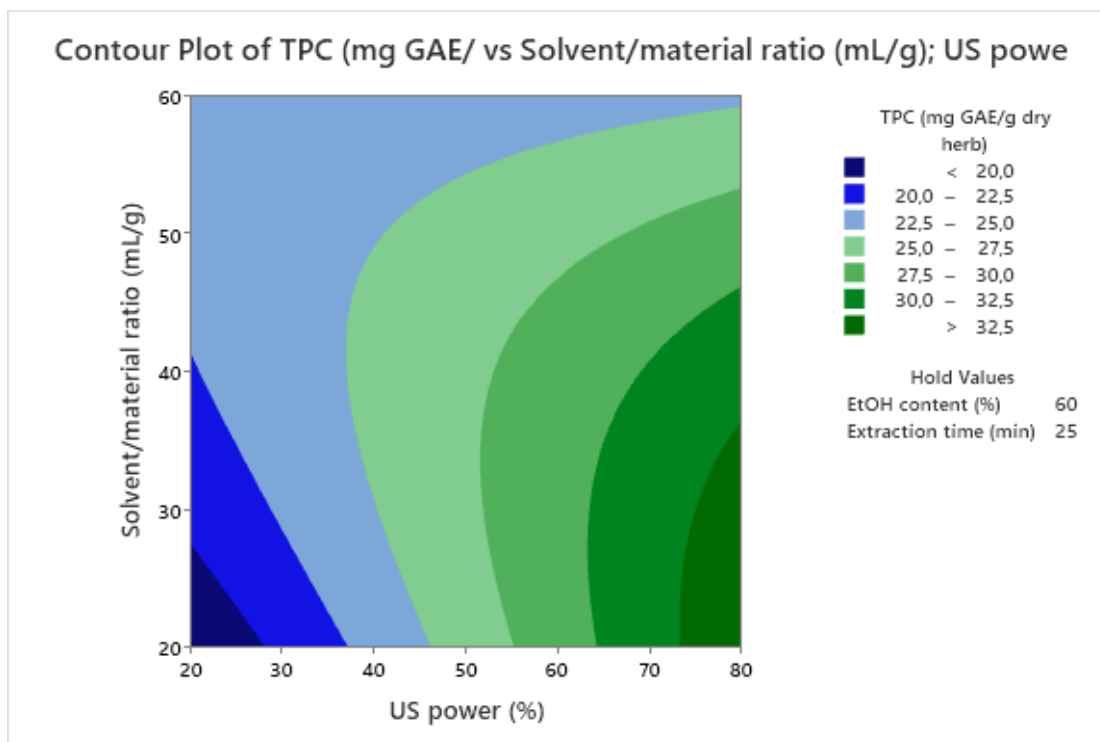
Διάγραμμα 5.7 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης ενέργειας και χρόνου για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Το παραπάνω σχήμα αποτυπώνει την επίδραση της ενέργειας υπερήχων και του χρόνου εκχυλίσεως στην ανάκτηση φαινολικών από δείγματα σαμπούκου , με σταθερές παραμέτρους το ποσοστό αιθανόλης (60% v/v) και την αναλογία διαλύτη/φυτού (40 ml/g). Στο συγκεκριμένο σχήμα είναι εμφανής η ευθεία αναλογία μεταξύ των δύο παραμέτρων, καθώς όσο αυξάνεται ο βέλτιστος χρόνος τόσο αυξάνεται και η βέλτιστη ενέργεια. Μιλώντας με συγκεκριμένες τιμές, για την εκχύλιση της βέλτιστης ποσότητας φαινολικών ουσιών, οι ιδανικές συνθήκες που αφορούν την διάρκεια της εκχύλισης αντιστοιχούν περίπου στα 40 λεπτά και της ενέργειας των υπερήχων περίπου στο 80% (W).



Διάγραμμα 5.8 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων αλληλεπίδρασης αναλογίας διαλύτη/δείγματος και χρόνου για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Στο Διάγραμμα 5.8 σκιαγραφείται η συνδυαστική επίδραση της αναλογίας διαλύτη/δείγματος και του χρόνου εκχύλισης, διατηρώντας τους παράγοντες % περιεκτικότητας αιθανόλης και ενέργειας υπερήχων στην τιμή των 60 % v/v και 50 % (W) αντίστοιχα. Η ιδανική περιοχή για την μεγιστοποίηση του ποσοστού ανάκτησης φαινολικών εμφανίζεται σε μεγάλες τιμές χρόνου της τάξεως των 38 με 40 λεπτών και σε χαμηλές τιμές αναλογίας διαλύτη/δείγματος περίπου σε τιμές 20 - 40 mL/g. Ένας πιθανός συνδυασμός από τον οποίο θα μπορούσαν να προκύψουν τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής : 40 λεπτά χρόνος εκχύλισης σε συνδυασμό με 30 mL/g αναλογία διαλύτη/δείγματος.



Διάγραμμα 5.9 : Διάγραμμα δύο διαστάσεων για την αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/δείγματος και της ενέργειας για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η αλληλεπίδραση της αναλογίας διαλύτη/φυτού και % ενέργειας εκχύλισης στο ποσοστό ανάκτησης φαινολικών, διατηρώντας σταθερούς τους παράγοντες, % περιεκτικότητα σε αιθανόλη και χρόνου εκχύλισης με τιμές 60 % v/v και 25 λεπτά, αντίστοιχα. Από την μελέτη του διαγράμματος εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι δύο παράμετροι είναι αντιστρόφως ανάλογοι, καθώς όσο ελαττώνεται η αναλογία διαλύτη/δείγματος τόσο αυξάνεται η ενέργεια, μιας και το πιο σκούρο πράσινο χρώμα εμφανίζεται στην περιοχή την οποία οι τιμές ενέργειας κυμαίνονται στο 75 – 80 % (W) ενώ οι τιμές αναλογίας διαλύτη/δείγματος στα 20 - 35 mL/g. Ένας πιθανός συνδυασμός από τον οποίο θα μπορούσαν να προκύψουν τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι ο εξής : 80 % ενέργεια εκχύλισης (W) σε συνδυασμό με 20 mL/g αναλογία διαλύτη/δείγματος.

5.1.5 Αποτελέσματα βελτιστοποίησης απόκρισης μοντέλου Box-Behnken

Πίνακας 5.3: Προτεινόμενα βέλτιστα πειράματα εκχύλισης φαινολικών ουσιών

Προτεινόμενο πείραμα	Περιεκτικότητα διαλύτη σε αιθανόλη (% v/v)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ενέργεια εκχύλισης (%)	Αναλογία διαλύτη/δείγματος (mL/g)	Θεωρητική τιμή TPC (mg GAE/g ξηρής δρόγης)	Πιθανότητα συμφωνίας θεωρητικής και πειραματικής τιμής	Πειραματική τιμή TPC (mg GAE/g ξηρής δρόγης)
Best 1	34,5	40	80	20	45,7029	1,00000	24,2 (±2,2) ^a
Best 2	64,8	40	80	20	39,9973	1,00000	26,1(±2,9) ^a
Best 3	54,4	40	80	37,6	39,8535	0,99628	24,3(±1,6) ^a

Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 5.3), παραθέτονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης απόκρισης του πειραματικού μοντέλου Box-Behnken που τέθηκε σε εφαρμογή. Όσον αφορά το πρώτο πείραμα (Best 1), απαιτείται περίπου 34,5 % περιεκτικότητα σε αιθανόλη, 40 λεπτά διάρκεια εκχύλισης με 80 % ενέργεια υπερήχων καθώς και 20 ml διαλύτη ανά γραμμάριο δείγματος. Στον συγκεκριμένο συνδυασμό συνθηκών εκχύλισης, το μοντέλο προβλέπει με την μέγιστη επιτυχία (100 %). Μέγιστη επιτυχία πρόβλεψης εμφανίζεται και στο δεύτερο πείραμα βελτιστοποίησης (Best 2), το οποίο έχει τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης με το πρώτο με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε αιθανόλη που απαιτείται σε μεγαλύτερο ποσοστό 64,8 %. Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες ενότητες, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη είναι η παράμετρος που ασκεί την μεγαλύτερη επιρροή στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και το γεγονός αυτό

είναι αντιληπτό και από τον Πίνακα 5.3, καθώς στο δεύτερο πείραμα αυξήθηκε αισθητά η περιεκτικότητα σε αιθανόλη και προκάλεσε πτώση της θεωρητικής τιμής TPC σχεδόν 5 mg GAE/g ξηρής δρόγης (από 45 σε 40 mg GAE/g ξηρής δρόγης) . Σχετικά με το τρίτο πείραμα (Best 3), παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις σε σύγκριση με τα προηγούμενα πειράματα, καθώς με εξαίρεση τον χρόνο και την ενέργεια εκχύλισης που είναι πανομοιότυπα, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη μεταβλήθηκε στο 54,4 % και η αναλογία διαλύτη/δείγματος αυξήθηκε από 20 σε 37,6 mL/g . Η απόκλιση στην αναλογία διαλύτη/δείγματος δεν φέρεται να τροποποιεί το αποτέλεσμα των ολικών φαινολικών σε σύγκριση με το πείραμα 2 (Best 2), μιας και σύμφωνα με το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 5.1) δεν επιδρά σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα και έτσι το τρίτο πείραμα εμφανίζει παρόμοια τιμή ολικών φαινολικών σε σχέση με το Best 2, ενώ το μοντέλο εμφανίζει σχεδόν απόλυτη επιτυχία στην πρόβλεψη (99,628 %). Τα πειράματα που προτάθηκαν να δώσουν τα βέλτιστα φαινολικά πραγματοποιήθηκαν και μετά από τους απαραίτητους υπολογισμούς προέκυψαν οι πειραματικές τιμές του TPC με τις σχετικές τους αποκλίσεις.

Παρατηρώντας τον Πίνακα 5.3, είναι αντιληπτό ότι οι θεωρητικές τιμές TPC σε σύγκριση με τις πειραματικές τιμές έχουν μεγάλη απόκλιση, ενώ το μοντέλο που εφαρμόστηκε προβλέπει με σχεδόν 100 % επιτυχία. Για κάθε θεωρητική τιμή που προέκυψε από το στατιστικό πρόγραμμα Minitab, αντιστοιχεί ένα όριο εμπιστοσύνης. Συγκεκριμένα, για το πείραμα Best 1, η θεωρητική τιμή είναι 45,7 mg GAE/g ξηρής δρόγης με όρια εμπιστοσύνης (36,82 έως 54,58 mg GAE/g ξηρής δρόγης). Για το πείραμα Best 2, η θεωρητική τιμή είναι 39,9 mg GAE/g ξηρής δρόγης με όρια εμπιστοσύνης (32,0 έως 47,9 mg GAE/g ξηρής δρόγης), ενώ για το πείραμα Best 3, η θεωρητική τιμή είναι 39,8 mg GAE/g ξηρής δρόγης με όρια εμπιστοσύνης (35,2 έως 44,4 mg GAE/g ξηρής δρόγης). Είναι εμφανές, επομένως, ότι καμία από τις τρεις πειραματικές τιμές δεν εμπεριέχεται στα συγκεκριμένα όρια και ότι θεωρητικές και πειραματικές τιμές απέχουν σημαντικά.

Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Αρχικά η ξηρή δρόγη του σαμπούκου, πάνω στην οποία εφαρμόστηκαν τα τρία βέλτιστα πειράματα που πρότεινε το μοντέλο, πιθανών να μην διαθέτει ως υπόστρωμα ποσότητα φαινολικών

ενώσεων παραπάνω από 40 mg GAE/g ξηρής δρόγης, η οποία είναι η τιμή που προβλέπει το μοντέλο Box-Behnken. Σύμφωνα με έρευνα των (Viariana & Wesolowski, 2017), το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων ξηρής δρόγης σαμπούκου, έλαβε τιμές από 19,81 έως 23,90 mg GAE/g ξηρής δρόγης, άρα ίσως η απόκλιση μεταξύ θεωρητικών και πειραματικών τιμών να οφείλεται στο είδος του φυτού που εξετάστηκε. Έπειτα μια άλλη αιτία θα μπορούσε να αποδοθεί στην ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, καθώς σύμφωνα με την Εικόνα 5.1, η μεταβλητή $R^2(\text{predicted})$ δηλαδή η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, έχει ένα ποσοστό της τάξεως του 20 % που δεν προβλέπει επιτυχώς. Ακόμα μια αιτία, θα μπορούσε να είναι η πιθανή ποιοτική υποβάθμιση της ξηρής δρόγης του σαμπούκου στο διάστημα που μεσολάβησε από την εκτέλεση των αρχικών 27 πειραμάτων (Πίνακας 5.1), μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων με τις βέλτιστες συνθήκες.

5.1.6 Επιλογή βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης με υπερήχους για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από δείγματα σαμπούκου

Όπως είναι αντιληπτό και από τον Πίνακα 5.3, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στις πειραματικές τιμές των TPC, παρατηρείται ότι και τα 3 προτεινόμενα πειράματα δίνουν παρόμοιο αριθμό φαινολικών : Best 1 = $24,2 \pm 2,2$, Best 2 = $26,1 \pm 2,9$, Best 3 = $24,3 \pm 1,6$ (mg GAE/g ξηρής δρόγης). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από το πρόγραμμα Minitab, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των προτεινόμενων βέλτιστων δειγμάτων, τα οποία ταξινομήθηκαν και τα 3 στην ίδια ομάδα, άρα δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επομένως, για την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών στα παραπροϊόντα είναι κατάλληλα και τα 3 πειράματα και η επιλογή μπορεί να βασιστεί σε άλλα κριτήρια (πείραμα με το μικρότερο δυνατό χρόνο εκχύλισης ή πείραμα με την χαμηλότερη περιεκτικότητα αιθανόλης στο διαλύτη εκχύλισης για ελάττωση του κόστους της ανάλυσης, κ.ά).

Με βάση τον Πίνακα 5.3, ο χρόνος εκχύλισης και η % ενέργεια των υπερήχων είναι ίδια και στα 3 προτεινόμενα πειράματα, άρα δεν επηρεάζουν την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για τα παραπροϊόντα. Όσον αφορά την % περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη, το πείραμα Best 2 έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη στον διαλύτη (64,8% v/v), γεγονός που επιφέρει μεγάλο κόστος στην ανάλυση και έτσι δεν θα προτιμηθεί για τα παραπροϊόντα. Επομένως, η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών περιορίζεται ανάμεσα στα πειράματα Best 1 και Best 3. Το πείραμα Best 1 έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη στον διαλύτη (34,5% v/v) σε σχέση με το Best 3 (54,4% v/v). Ωστόσο, το Best 3 εμφανίζει μεγαλύτερη αναλογία διαλύτη/δείγματος (37,6 mL/g) σε σύγκριση με το Best 1 (20 mL/g). Επομένως, οι συνθήκες του προτεινόμενου πειράματος Best 3 θα επιλεγθούν ως οι καταλληλότερες για εφαρμογή στα παραπροϊόντα, λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας διαλύτη/δείγματος που έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής των φαινολικών ενώσεων με τον διαλύτη και άρα την αύξηση της διαλυτότητας τους στα φυτικά κύτταρα.

5.2 Εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών στα παραπροϊόντα

5.2.1 Σύγκριση εκχυλισμάτων Sambucus και παραπροϊόντων του ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική και την αντιοξειδωτική τους δράση

Αφού επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με υπερήχους για την μελέτη της εκχύλισης των παραπροϊόντων, στην μελέτη προστέθηκαν, εκτός από το εκχύλισμα παραπροϊόντος σαμπούκου στις βέλτιστες συνθήκες (B3_BY SAB) και 3 ακόμα συνθήκες εκχύλισης, από τα πρώτα 27 πειράματα που πρότεινε το μοντέλο Box-Behnken για την ξηρή δρόγη, με βάση την περιεκτικότητά τους σε φαινολικό περιεχόμενο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ακόμα μια εκχύλιση παραπροϊόντος σε συνθήκες όπου κατά τον πειραματικό σχεδιασμό (Πίνακας 5.1) κατέληξαν σε χαμηλό (Run 19_LOW) TPC. Τα 2 αυτά δείγματα, μαζί με το βέλτιστο εκχύλισμα της ξηρής δρόγης μελετήθηκαν εκτός από το φαινολικό τους περιεχόμενο και για την αντιοξειδωτική και αντιριζική τους δράση με τη μέθοδο FRAP και ABTS, αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της στατιστικής διαφοράς των δειγμάτων και την ταξινόμησή τους σε ομάδες, έγινε

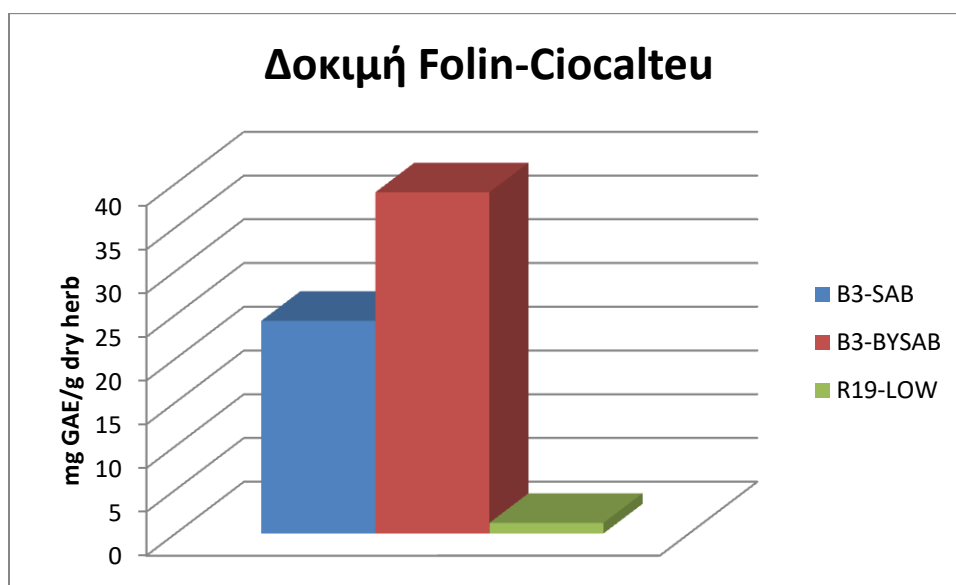
στατιστική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), μέσω του Minitab, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% για κάθε μέθοδο ξεχωριστά.

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα μεθόδων Folin-Ciocalteu, ABTS⁺⁺ και FRAP σε παραπροϊόντα και ξηρή δρόγη του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* L. σχετικά με το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική και την αντιοξειδωτική τους δράση

Δείγμα	Κωδικός Δείγματος	Μέση τιμή TPC (mg GAE/g δείγματος) (±τυπική απόκλιση) ¹	Μέση τιμή ABTS ⁺⁺ (mg of TE/g δείγματος) (±τυπική απόκλιση) ¹	Μέση τιμή FRAP (mg Fe (II)/g δείγματος) (±τυπική απόκλιση) ¹
<i>Sambucus nigra</i> L. στερεή ξηρή δρόγη_6/6/2023* _ Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης υπερήχων	B3_SAB	24,3 (±1,6) ^b	49,1(±8,3) ^c	127,9(±4,2) ^b
<i>Sambucus nigra</i> L. στερεά παραπροϊόντα_22/6/2023* _ Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης υπερήχων	B3_BY SAB	39(±1) ^a	83(±1,3) ^a	210,3(±4,3) ^a
<i>Sambucus nigra</i> L. στερεά παραπροϊόντα_22/6/2023* _ Συνθήκες χαμηλού φαινολικού περιεχομένου εκχύλισης υπερήχων	R19_LOW	1,21(±0,11) ^c	3,89(±0,23) ^d	9,05(±0,54) ^c

5.2.1.1 Σύγκριση ως προς το φαινολικό περιεχόμενο

Όπως είναι αντιληπτό και από τη στατιστική ανάλυση που προέκυψε από την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (Πίνακας 5.2), τα δείγματα 1 (B3_SAB), 2 (B3_BY SAB) και 3 (R19_LOW) ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, άρα δεν συσχετίζονται μεταξύ τους ως προς το φαινολικό περιεχόμενο και παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές.



Διάγραμμα 5.10 : Συγκριτική απεικόνιση του φαινολικού περιεχομένου, μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg GAE ανά g δείγματος

Τα δείγματα 1 (B3_SAB) και 2 (B3_BY SAB) έχουν εκχυλιστεί κάτω από τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης και η μόνη διαφορά τους έγκειται στο αρχικό δείγμα που επιλέχθηκε για να γίνει η εκχύλιση. Συγκεκριμένα, το δείγμα 1 αφορά την ξηρή δρόγη του σαμπούκου, ενώ το δείγμα 2 αντιπροσωπεύει τα παραπροϊόντα του. Όπως απεικονίζεται και στο Διάγραμμα 5.10, καθώς και στον Πίνακα 5.4, το βέλτιστο δείγμα του παραπροϊόντος μετά την εφαρμογή της δοκιμής Folin-Ciocalteu εμφάνισε

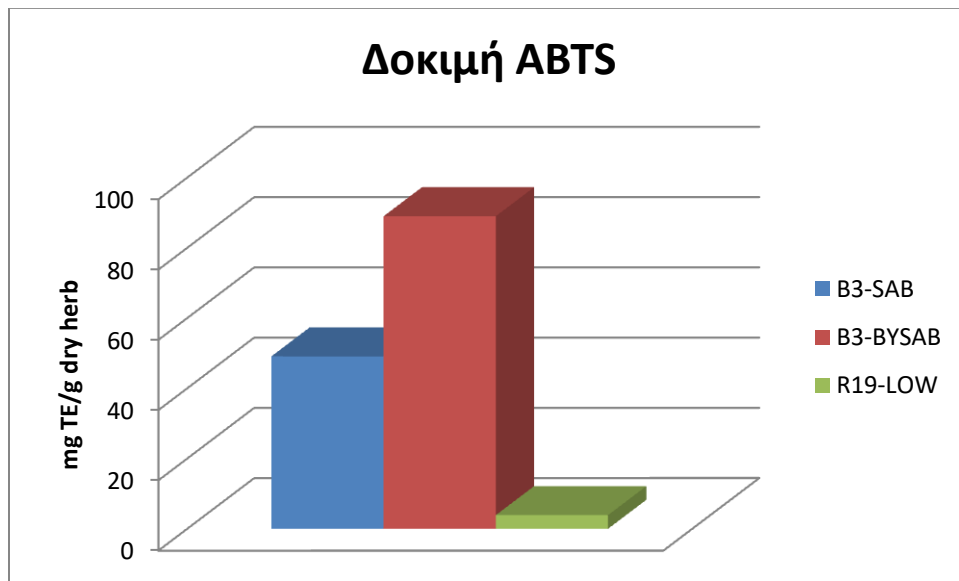
περισσότερα φαινολικά σε σχέση με το βέλτιστο δείγμα του φυτού (39 έναντι 24,3 mg GAE/g δείγματος). Το γεγονός αυτό, πιθανόν οφείλεται στην μέθοδο της ατμοαπόσταξης που εφαρμόστηκε στο φυτό για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος της ατμοαπόσταξης είναι πιο ήπια από άλλες μεθόδους, όπως είναι η υδροαπόσταξη και η αύξηση της θερμοκρασίας λόγω του βρασμού του διαλύτη δε γίνεται απευθείας στο δείγμα (αφού δε βρίσκεται στον ίδιο χώρο με τον διαλύτη απόσταξης). Παρόλα αυτά οι θερμοί ατμοί είναι αυτοί που διέρχονται στη συνέχεια από το δείγμα σαμπούκου, αποστάζοντας τα αιθέρια έλαια και δημιουργώντας το στερεό παραπροϊόν. Η ήπια λοιπόν άνοδος της θερμοκρασίας λόγω των ατμών μπορεί να μην καταστρέφει τα φαινολικά της αρχικής δρόγης, αλλά αντιθέτως να διασπά και κάποιους γλυκοζίτες φαινολικών ενώσεων, απελευθερώνοντας ελεύθερες μορφές φαινολικών (είτε οξέα είτε φλαβονοειδή) αυξάνοντας έτσι, το φαινολικό περιεχόμενο του παραπροϊόντος (Řebíčková et al., 2020).

Έπειτα, όσον αφορά τα δείγματα 2 (B3_BY SAB) και 3 (R19_LOW), εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις μεθόδους εκχύλισης και στο τελικό φαινολικό περιεχόμενο, ενώ το μόνο κοινό τους στοιχείο είναι ότι έχουν προκύψει και τα δύο από παραπροϊόντα. Πιο συγκεκριμένα με βάση τον Πίνακα 5.1, παρατηρείται ότι το δείγμα 3 έχει παραληφθεί υπό τις ακόλουθες συνθήκες : 100% περιεκτικότητα σε αιθανόλη, 10 λεπτά διάρκεια εκχύλισης, 50 % ενέργεια υπερήχων καθώς και 40 ml διαλύτη ανά γραμμάριο δείγματος. Σε αντίθεση με το best των παραπροϊόντων που εκχυλίστηκε σε συνθήκες : 54,4 % περιεκτικότητα σε αιθανόλη, 40 λεπτά διάρκεια εκχύλισης, 80 % ενέργεια υπερήχων και 37,5 ml διαλύτη ανά γραμμάριο δείγματος (Πίνακας 5.3). Από το Διάγραμμα 5.10 και τον αντίστοιχο Πίνακα 5.4, είναι εμφανές ότι το βέλτιστο δείγμα των παραπροϊόντων υπερισχύει σε φαινολικά σε σχέση με το δείγμα των χαμηλών φαινολικών (39 έναντι 1,21 mg GAE/g δείγματος). Ξεκινώντας από την περιεκτικότητα της αιθανόλης, σύμφωνα με μελέτη, χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη για εκχύλιση υπερήχων σε συγκέντρωση 10 % έως 90 % με τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές. Η μελέτη έδειξε, ότι το περιεχόμενο των φαινολικών αυξήθηκε όταν η περιεκτικότητα της αιθανόλης έφτανε μέχρι το 50 % και μετά από αυτό το ποσοστό (50 έως 100 %), η τιμή του TPC εμφάνισε καθοδική πορεία . Πράγματι, η μελέτη επιβεβαιώνεται και στο παρών πείραμα καθώς το δείγμα 3 (R19_LOW) έχει 100% περιεκτικότητα σε αιθανόλη και

εμφάνισε λιγότερα φαινορικά σε σχέση με το δείγμα 2 (Best παραπροϊόντος) που έχει 54,4 % αιθανόλη. Ο χρόνος είναι επίσης μια σημαντική παράμετρος, καθώς όσο περισσότερο διαρκεί η εκχύλιση τόσο πιο αποδοτική είναι, με τη συνθήκη να εξαρτάται και από την ευαισθησία των ενώσεων-στόχων σε δυσμενείς συνθήκες όπως είναι η υψηλή θερμοκρασία, καθώς σε υψηλές θερμοκρασίες η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης είναι πιθανό να καταστρέψει θερμοευαίσθητες ενώσεις. Ωστόσο, στην προκειμένη περίπτωση, τα δείγματα κατά την εκχύλιση ήταν τοποθετημένα σε παγόλουτρο για την διατήρηση της θερμοκρασίας σε σταθερά επίπεδα. Επομένως, επειδή στο best του παραπροϊόντος η εκχύλιση διήρκησε 40 λεπτά και στο low 10 λεπτά, μπορεί να αιτιολογηθεί η μεταξύ τους διαφορά ως προς το φαινολικό περιεχόμενο. Τέλος, όσον αφορά την ενέργεια των υπερήχων, σύμφωνα με μελέτη που εστίασε στην εκχύλιση πολυφαινόλων από σπόρους σταφυλιών (Da Porto et al., 2013) με την αύξηση της ενέργειας των υπερήχων αυξήθηκε και η απόδοση σε πολυφαινόλες, γεγονός που επιβεβαιώνεται και εδώ επειδή στο best του παραπροϊόντος η ενέργεια ήταν 80 % και στο low 50 %. Τέλος, τα δύο δείγματα δεν μπορούν να συγκριθούν ουσιαστικά ως προς την αναλογία διαλύτη/δείγματος καθώς είναι παρόμοια και στα δύο δείγματα (37,5 mL/g στο best και 40 mL/g στο low) και επιπλέον, σύμφωνα με το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 5.1), η αναλογία διαλύτη/δείγματος δεν επιδρά σημαντικά στο αποτέλεσμα της παρούσας εκχύλισης (Dzah et al., 2020) (Dzah & Dzigbor, 2023).

5.2.1.2 Σύγκριση ως προς την αντιριζική δράση

Παρατηρώντας τον Πίνακα 5.4 καθώς και το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.11), είναι εμφανές ότι τα τρία εκχυλίσματα ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και άρα παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές στην αντιριζική τους δράση, δηλαδή στην περιεκτικότητα ενώσεων που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, εκφρασμένη σε ισοδύναμα της ουσίας Trolox.



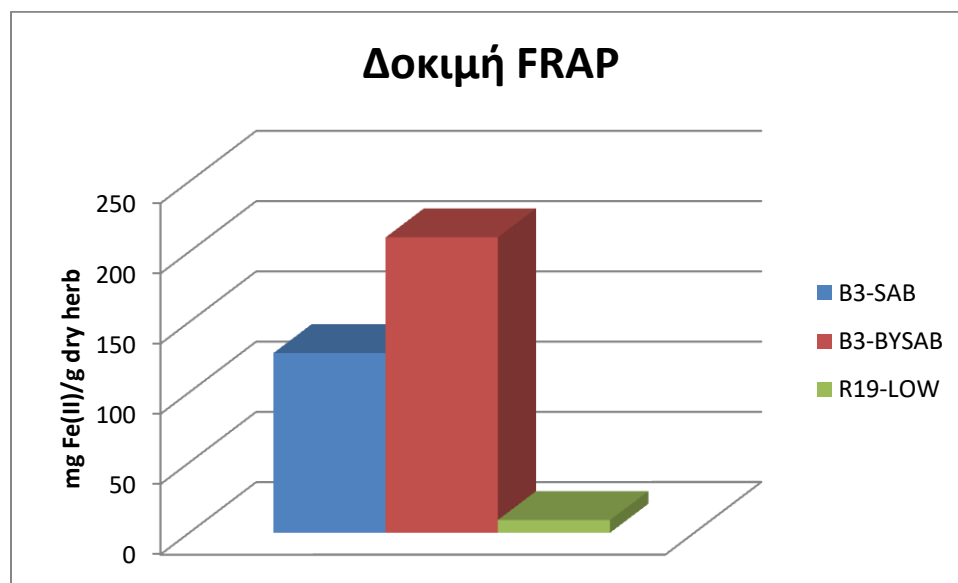
Διάγραμμα 5.11 : Συγκριτική απεικόνιση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών, μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά g δείγματος

Οι ενώσεις που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο οι φαινολικές, επομένως η αυξημένη αντιριζική δράση ενός εκχυλίσματος δεν συνάδει απαραίτητα με την μεγάλη περιεκτικότητα του σε φαινολικά, αλλά πολύ περισσότερο με το είδος των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτό (Deetae et al., 2012). Τα 3 εκχυλίσματα που απεικονίζονται στο Διάγραμμα 5.11, δεν είναι το ίδιο πλούσια σε ενώσεις που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα, το βέλτιστο δείγμα των παραπροϊόντων (B3_BYSAB), έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε Trolox (83 mg TE/g δείγματος) σε σχέση με το βέλτιστο του φυτού (B3_SAB) που έχει 49,1 mg TE/g δείγματος και το

δείγμα με τα χαμηλά φαινολικά (R19_LOW) που έχει 3,89 mg TE/g δείγματος. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι το εκχύλισμα του παραπροϊόντος, όπως αναλύθηκε και προηγουμένως, μετά την εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά (Πίνακας 5.4), άρα και μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες είτε ανεξάρτητα είτε μέσω συνεργιστικών φαινομένων. Με το ίδιο σκεπτικό, επειδή τα υπόλοιπα δύο δείγματα έχουν μικρότερο ποσοστό φαινολικών ενώσεων, εμφανίζουν μικρότερη αντιριζική δράση.

5.2.1.3 Σύγκριση ως προς την αντιοξειδωτική δράση

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.4 και το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.12), τα τρία εκχυλίσματα παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική ή αναγωγική τους δράση.



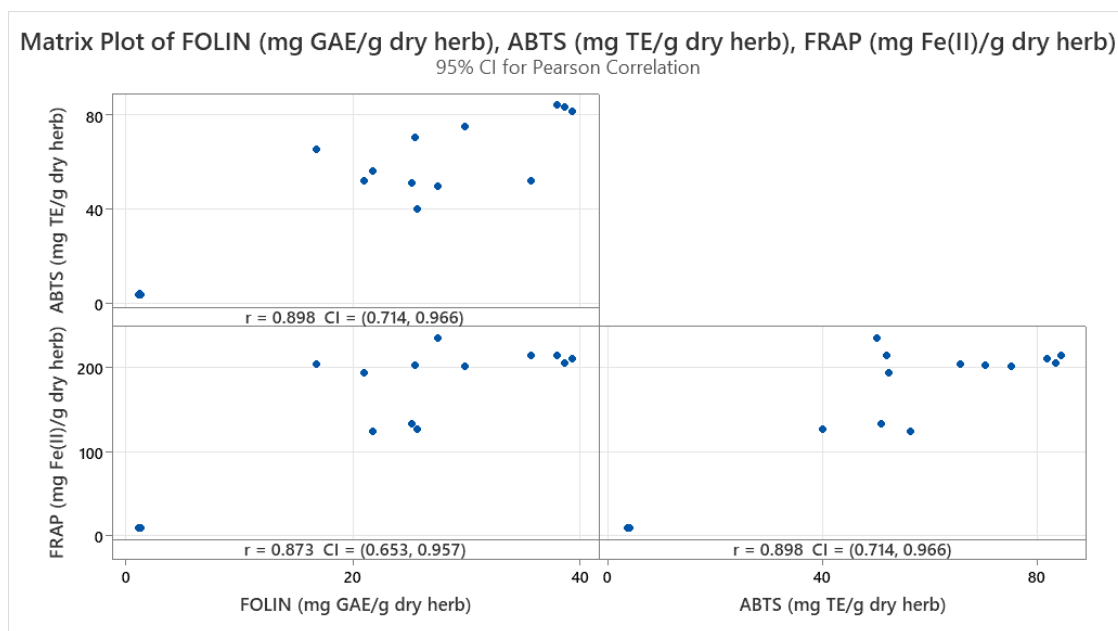
Διάγραμμα 5.12 : Συγκριτική απεικόνιση της ποσότητας Fe(III) που ανήχθη σε Fe(II), μεταξύ των βέλτιστων εκχυλισμάτων του φυτού και του παραπροϊόντος και του εκχυλίσματος με τα χαμηλότερα φαινολικά, εκφρασμένη σε mg Fe(II) ανά g δείγματος

Πιο συγκεκριμένα, το βέλτιστο εκχύλισμα του παραπροϊόντος (B3_BY SAB), δείχνει να ανάγει μεγαλύτερες ποσότητες Fe(III) σε Fe(II) (210,2 mg Fe(II)/ g δείγματος), σε σχέση με το βέλτιστο του φυτού (B3_SAB) και το δείγμα με τα χαμηλά φαινολικά (R19_LOW) που ανάγουν ποσότητες 127,9 και 9,05 mg Fe(II)/ g δείγματος αντίστοιχα. Άρα το βέλτιστο του παραπροϊόντος έχει περισσότερα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα του δείγματος με τα παραπροϊόντα, σε φαινολικά. Το φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζει ιδιαίτερα θετική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Σύμφωνα με έρευνα των (Van Hung, 2016), δημητριακά με υψηλή περιεκτικότητα σε φερούλικό οξύ όπως το καλαμπόκι, το ρύζι και το σιτάρι εμφάνισαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση η οποία αξιολογήθηκε μέσα από δοκιμές όπως η μέθοδος Rancimat (μελέτη στην οποία αντικείμενο εξέτασης αποτελεί το χρονικό διάστημα που ένα έλαιο μπορεί να διατηρηθεί μη οξειδωμένο) καθώς και η αναστολή της οξείδωσης της ανθρώπινης LDL χοληστερόλης. Παρόμοια έρευνα εφαρμόστηκε και σε εκχυλίσματα από κριθάρι και βρώμη, στα οποία κυριαρχούσε το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

5.2.2 Σύγκριση δοκιμών Folin-Ciocalteu, FRAP, ABTS με χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson

Αφού συγκρίθηκαν τα δείγματα ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική και την αντιριζική τους δράση, σειρά είχε η σύγκριση μεταξύ των φασματοφωτομετρικών μεθόδων. Η σύγκριση αυτή επιτεύχθηκε, μέσω του προγράμματος Minitab, μέσω μίας στατιστικής ανάλυσης που βασίζεται στο συντελεστή συσχέτισης Pearson, θέτοντας ως παραμέτρους τις μεθόδους Folin, FRAP και ABTS καθώς και τις τιμές που καταγράφηκαν από τα δείγματα στην ενότητα 5.2.1 για κάθε μέθοδο ξεχωριστά. Κριτήριο επιλογής των τριών μεθόδων για την μεταξύ τους σύγκριση, εκτός του ότι εφαρμόστηκαν πειραματικά για την παρούσα πτυχιακή εργασία, ήταν το γεγονός ότι από την ανάλυση των αποτελεσμάτων τους εξάγονται όλο και περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την πιθανή ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ολικού

φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σαμπούκου και της αντιοξειδωτικής και αντιριζικής τους δράσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5.13) :



Διάγραμμα 5.13 : Διαγραμματική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ των φασματοφωτομετρικών μεθόδων FOLIN, FRAP, ABTS σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης Pearson

Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson, συμβολίζεται με το γράμμα (r) και λαμβάνει τιμές από -1 έως $+1$ που αναφέρονται σε μια άρτια γραμμική σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων παραμέτρων με αρνητικό και θετικό πρόσημο, αντίστοιχα. Το θετικό συμβολίζει μία ευθέως ανάλογη συσχέτιση και το αρνητικό μία αντιστρόφως ανάλογη. Τιμές του συντελεστή που ξεπερνούν την τιμή $0,5$ εκφράζουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, εστιάζοντας στα δεδομένα του Διαγράμματος 5.13, παρατηρείται ότι όλες οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεθόδων FOLIN, FRAP και ABTS έδειξαν $r > 0,5$. Ειδικότερα, συσχέτιση FOLIN-ABTS = $0,898$, συσχέτιση FOLIN-FRAP = $0,873$, συσχέτιση ABTS-FRAP = $0,898$. Από τα προαναφερόμενα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι εξεταζόμενες μέθοδοι έχουν ευθέως ανάλογη γραμμική σχέση μεταξύ τους. Η πολύ ικανοποιητική συσχέτιση

μεταξύ των εξεταζόμενων φασματοφωτομετρικών μεθόδων, σύμφωνα με τους (Deetae et al., 2012), οφείλεται στην πιθανή ύπαρξη πολυφαινολών (ιδιαίτερα φλαβονοειδών) που ασκούν σημαντική επίδραση στην αποσιδήρωση των μετάλλων (αντιοξειδωτική ικανότητα, δοκιμή FRAP) και στην ικανότητα μεταφοράς υδρογόνου και ηλεκτρονίων (αντιριζική ικανότητα, δοκιμή ABTS).

6. Συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές

- Στόχο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αποτελεί η βελτιστοποίηση της εκχύλισης παραπροϊόντων του αρωματικού φυτού *Sambucus nigra* L., μέσω υπερήχων για την ανάκτηση και την περαιτέρω αξιοποίηση φαινολικών ουσιών. Στην μελέτη έλαβαν μέρος δύο ειδών δείγματα, τα οποία αντιστοιχούσαν στην δρόγη και στα παραπροϊόντα του φυτού.
- Ο σαμπούκος επιλέχθηκε ως αντικείμενο εξέτασης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε φλαβονοειδή και πολυφαινολικά, ενώσεις που στρέφουν το ενδιαφέρον πάνω του για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.
- Από την εφαρμογή του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, σύμφωνα με την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM), σχετικά με τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα :
- Ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης για το αρωματικό φυτό ήταν τα 40 λεπτά, σε συνθήκες έντασης υπερήχων 80 % (W), περιεκτικότητας σε αιθανόλη στον διαλύτη 54,4% (v/v) και αναλογία διαλύτη/δείγματος περίπου 38 mL/g (Πίνακας 5.3, Πείραμα Best 3).

- Όσον αφορά την ξηρή δρόγη σαμπούκου, τα χαμηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων εμφανίστηκαν σε εκχυλίσαις που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά (100 %) ως διαλύτης η αιθανόλη.
- Ο παράγοντας που ασκεί την σημαντικότερη επίδραση στην εκχύλιση, σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης των παραγόντων (Πίνακας 5.2) και το ραβδόγραμμα Pareto (Ραβδόγραμμα 5.1.) είναι η % περιεκτικότητα της αιθανόλης στο διαλύτη.
- Σχετικά με την σύγκριση του ολικού φαινολικού περιεχομένου μεταξύ ξηρής δρόγης και παραπροϊόντων, μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο δείγματος, εμφάνισαν τα παραπροϊόντα (39 mg/g ξηρού δείγματος) έναντι της ξηρής δρόγης (24,3 mg/g ξηρού δείγματος).
- Η διαφορά αυτή, πιθανών να οφείλεται στην προκατεργασία των δύο δειγμάτων. Για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της ατμοαπόσταξης στο φυτό, η οποία είναι πιο ήπια από άλλες μεθόδους, όπως είναι η υδροαπόσταξη και η αύξηση της θερμοκρασίας λόγω του βρασμού του διαλύτη δε γίνεται απευθείας στο δείγμα, καθώς δείγμα και διαλύτης βρίσκονται σε διαφορετικούς χώρους. Ωστόσο, από το δείγμα του σαμπούκου διέρχονται οι θερμοί ατμοί, αποστάζοντας τα αιθέρια έλαια και δημιουργώντας το στερεό παραπροϊόν. Η ήπια λοιπόν άνοδος της θερμοκρασίας λόγω των ατμών μπορεί να μην καταστρέφει τα φαινολικά της αρχικής δρόγης, αλλά συντελεί στην διάσπαση κάποιων γλυκοζιτών φαινολικών ενώσεων, απελευθερώνοντας ελεύθερες μορφές φαινολικών (είτε οξέα είτε φλαβονοειδή) αυξάνοντας έτσι, το φαινολικό περιεχόμενο του παραπροϊόντος.
- Σχετικά με την αντιριζική δράση των εκχυλισμάτων, το βέλτιστο δείγμα των παραπροϊόντων εμφάνισε μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, εκφρασμένη σε συγκέντρωση της ουσίας Trolox (83 mg TE/g δείγματος) σε σχέση με το βέλτιστο του φυτού (49,1 mg TE/g δείγματος).

- Η διαφορά πιθανών οφείλεται στην υπεροχή του εκχυλίσματος του παραπροϊόντος σε φαινολικές ουσίες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu (Πίνακας 5.4), που αποτελούν την πλειοψηφία των ενώσεων που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες είτε ανεξάρτητα είτε μέσω συνεργιστικών φαινομένων.
- Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, το βέλτιστο εκχύλισμα του παραπροϊόντος, εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση στην αναγωγή του Fe(III) σε Fe(II) (210,2 mg Fe(II)/ g δείγματος), σε σχέση με το βέλτιστο του φυτού (127,9 mg Fe(II)/ g δείγματος).
- Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα του δείγματος των παραπροϊόντων, σε φαινολικά, καθώς το φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζει ιδιαίτερα θετική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.
- Μετά από εφαρμογή στατιστικής ανάλυσης που βασίστηκε στο συντελεστή συσχέτισης Pearson, θέτοντας ως παραμέτρους τις μεθόδους Folin, FRAP και ABTS καθώς και τις τιμές που καταγράφηκαν από τα δείγματα για κάθε μέθοδο ξεχωριστά (Ενότητα 5.2.1), εξήχθη το συμπέρασμα ότι οι εξεταζόμενες μέθοδοι έχουν ευθέως ανάλογη γραμμική σχέση μεταξύ τους και πολύ ικανοποιητική συσχέτιση.
- Ως μελλοντικές προοπτικές για την ερευνητική επέκταση και την εξέλιξη της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα μπορούσαν να αναφερθούν :
- Η εύρεση του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων του σαμπούκου, με την βοήθεια της φασματοσκοπίας υπέρυθρου (IR) καθώς και της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC-MS), έτσι ώστε να συσχετιστεί η αντιοξειδωτική και η αντιριζική δράση των εκχυλισμάτων με συγκεκριμένες ενώσεις ή κατηγορίες τους.

- Η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης σε αλλοιογόνους μικροοργανισμούς τροφίμων, για την εξέταση της χρήσης των εκχυλισμάτων παραπροϊόντων σαμπούκου ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε διάφορα τρόφιμα, όπως είναι τα κρεατοσκευάσματα.
- Η μελέτη επιπλέον δειγμάτων σαμπούκου (άλλα είδη, από άλλες γεωγραφικές περιοχές, άλλες περιόδους/μήνες καλλιέργειας και συγκομιδής) για την περαιτέρω εξερεύνηση και άλλων παραμέτρων στο ολικό φαινολικό περιεχόμενου του σαμπούκου.

7. Σχετική Βιβλιογραφία

1. Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., & Rao, U. J. S. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.004>
2. Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i3>
3. Ameen, F., AlNadhari, S., & Al-Homaidan, A. A. (2021). Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>
4. Arora, D. K., Bridge, P. D., & Bhatnagar, D. (Eds.). (2004). *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Marcel Dekker.
5. Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., & Mavromatis, A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(5), 475–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01111.x>
6. Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-181. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>
7. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

8. Bartak, M., Lange, A., Słońska, A., & Cymerys, J. (2020). Antiviral and healing potential of *Sambucus nigra* extracts. *Bionatura*, 5, 1264–1270. <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.18>
9. Bharat Helkar, P., & Sahoo, A. (2016). Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *International Journal of Waste Resources*, 6(3). <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000248>
10. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
11. Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
12. Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., & Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 43, 360–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.006>
13. Dulf, F. V., Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2016). Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry*, 209, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.016>
14. Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
15. Dzah, C. S., & Dzigbor, A. (2023). Ultrasound assisted extraction: A relook at solvent to material ratio, its effects on process efficiency and how it can be exploited for different uses. *Journal of Food Process Engineering*, 46(7), e14339. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14339>

16. 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), Article 6. <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>
17. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
18. Gul, K., Yousuf, B., Singh, A. K., Singh, P., & Wani, A. A. (2015). Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.06.002>
19. Hennet, T. (2019). Collagen glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 56, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.015>
20. Homayouni, A., Alizadeh, M., Alikhah, H., & Zijah, V. (2012). Functional Dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. In E. Rigobelo (Ed.), *Probiotics*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48797>
21. Keller, N. P., & Turner, G. (Eds.). (2012). *Fungal secondary metabolism: Methods and protocols*. Humana Press.
22. Ma, Y., Teng, A., Zhao, K., Zhang, K., Zhao, H., Duan, S., Li, S., Guo, Y., & Wang, W. (2020). A top-down approach to improve collagen film's performance: The comparisons of macro, micro and nano sized fibers. *Food Chemistry*, 309, 125624. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125624>
23. Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160–176. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>

24. Morales, P., Barros, L., Ramírez-Moreno, E., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Xoconostle fruit (*Opuntia matudae* Scheinvar cv. Rosa) by-products as potential functional ingredients. *Food Chemistry*, *185*, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.012>
25. Oechsle, A. M., Häupler, M., Weigel, F., Gibis, M., Kohlus, R., & Weiss, J. (2016). Modulation of extruded collagen films by the addition of co-gelling proteins. *Journal of Food Engineering*, *171*, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.004>
26. Okino Delgado, C. H., & Fleuri, L. F. (2016). Orange and mango by-products: Agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description—A review. *Food Reviews International*, *32*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1041183>
27. Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Ramos, Ó. L., Xavier Malcata, F., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2016). Production of Whey Protein-Based Aggregates Under Ohmic Heating. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(4), 576–587. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1651-4>
28. Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.016>
29. Porter, R. S., & Bode, R. F. (2017). A Review of the Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) Products. *Phytotherapy Research*, *31*(4), 533–554. <https://doi.org/10.1002/ptr.5782>
30. Rabetafika, H., Brahim, B., Blecker, C., & Richel, A. (2014). Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, *40*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.004>

31. Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61–81. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx004>
32. Shen, X., Zhang, M., Bhandari, B., & Gao, Z. (2019). Novel technologies in utilization of byproducts of animal food processing: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3420–3430. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1493428>
33. Shershenkov, B., & Suchkova, E. (2015). The Direct Microbial Synthesis of Complex Bioactive Compounds as Perspective Way of Milk Whey Utilization. *Energy Procedia*, 72, 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.06.046>
34. Shui, G., & Leong, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.048>
35. Silver, F. H., Jaffe, M., & Shah, R. G. (2018). 11—Structure and behavior of collagen fibers. In A. R. Bunsell (Ed.), *Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres (Second Edition)* (pp. 345–365). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101272-7.00011-0>
36. Smith, R. M. (2003). Before the injection—Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1), 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9)
37. Soroushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. I. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials*, 31(1), 1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
38. Surjushe, A., Vasani, R., & Saple, D. G. (2008). ALOE VERA: A SHORT REVIEW. *Indian Journal of Dermatology*, 53(4), 163–166. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.44785>

39. Suurs, P., & Barbut, S. (2020). Collagen use for co-extruded sausage casings – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.011>
40. Uden, G., Thines, E., & Schöffler, A. (Eds.). (2016). *Host - pathogen interaction: Microbial metabolism, pathogenicity and antiinfectives*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
41. *UNEP Food Waste Index Report 2021*. (2021, March 4). UNEP - UN Environment Programme. <http://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021>
42. Walia, A. (2011). Isolation of an antifungal protein from kiwifruits. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 1, 129–131.
43. Xu, J., Liu, F., Goff, H. D., & Zhong, F. (2020). Effect of pre-treatment temperatures on the film-forming properties of collagen fiber dispersions. *Food Hydrocolloids*, 107, 105326. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105326>
44. Deetae, P., Parichanon, P., Trakunleewatthana, P., Chanseetis, C., & Lertsiri, S. (2012). Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food Chemistry*, 133(3), 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.012>
45. Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-181. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>
46. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>
47. Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3458–3464. <https://doi.org/10.1021/jf0200570>

48. Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—Recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, *12*(11), 401–413. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)
49. Greff, B., Lakatos, E., Szigeti, J., & Varga, L. (2021). Co-composting with herbal wastes: Potential effects of essential oil residues on microbial pathogens during composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *51*(5), 457–511. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1732780>
50. Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.002>
51. Li, Y., Zhuang, S., Liu, Y., Zhang, L., Liu, X., Cheng, H., Liu, J., Shu, R., & Luo, Y. (2020). Effect of grape seed extract on quality and microbiota community of container-cultured snakehead (*Channa argus*) fillets during chilled storage. *Food Microbiology*, *91*, 103492. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103492>
52. Li, B. B., Smith, B., & Hossain, Md. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, *48*(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>
53. Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii* rhizoma with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(3), 846–854. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.11.007>
54. Brahmi, F., Blando, F., Sellami, R., Mehdi, S., De Bellis, L., Negro, C., Haddadi-Guemghar, H., Madani, K., & Makhoulf-Boulekbache, L. (2022). Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. Flowers and comparison with conventional procedures. *Industrial Crops and Products*, *184*, 114977. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114977>

55. Van Hung, P. (2016). Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 25–35. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.708909>
56. de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review. *Industrial Crops and Products*, 175, 114261. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>
57. Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., & Ye, X.-Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.012>
58. El Baakili, A., Fadil, M., & Es-Safi, N. E. (2023). Ultrasonic-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant activity of Moroccan *Retama sphaerocarpa* L. leaves: Simultaneous optimization by response surface methodology and characterization by HPLC/ESI-MS analysis. *Heliyon*, 9(6), e17168. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17168>
59. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
60. Řebíčková, K., Bajer, T., Šilha, D., Ventura, K., & Bajerová, P. (2020). Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of *Laurus nobilis* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00834-y>
61. Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>

62. Umar Lule, S., & Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, 21(4), 367–388. <https://doi.org/10.1080/87559120500222862>
63. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
64. Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M.-J., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811–842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>
65. Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
66. Picó, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 84–99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005>
67. Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119–128. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01184-1)
68. Altemimi, A., Watson, D. G., Choudhary, R., Dasari, M. R., & Lightfoot, D. A. (2016). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*, 11(2), e0148758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>
69. Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Chapter 11—Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. Στο H. Dominguez González & M. J. González Muñoz (Επιμ.), *Water Extraction of Bioactive Compounds* (σσ. 291–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>

70. Viapiana, A., & Wesolowski, M. (2017). The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of Sambucus nigra L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 82–87. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0594-x>

ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ :

1. [Elder Trees | LoveToKnow](#)
2. [What Is "Brewers Spent Grain?" – ReGrained](#)
3. [ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ - \(docplayer.gr\)](#)
4. [Ultrasonic Processor, Ultrasonic Dispersion Equipment, Ultrasonic Liquid Emulsifier - Hangzhou Precision \(hzpmsonic-en.com\)](#)