



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
& ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μεθανολικά εκχυλίσματα ωμής ψίχας φιστικιών Αιγίνης (*Pistacia vera*)
με ανάδευση υποβοηθούμενης από υπερήχους: Υγροχρωματογραφική
και φασματοσκοπική μελέτη καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής
και αντιμικροβιακής τους δράσης

Γεωργία Ν. Κορδατζάκη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μεθανολικά εκχυλίσματα ωμής ψίχας φιστικιών Αιγίνης (*Pistacia vera*) με ανάδευση υποβοηθούμενης από υπερήχους: Υγροχρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης

Methanolic extracts of Aegina raw pistachio kernel (*Pistacia vera*) using ultrasound stirring technique: Liquid chromatographic and spectroscopic study as well as assessment of its antioxidant and antimicrobial activity

Γεωργία Ν. Κορδατζάκη

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

Μαρούλα Κόκοτου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μεθανολικά εκχυλίσματα ωμής ψίχας φιστικιών Αιγίνης (*Pistacia vera*) με ανάδευση υποβοηθούμενης από υπερήχους: Υγροχρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης

*ΠΜΣ: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας*

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η παραλαβή όξινων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων από την ψίχα φιστικιού ποικιλίας Αιγίνης ελληνικής προέλευσης με σκοπό το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης των φαινολικών του συστατικών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και απομόνωση της ψίχας από τα επιμέρους τμήματα του φιστικιού, δηλαδή του κελύφους και του περικαρπίου. Ακολούθησε η άλεση και η ομογενοποίηση της και έπειτα η απολίπανση με την χρήση πετρελαιοειδών αιθέρα και ανάδευσης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Στην απολίπασμένη ψίχα προστέθηκε μεθανόλη, νερό και υδροχλωρικό οξύ για την μεγιστοποίηση της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών η οποία έγινε με ανάδευση υποβοηθούμενη από υπερήχους και φυγοκέντριση. Τέλος, προκειμένου για την λήψη στερεού όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος έγινε απομάκρυνση των χρησιμοποιηθέντων διαλυτών μέσω του περιστρεφόμενου εξατμιστήρα και της λυοφιλίωσης.

Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος μελετήθηκε μέσω της τεχνικής LC-QTOF-MS. Ταυτοποιήθηκαν 11 φαινολικά συστατικά με τη χρήση πρότυπων ενώσεων. Σε αυτά περιλαμβάνονται το γαλλικό οξύ, το ομογεντισικό οξύ, το γεντισικό οξύ, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το βανιλικό οξύ, η μυρικιτρίνη, το αμπισισικό οξύ, η γαλλική επιγαλοκατεχίνη, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το 4-υδροξυφαινοξυλοξικό οξύ.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας ATR-FTIR, προσδιορίστηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα το φαινολικό προφίλ της ψίχας. Είναι μια τεχνική που εξασφαλίζει σύντομα τόσο την εύκολη προετοιμασία του δείγματος όσο και ανάλυση του, χωρίς να το καταστρέφει.

Το όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος της ψίχας φιστικιού εξετάστηκε, ακόμα, ως προς την αντιοξειδωτική του ικανότητα με τις δοκιμές DPPH και ABTS, και ως προς την περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu.

Το IC50 για τις δοκιμές DPPH και ABTS βρέθηκε ίσο με 1,41 mg/mL και 0,22 mg/mL αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά σύμφωνα με την δοκιμή Folin–Ciocalteu βρέθηκε ίση με 73 mg GA/g DE εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Τέλος, το όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα αξιολογήθηκε ως προς την αντιμικροβιακή του δράση και διαπιστώθηκε αναστολή της ανάπτυξης όλων των βακτηρίων εκτός του *Bacillus subtilis*. Τη μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση την παρουσίασε στα (-) κατά Gram επιλεγμένα βακτήρια, έναντι κυρίως έναντι στον μικροοργανισμό *Pseudomonas fluorescens*.

Επιστημονική περιοχή: Αναλυτική χημεία

Λέξεις κλειδιά: Φιστικιά, ψίχα, ποικιλία Αιγίνης, *Pistacia vera*, όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα, LC–QTOF–MS, φαινολικά, Folin–Ciocalteu, αντιοξειδωτική ικανότητα, DPPH, ABTS, ATR–FTIR, αντιμικροβιακή δράση

Methanolic extracts of raw pistachio kernel (*Pistacia vera*) using ultrasound stirring techniques: Liquid chromatographic and spectroscopic study as well as assessment of its antioxidant and antimicrobial activity

*MSc: Food Quality Control & Hygiene
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry*

Abstract

The subject of the present postgraduate thesis was the collection of acidic hydro-methanolic extracts from the Aegina pistachio kernel, with the purpose of determining the antioxidant and antimicrobial activity of its phenolic compounds.

Initially there was separation and isolation of the kernel from the rest of the pistachio's segments, namely the shell and hull. Afterwards the kernel was ground and homogenised. Then it was degreased, by mixing it with petroleum ether and stirring the mixture with the assistance of ultrasonication. To maximise the efficiency of the extraction of the phenolic compounds, to the degreased kernel, methanol, water and hydrochloric acid were added. The mixture of the above components was supported by stirring assisted by ultrasonication and centrifugation. Finally, in order to obtain the acidic hydro-methanolic extract, all the previously used solvents were removed by placing the sample in a rotating evaporator and using the lyophilization technique.

The determination of the phenolic compounds of the acidic hydro-methanolic extract was studied by applying the LC-QTOF-MS technique. In total 11 phenolic compounds were identified using standard compounds. The identified phenolic components include: gallic acid, homogentisic acid, gentisic acid, catechin, epicatechin, vanillic acid, myricitrin, abscisic acid, gallate epicatechin, 4-hydroxybenzoic acid, and 4-hydroxyphenylacetic acid.

With the use of ATR-FTIR spectroscopy, it was possible to define, in a short period of time, the phenolic profile of the pistachio kernel. It is a technique that ensures shortly both easy preparation of the sample and the analysis of it, without destructing it.

The acidic hydro-methanolic extract of the Aegina pistachio's kernel was additionally examined for its antioxidant capacity by applying the DPPH and ABTS test. As for its content in phenolic compounds, it was tested with the Folin-Ciocalteu test. The IC₅₀

for the DPPH and ABTS tests was found to be 1.41 mg/mL and 0.22 mg/mL accordingly. The content in phenolic compounds, according to the Folin–Ciocalteu test, was found to be 73 mg GA/g DE expressed in terms of gallic acid equivalents.

Finally, the acidic hydro-methanolic extract was examined on its antimicrobial activity and it was confirmed that the growth of all bacteria, except for *Bacillus subtilis*, was restrained. It was noticed that the strongest inhibitory action was observed against the (-) Gram-selected bacteria, particularly against the microorganism *Pseudomonas fluorescens*.

Scientific field: Analytical Chemistry

Key words: Aegina pistachio, kernel, Pistacia vera, acidic hydro-methanolic extract, LC–QTOF–MS, phenolic, Folin–Ciocalteu, antioxidant activity, DPPH, ABTS, ATR–FTIR, antimicrobial activity

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, θα ήταν αδύνατον να μην ευχαριστήσω εκείνους που συνέβαλαν στην εκπόνηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς και να εκφράσω τη βαθιά εκτίμηση μου και τον σεβασμό μου προς τον κ. Χρήστο Παππά, Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανάθεση της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Τον ευχαριστώ πολύ για την επιλογή του συγκεκριμένου θέματος που αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον ερευνητικό ζήτημα και που μου έδωσε την δυνατότητα να εξοικειωθώ με χημικές και μικροβιολογικές τεχνικές και μεθόδους. Τέλος, τον ευχαριστώ για την διαρκή υποστήριξη και βοήθεια του σε οποιαδήποτε δυσκολία ήρθα αντιμέτωπη.

Ακολουθώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παντελή Νατσκούλη, Ερευνητή Γ' του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων στον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό (ΕΛΓΟ) ΔΗΜΗΤΡΑ για την πολύτιμη καθοδήγησή του στην πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων.

Ευχαριστώ βαθύτατα την διδάκτορα Λυδία Βαλάση η οποία έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Η Λυδία ήταν παρούσα πάντα με διάθεση και πάθος για τον κλάδο της χημείας και παρείχε πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος καθώς και της συγγραφής της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμα, την υποψήφια διδάκτορα Ελευθέρια Καπαράκου για την καθοδήγηση και την άμεση ανταπόκριση στις ανάγκες που παρουσιάζονταν.

Οφείλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ τόσο στους αξιοσεβαστους συναδέλφους μου, Καλλιόπη, Χριστίνα, Βασιλική και Χαρά που είχα την απέραντη χαρά και την τύχη να γνωρίσω με την έναρξη του μεταπτυχιακού προγράμματος και που μου παρείχαν συνεχή κίνητρο και συντροφιά σε αυτό το πολύ όμορφο κεφάλαιο της ζωής μου όσο και σε πολύ σημαντικά πρόσωπα για εμένα όπως ο Ανδρέας, η Αντωνία και η Δέσποινα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους δικούς μου ανθρώπους για την αγάπη και την ανεκτίμητη υποστήριξή τους.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract	4
Ευχαριστίες	6
Περιεχόμενα.....	7
Κατάλογος πινάκων	11
Κατάλογος εικόνων.....	12
Κατάλογος διαγραμμάτων	14
Μέρος Α. Θεωρητικό μέρος	15
A.1 Τα χαρακτηριστικά της Φιστικιάς	15
• A.1.1 Μορφολογία, κύκλος ζωής και βοτανική περιγραφή	15
• A.1.2 Η πορεία του καρπού από τη συγκομιδή έως την κατανάλωση	17
• A.1.3 Εδαφοκλιματικές συνθήκες	18
• A.1.4 Ίδανικές συνθήκες αποθήκευσης	18
Θερμοκρασία και υγρασία	18
Ατμόσφαιρα	19
• A.1.5 Γεωγραφική εξάπλωση και Παγκόσμια παραγωγή φιστικιάς	19
• A.1.6 Η καλλιέργεια της φιστικιάς στην Ελλάδα	20
• A.1.7 Θρεπτική αξία και χρήσεις.....	20
A.2 Φαινολικά συστατικά	21
• A.2.1 Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα.....	21
• A.2.2 Αντι-μικροβιακή και αντι-ική ικανότητα των πολυφαινολών	23
A.3 Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	24
• A.3.1 Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed, FTIR, spectroscopy).....	24
• A.3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR).....	24
• A.4 Υγροχρωματικές τεχνικές	25
• A.4.1 Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF-MS)	25

A.5 Περιγραφή τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας	26
• A.5.1 Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας	26
• A.5.2 Λυοφιλίωση	26
• A.5.3 Ανάδευση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)	26
A.6 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	27
• A.6.1 Δοκιμή DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	27
• A.6.2 Δοκιμή ABTS.....	28
• A.6.3 Δοκιμή Folin- Ciocalteau	28
A.7 Σκοπός και αντικείμενο μελέτης.....	28
Μέρος Β. Υλικά και Μέθοδοι	29
B.1 Δειγματοληψία – Παραλαβή ψίχας	29
B.2 Άλεση-Ομογενοποίηση	30
B.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε υγρασία	33
• B.3.1 Πειραματική διαδικασία.....	33
• B.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	34
• B.3.3. Συμπέρασμα	34
B.4 Απολίπανση δείγματος.....	35
B.5. Παρασκευή οξινισμένου υδρομεθανολικού διαλύματος	37
B.6. Παραλαβή όξινων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με την τεχνική της ανάδευσης υποβοηθούμενης από υπερήχους	37
B.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικού με τις δοκιμές DPPH, ABTS	40
• B.7.1 Δοκιμή DPPH.....	40
• B.7.1.1 Πειραματική διαδικασία.....	40
• B.7.2 Δοκιμή ABTS.....	42
• B.7.2.1 Πειραματική διαδικασία.....	42
• B.7.3 Αποτέλεσμα-Συζήτηση	43
• B.7.4 Συμπέρασμα	47

B.8 Προσδιορισμός πολικών φαινολών με την δοκιμή Folin-Ciocalteu	48
• B.8.1 Πειραματική διαδικασία.....	48
• B.8.2 Αποτέλεσμα-Συζήτηση	49
• B.8.3 Συμπέρασμα	51
B.9 Φασματοσκοπική ανάλυση φαινολικών συστατικών με την χρήση της τεχνικής FTIR.....	51
• B.9.1 Πειραματική διαδικασία.....	51
• B.9.1.1 Επεξεργασία φασμάτων FTIR.....	51
• B.9.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	52
• B.9.3 Συμπέρασμα	54
B.10 Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (Q-TOF LC-MS)	54
• B.10.1 Πειραματική διαδικασία.....	54
• B.10.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	56
• B.10.3 Συμπέρασμα	57
B.11 Προσδιορισμός αντι-μικροβιακής δράσης του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικιών	58
• B.11.1 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος και προετοιμασία μικροοργανισμών	58
• B.11.2 Ζωτικότητα μικροοργανισμών	59
• B.11.2.1 Πειραματική διαδικασία	59
• B.11.2.2 Συζήτηση-Αποτελέσματα	60
• B.11.3 Μέθοδος καταμέτρησης μικροοργανισμών	60
• B.11.3.1 Πειραματική διαδικασία.....	60
• B.11.3.2 Αποτέλεσμα-Συζήτηση	62
• B.11.4 Αντι-μικροβιακή δράση υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας... 66	
• B.11.4.1 Πειραματική διαδικασία.....	66
• B.11.4.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	67
B.12 Γενικά Συμπεράσματα.....	73

B.13 Ερευνητικές προτάσεις.....	75
B.14 Ξένη Βιβλιογραφία.....	76
B.15 Ελληνική Βιβλιογραφία	80

Κατάλογος πινάκων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Β. Υλικά και Μέθοδοι		
1	Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων και υπολογισμός των μαζών M1, M2, M3	34
2	Μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης σύμφωνα με την δοκιμή DPPH	43
3	Μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης σύμφωνα με την δοκιμή ABTS	44
4	Απορροφήσεις γαλλικού οξέος για τις συγκεντρώσεις 0,012, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 mg/mL	49
5	Απόδοση των κορυφών του φάσματος κοκκομετρημένης ψίχας (Socrates, 2004)	53
6	Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης υγρής χρωματογραφίας	55
7	Παράμετροι οργάνου	55
8	Φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στην ψίχα φιστικιών ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης βάση πρότυπων ενώσεων	56
9	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των φαινολικών συστατικών της ψίχας κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης	58
10	Συνθήκες επώασης μικροοργανισμών	58
11	Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού <i>Escherichia coli</i>	62
12	Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού <i>Pseudomonas fluorescens</i>	63
13	Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού <i>Bacillus subtilis</i>	64
14	Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού <i>Staphylococcus aureus</i>	65
15	Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού <i>E.coli</i>	68
16	Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού <i>Bacillus subtilis</i>	69
17	Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού <i>Staphylococcus aureus</i>	70
18	Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού <i>Pseudomonas fluorescens</i>	71
19	Πίνακας χημικών ενώσεων	81

Κατάλογος εικόνων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Α. Θεωρητικό μέρος		
1	Περικάρπιο (πάνω αριστερά), Ψίχα και Κέλυφος (κάτω δεξιά) (Mandalari et al., 2022)	16
2	Χημική δομή δραστικών καροτενοειδών, στερολών και ρεσβερατρόλης (Mandalari et al., 2022)	21
3	Χημική δομή φαινολικών συστατικών (Tomaino et al., 2010)	23
4	Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας	26
Μέρος Β. Υλικά και Μέθοδοι		
5	Φιστικοθραύστης	29
6	Μπλέντερ με μεταλλικές λεπίδες	30
7	Κόσκινο μεγέθους 500 μm	31
8	Κοκκομέτρηση	32
9	Ψύκτρα καθαρισμού κόσκινων	32
10	Σάκος αποθήκευσης κοκκομετρημένης ψίχας	33
11	Κάψα και ζυγαριά για τη μέτρηση του δείγματος	36
12	Απολίπανση ψίχας	36
13	Λουτρό υπερήχων	38
14	Περιστρεφόμενος συμπυκνωτήρας	38
15	Δείγμα φαινολικών συστατικών πριν την έναρξη λειτουργίας του περιστρεφόμενου συμπυκνωτήρα	39
16	Δείγμα φαινολικών συστατικών μετά την λήξη λειτουργίας περιστρεφόμενου συμπυκνωτήρα	39
17	Λυοφιλίωση	40
18	Στερεό δείγμα μετά την λήξη της λυοφιλίωσης	40
19	Δοκιμή DPPH: 0,5 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση	45
20	Δοκιμή DPPH: 1 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση	45
21	Δοκιμή DPPH: 2 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση	46
22	Δοκιμή DPPH: 3 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση	46
23	Δοκιμή DPPH: 4 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση	47
24	Δοκιμή ABTS: Όπου A1: 0,05 mg/mg, A2: 0,2 mg/mL, A3: 0,1 mg/mL, A4: 0,05 mg/mL και A5: 0,01 mg/mL	47
25	Μετατροπή του κίτρινου χρώματος του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu σε μπλε μετά την αντίδραση του με το δείγμα φαινολικών συστατικών	49
26	Φάσμα FTIR ανεπεξέργαστης κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού	52
27	Φάσμα απολιπασμένης κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού μετά την χρήση του περιστρεφόμενου εξατμιστήρα	53
28	Φάσμα ξηρού δείγματος φαινολικών συστατικών ψίχας κελυφωτού φιστικιού μετά την λυοφιλίωση	53

29	Χρωματογράφημα δείγματος φαινολικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικιών	56
30	Πορεία δημιουργίας θρεπτικού δ/τος	59
31	Ζωτικότητα	60
32	Δεκαδικές αραιώσεις	61
33	Πληθυσμός μικροοργανισμού <i>E.coli</i> στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	62
34	Πληθυσμός μικροοργανισμού <i>Pseudomonas fluorescens</i> στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	63
35	Πληθυσμός μικροοργανισμού <i>Bacillus subtilis</i> στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	64
36	Πληθυσμός μικροοργανισμού <i>Staphylococcus aureus</i> στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	65
37	Απεικόνιση των βοθρίων και εισαγωγή δείγματος με χρήση μικροπιπέτας	66
38	Επίδραση υδρομεθανολικού δ/τος στην ανάπτυξη μικροοργανισμών	67
39	1 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη μικροοργανισμών	68
40	Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>E.coli</i>	69
41	Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Bacillus subtilis</i>	70
42	Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Staphylococcus aureus</i>	71
43	Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Pseudomonas fluorescens</i>	72

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Β. Υλικά και Μέθοδοι		
1	Διάγραμμα συγκεντρώσεων συναρτήσει της παρεμποδιστικής δράσης σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH	43
2	Διάγραμμα συγκεντρώσεων συναρτήσει της παρεμποδιστικής δράσης σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS	44
3	Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος	50

A.1 Τα χαρακτηριστικά της Φιστικιάς

Στο παρόν μέρος περιγράφονται βασικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας της φιστικιάς, στοιχεία για την γεωγραφική της εξάπλωση καθώς και το πώς αξιοποιείται από τον άνθρωπο. Το είδος *Pistacia vera* είναι αυτό με το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον λόγω του ότι είναι το μόνο από το γένος *Pistacia* με εδώδιμο καρπό (Costa, Silva, Vicente, Oliveira, & Mafra, 2015). Ανήκει στην οικογένεια των Ανακαρδιοδών και είναι από τα πιο δημοφιλή δέντρα λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών που την διακρίνουν όπως το άρωμα, η θρεπτική αξία και οι ευεργετικές ιδιότητες που έχει στην ανθρώπινη υγεία (Sonmezdag, Kelebek, & Selli, 2018).

A.1.1 Μορφολογία, κύκλος ζωής και βοτανική περιγραφή

Είναι δίοικα δέντρα δηλαδή είναι απαραίτητη η ύπαρξη και αρσενικών και θηλυκών δέντρων για να υπάρξει παραγωγή και συνήθως χρειάζεται ένα αρσενικό για κάθε 8 ή 24 θηλυκά δέντρα (Mandalari et al., 2022). Τα θηλυκά και τα αρσενικά άνθη βρίσκονται σε ξεχωριστά δέντρα ενώ ακόμη αυτά ομαδοποιούνται σε συστάδες (Sola-Campoy et al., 2015 - Rauf et al., 2017).

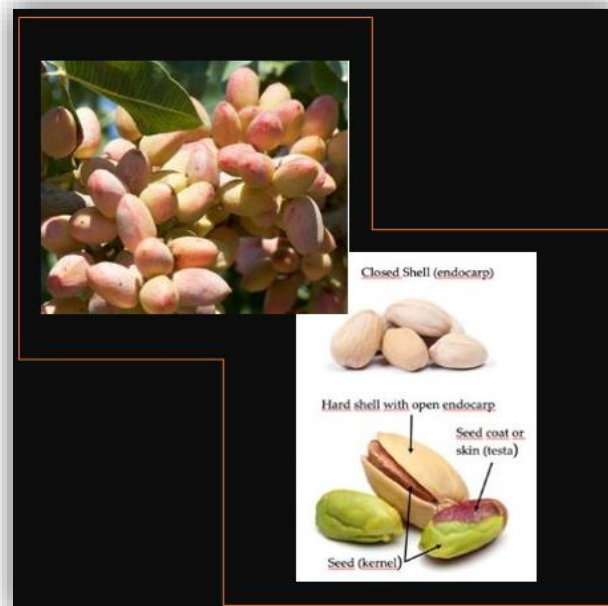
Τα φύλλα είναι σύνθετα αποτελούμενα κυρίως από τρία φύλλα, ενώ μπορεί να φτάσουν και τα πέντε. Το σχήμα αυτών κυμαίνεται από ωοειδές έως επίμηκες και το χρώμα είναι σκούρο πράσινο στην πάνω επιφάνεια και πιο ανοιχτόχρωμο στην κάτω (Kashaninejad & Tabil, 2011).

Οι ρίζες της είναι εκτεταμένες και εισχωρούν βαθιά στο έδαφος, εξασφαλίζοντας μεγάλη αντοχή στην ξηρασία (Ποντίκης, 1996).

Από τον Νοέμβριο, ξεκινά η πτώση των φύλλων και κατά την διάρκεια του χειμώνα βρίσκεται σε λήθαργο. Οι διαδικασίες της βλάστησης και αναπαραγωγής διεξάγονται από τα μέσα Μαρτίου έως τα τέλη Μαΐου (Benny et al., 2022). Συγκεκριμένα στα αρσενικά δέντρα η βλάστηση ξεκινά από αρχές Μαρτίου και στα θηλυκά από τέλη Μαρτίου και διαρκεί μέχρι τέλη Απριλίου έως μέσα Μαΐου (Ποντίκης, 1996).

Ο καρπός είναι δρύπη, σχηματίζεται σε σύνθετους βότρυς και έχει σχήμα επίμηκες και ωοειδές. Υπάρχουν καρποί χωρίς κέλυφος, τα λεγόμενα αράπικα φιστίκια και καρποί με κέλυφος που αναφέρονται ως κελυφωτά φιστίκια (Ferguson et al., 2005). Αποτελείται από τρία μέρη (Εικόνα 2), το σπέρμα ή αλλιώς ψίχα ή ενδοκάρπιο,

η οποία αποτελεί και το εδώδιμο τμήμα του. Αυτό προστατεύεται από ένα σκληρό κρεμμώδες, μη εδώδιμο και λείο κέλυφος (μεσοκάρπιο) εξωτερικά του οποίου βρίσκεται το περικάρπιο ή εξωκάρπιο (φλοιός) του οποίου το χρώμα κυμαίνεται από πράσινο έως κόκκινο κατά την ωρίμανση (Mandalari et al., 2022). Το χρώμα του καρπού κυμαίνεται από φωτεινό έως σκούρο πράσινο ή είναι ένας συνδυασμός μεταξύ πράσινου και κίτρινου. Τα χρώματα αυτά οφείλονται στα περιεχόμενα συστατικά του καρπού και ειδικότερα για το κίτρινο χρώμα ευθύνονται οι κατεχίνες, η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη, για το πράσινο χρώμα οι χλωροφύλλες και για το μωβ χρώμα του περικαρπίου οι ανθοκυανίνες. Κατά την ωρίμανση του καρπού το περικάρπιο από πρασινωπό αρχίζει και αποκτά ένα χρωματισμό μεταξύ κίτρινου και κόκκινου (Mandalari et al., 2022). Όταν το κέλυφος αποκτήσει το μέγιστό του μέγεθος, γύρω στον Ιούνιο, αρχίζει και γεμίζει το εσωτερικό του περιεχόμενο με την ψίχα τον Ιούλιο (Mandalari et al., 2022 - Ferguson et al., 2005). Η ψίχα μεγαλώνει, γεμίζει το κέλυφος, ώσπου κάποια στιγμή κατά τον Αύγουστο το ξεπερνάει σε μέγεθος, προκαλώντας το άνοιγμα του. Το περικάρπιο παραμένει άθικτο καθόλη την διάρκεια του ανοίγματος, προστατεύοντας την ψίχα από έντομα και παθογόνα ενώ μαλακώνει και ξεκολλάει εύκολα από το κέλυφος (Noguera-Artiaga et al., 2018 - Ferguson et al., 2005).



Εικόνα 1 Περικάρπιο (πάνω αριστερά), Ψίχα και Κέλυφος (κάτω δεξιά) (Mandalari et al., 2022)

Η ανάπτυξη του καρπού διακρίνεται από τρία διαφορετικά στάδια:

- Στάδιο 1, το οποίο ξεκινά από την στιγμή που αρχίζει και αναπτύσσεται ο καρπός και ολοκληρώνεται όταν ο καρπός λάβει το μέγιστο μέγεθος.
- Στάδιο 2, περιλαμβάνει το διάστημα κατά το οποίο το κέλυφος σκληραίνει
- Στάδιο 3, κατά το οποίο αναπτύσσεται το εδώδιμο τμήμα του καρπού (ψίχα φιστικιού) (Noguera-Artiaga et al., 2018).

Η φιστικιά χρειάζεται περίπου 7-10 χρόνια για να αρχίσει να παράγει ικανοποιητική ποσότητα, ενώ μετά τα 15 χρόνια φτάνει την μέγιστη παραγωγή (Mandalari et al., 2022).

Οι φιστικιές μπορούν να φτάσουν τα 10 m ύψος, αλλά συνήθως διατηρούνται στα 7 m (Mandalari et al., 2022).

A.1.2 Η πορεία του καρπού από την συγκομιδή έως την κατανάλωση

Το πρώτο σημάδι φυσιολογικής ωρίμανσης των καρπών που υποδεικνύει ότι μπορεί να ξεκινήσει η συγκομιδή είναι η μεταβολή του χρώματος του περικαρπίου από πράσινο σε κόκκινο που πραγματοποιείται από τέλη Αυγούστου με μέσα Σεπτεμβρίου. Σε αυτό το σημείο, το περικάρπιο μπορεί εύκολα να αφαιρεθεί. Ακόμη, ένας άλλος τρόπος για τον προσδιορισμό του κατάλληλου χρόνου συγκομιδής είναι εσωτερικοί ποιοτικοί δείκτες στην ψίχα όπως η μείωση του ρυθμού αναπνοής, του περιεχομένου σε υγρασία και πρωτεΐνες και η αύξηση της συγκέντρωσης των λιπαρών συστατικών, των σακχάρων και του ξηρού βάρους (Shakerardekani et al., 2022).

Μετά την συλλογή των καρπών, αυτά μεταφέρονται στα εργοστάσια επεξεργασίας όπου αρχικά αφαιρείται το περικάρπιο με την βοήθεια ενός αποφλοιωτή. Στην πορεία ακολουθεί διαχωρισμός και απορρίπτονται εκείνοι οι καρποί που εσωτερικά του κελύφους είναι άδειοι, δηλαδή δεν υπάρχει ψίχα, ενώ συλλέγονται οι καρποί με το εδώδιμο περιεχόμενο. Ακολουθεί η διαδικασία της ξήρανσης. Στην αρχή προκειμένου να επιτευχθεί ένα ποσοστό υγρασίας 9-10 % (w/w) τοποθετούνται σε ξηραντήρες για 4 έως 6 h. Έπειτα μέσω μιας τεχνικής που διαρκεί περίπου 24 h επιτυγχάνεται περαιτέρω μείωση της υγρασίας σε ποσοστό 5-7 % (w/w) Κάτω από αυτό το ποσοστό υγρασίας, οι καρποί μπορούν να αποθηκευτούν μέχρι την επόμενη χρήση τους.

Στην συνέχεια, ακολουθεί ξανά ένας διαχωρισμός μεταξύ των καρπών που έχουν κλειστό κέλυφος από εκείνων με ανοιχτό.

Προκειμένου να βελτιωθούν ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως το άρωμα, η υφή, η γεύση και γενικότερα χαρακτηριστικά που βελτιώνουν την αποδοχή από τον καταναλωτή, μετά την ξήρανση ακολουθεί το ψήσιμο των ανοιχτών καρπών σε υψηλότερες θερμοκρασίες για μικρό χρονικό διάστημα. Η ίδια τεχνική γίνεται και στους καρπούς με το κλειστό κέλυφος, αφού πρώτα προηγηθεί άνοιγμα αυτών. Τέλος, οι καρποί είναι έτοιμοι να συσκευαστούν και να προωθηθούν στην αγορά για κατανάλωση (UC Davis Western Institute for Food Safety & Security - FDA. Pistachios, 2021) .

A.1.3 Εδαφοκλιματικές συνθήκες

Είναι εύκρατο, φυλλοβόλο και αντέχει σε μεγάλης διάρκειας, ζεστά και ξηρά καλοκαίρια, καθώς και μέτριας έντασης χειμώνες. Λόγω της ανθεκτικότητας σε αυτές τις συνθήκες, καλλιεργείται τόσο σε ημίξηρες ερήμους όσο και σε ξηρές πλαγιές χαμηλών βουνών και πρόποδων υψηλότερων βουνών (Vavilon et al., 1967). Τελευταία, καλλιεργείται και βορειότερα αλλά εμφανίζονται προβλήματα μυκητολογικών ασθενειών (Βασιλακάκης, 2010).

Είναι ανθεκτικό στην ξηρασία, αλλά ευδοκιμεί όταν ποτίζεται και συγκεκριμένα όταν το πότισμα διεξάγεται από Ιούνιο με Αύγουστο.(Μπρουσοβάνα, 1980). Έχει ρίζες που διεισδύουν βαθιά στο έδαφος, βοηθώντας το να ξεπερνά τις περιόδους που υπάρχει έλλειψη νερού (Whitehouse, 1957).

Καλλιεργούνται σε ένα μεγάλο εύρος από τύπους εδαφών, αλλά αποδίδουν καλύτερα σε σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγιζόμενα, με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο εδάφη (Ferguson, Polito, & Kallsen, 2005) Αντέχει σε αλατούχα και αλκαλικά εδάφη (Taghizadeh, Davarynejad, Asili, Nemati, & Karimi, 2018). Τέλος, σε εδάφη χωρίς βάθος και σκληρά, τα δέντρα έχουν περιορισμένο μέγεθος και παραγωγή (Ferguson et al., 2005).

A.1.4 Ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης

- **Θερμοκρασία και υγρασία**

Το ιδανικό εύρος θερμοκρασίας αποθήκευσης είναι 0-10 °C και υγρασίας 5-7% (w/w), με όσο μικρότερη θερμοκρασία τόσο το καλύτερο για τη διάρκεια ζωής (Harris, 2013-Mandalari et al., 2022). Είναι ανθεκτικά σε θερμοκρασίες ψύξης ενώ αποθηκεύονται και υπό συνθήκες κατάψυξης και κάτω από αυτές (Ferguson et al., 2005).

- **Ατμόσφαιρα**

Όταν το επίπεδο του O₂ είναι κάτω από 1 % (v/v) τότε καθυστερεί η υποβάθμιση διάφορων χαρακτηριστικών ποιότητας. Επίπεδα O₂ κάτω από 0,5 % (v/v) ή CO₂ πάνω από 80 % (v/v) στο περιβάλλον που αποθηκεύεται το φιστίκι, έχουν ευεργετική επίδραση στην προστασία του από την προσβολή εντόμων (Harris, 2013).

A.1.5 Γεωγραφική εξάπλωση και Παγκόσμια παραγωγή φιστικιάς

Η φιστικιά (*Pistacia vera L.*) προέρχεται από τις άνυδρες περιοχές της κεντρικής Ασίας, τις περιοχές της Κασπίας θάλασσας (Ιράν) και την περιοχή μεταξύ Αφγανιστάν και Κιργιζία (Benny et al., 2020).

Στοιχεία δείχνουν πως τα φιστίκια καταναλώνονταν 300.000 χρόνια πριν από τους Νεάντερναλ (Mandalari et al., 2022). Στην σύγχρονη ιστορία, υπολείμματα καρπών φιστικιών που έχουν βρεθεί στο Αφγανιστάν και στο νοτιοανατολικό Ιράν χρονολογούνται από το 6.000 π.Χ., όπου πιθανότατα η φιστικιά φύτρωνε ως άγριο φυτό. Καλλιεργούνταν κατά την περσική αυτοκρατορία, ενώ στην πορεία επεκτάθηκε και στην Δύση.

Κατά τη ρωμαϊκή εποχή από τη Συρία επεκτάθηκε στην Ιταλία, όπου ήταν γνωστή ως ‘Συριακός καρπός’ και η τιμή ήταν ιδιαίτερα ακριβή. Από την Ιταλία, η καλλιέργεια επεκτάθηκε στις μεσογειακές περιοχές της Νότιας Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής. Κατά τη δεκαετία του 1880, τα φιστίκια άρχισαν να πωλούνται και στην Αμερικανική αγορά.

Η παγκόσμια παραγωγή της φιστικιάς έχει αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό τις τελευταίες δεκαετίες. Συγκεκριμένα, από τους 50 χιλιάδες τόνους που παράγονταν το 1970, άγγιξε τους 500 χιλιάδες τόνους παγκοσμίως το 2000, ενώ από το 2020 παράγονται πλέον περισσότερο από 1 εκατομμύριο τόνοι (Gusella, Vitale, & Polizzi, 2022). Πλέον τα φιστίκια αποτελούν ένα σνακ που καταναλώνεται παγκοσμίως σε μεγάλο βαθμό (Mandalari et al., 2022). Καλλιεργείται στο Ιράν, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, στην Τυνησία, Τουρκία, Ελλάδα, Συρία και Ιταλία (Smeriglio, D’Angelo, Denaro, Trombetta, & Germanò, 2021).

Οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής αποτελούν την κύρια παραγωγό χώρα στον κόσμο και είναι υπεύθυνες για το 47 % της παγκόσμιας παραγωγής. Ακολουθεί η Τουρκία με ποσοστό 30 % και το Ιράν με 16 %. Η Καλιφόρνια είναι η κύρια παραγωγός φιστικιών, (το 99 % της παραγωγής των Ηνωμένων Πολιτειών), ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό

παράγεται στην Αριζόνα και το Μεξικό (Yuan, Zheng, Li, & Liu, 2022 - Mandalari et al., 2022).

Τα δυο κοινώς καλλιεργούμενα είδη είναι τα *Pistacia lentiscus L.* και *Pistacia vera L.* (Di Lodovico et al., 2019).

A.1.6 Η καλλιέργεια της φιστικιάς στην Ελλάδα

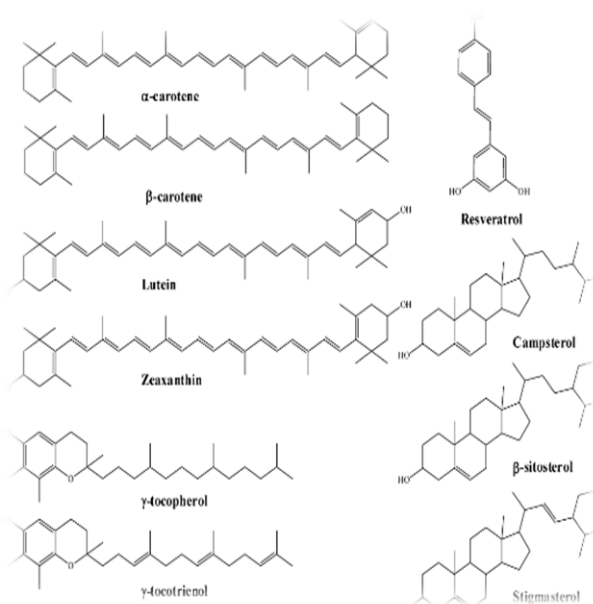
Στην Ελλάδα η κύρια εδώδιμη ποικιλία που καλλιεργείται είναι η ποικιλία Αιγίνης (Mandalari et al., 2022).

Γύρω στο 1860 εντοπίστηκαν οι πρώτες καλλιέργειες φιστικιάς σε μια περιοχή κοντά στην Αθήνα. Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, η καλλιέργεια της επεκτάθηκε στην Αττική και στην Αίγινα. Πλέον, ο αριθμός των φιστικόδεντρων που καλλιεργούνται στην Ελλάδα αγγίζει το ένα εκατομμύριο με αυτά να βρίσκονται σε μια έκταση από την Χαλκιδική έως την Κρήτη και από τη Ζάκυνθο έως τα νησιά του Αιγαίου. Καλλιεργείται κυρίως σε περιοχές της Αττικής (Αίγινα και Μέγαρο), τη Στερεά Ελλάδα (Φθιώτιδα, Βοιωτία και Εύβοια), τη Θεσσαλία (Αλμυρός) και τη Βόρεια Ελλάδα (Χαλκιδική) (Zakynthinos & Rouskas, 2001).

A.1.7 Θρεπτική αξία και χρήσεις

Τα φιστικά συγκαταλέγονται στα 50 πιο υγιεινά τρόφιμα και είναι σημαντική η συνεισφορά τους στην ανθρώπινη υγεία (Shakerardekani, Ahmad, Fereshteh & Hamid, 2022). Τα ώριμα φιστικά καταναλώνονται ως σνακ (ωμά, ψημένα, αλατισμένα) ενώ τα πρώιμα χρησιμοποιούνται σε παγωτά, κέικ, γλυκά, σοκολάτες και σάλτσες (Shakerardekani et al., 2022). Στο Ιράν, τα περικόρπια βρίσκουν χρήση ως λίπασμα, τροφή για μηρυκαστικά, αλλά και προστίθενται σε μικρή ποσότητα σε μαρμελάδες ενώ στην Ινδία χρησιμοποιούνται και για βαφή. Το λάδι του φιστικιού χρησιμοποιείται σε καλλυντικά. Ακόμη ένα δημοφιλές προϊόν που προέρχεται από ψημένους και αλεσμένους πυρήνες φιστικιών είναι το φιστικοβούτυρο το οποίο καταναλώνεται μόνο του αλλά χρησιμοποιείται και σε πολλές συνταγές. Θεωρείται υψηλής διατροφικής αξίας και υγιεινός καρπός λόγω του σημαντικού περιεχομένου του σε πρωτεΐνες (20.2 % του ολικού βάρους), γ-τοκοφερόλες, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το ελαϊκό, το λινολεϊκό και το λινολενικό οξύ, βιταμίνες (A, E, K, B1, B6, κλπ.) δευτερογενείς μεταβολίτες, φυτικές ίνες (10 % w/w αδιάλυτες και 0,3 % διαλυτές φυτικές ίνες) και μέταλλα (όπως χαλκός, μαγγάνιο, κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο και σίδηρο) (Glei et al.,

2017 - Rauf et al., 2017 - Soares et al., 2021-Sehitoglu et al., 2015). Διαθέτουν σημαντικό περιεχόμενο σε φυτοστερόλες, που ονομάζονται β-σιτοστερόλες που είναι πολύ πιθανό να συμβάλλουν θετικά στην μείωση της χοληστερόλης (Costa, Silva, Vicente, Oliveira, Mafra, & Isabel, 2017). Το περιεχόμενο σε απαραίτητα αμινοξέα, είναι μεγαλύτερο από κάθε άλλο ξηρό καρπό ενώ ακόμη διαθέτουν σημαντικό περιεχόμενο σε αμινοξέα με διακλαδισμένες αλυσίδες (Bailey & Stein, 2020). Ακόμη είναι σημαντική και η μόνη πηγή, μεταξύ των κελυφωτών καρπών, καροτενοειδών και ειδικότερα λουτεΐνης, ζεαξανθίνης και β-καροτενίου (ξανθοφύλλη καροτενοειδών) (Mandalari et al., 2022 - Harris, 2013) (Εικόνα 2). Μεγάλη είναι και η περιεκτικότητα και σε φαινολικά συστατικά (π.χ. ρεσβερατρόλη).



Εικόνα 2 Χημική δομή δραστικών καροτενοειδών, στερολών και ρεσβερατρόλης (Mandalari et al., 2022).

Λόγω αυτού του περιεχομένου, η κατανάλωση τους προφυλάσσει από τη στεφανιαία νόσο, ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση, είναι αντιφλεγμονώδες, είναι κατάλληλη για διαβητικούς (ρυθμίζει τη γλυκόζη στο αίμα) και άλλες παθήσεις (Rauf et al., 2017 - Xia et al., 2020. Χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα για την θεραπεία διάφορων ασθενειών, όπως μώλωπες, πληγές, τραύματα και δυσεντερία (Costa et al., 2017).

A.2 Φαινολικά συστατικά

A.2.1 Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα

Υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν στενή σύνδεση μεταξύ των φαινολικών συστατικών των καρπών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Bodoira & Maestri,

2020). Τα φιστίκια έχουν αποδειχθεί ότι ανήκουν στα 50 τρόφιμα με το υψηλότερο περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικές φαινόλες και πολυφαινόλες (Halvorsen et al., 2006).

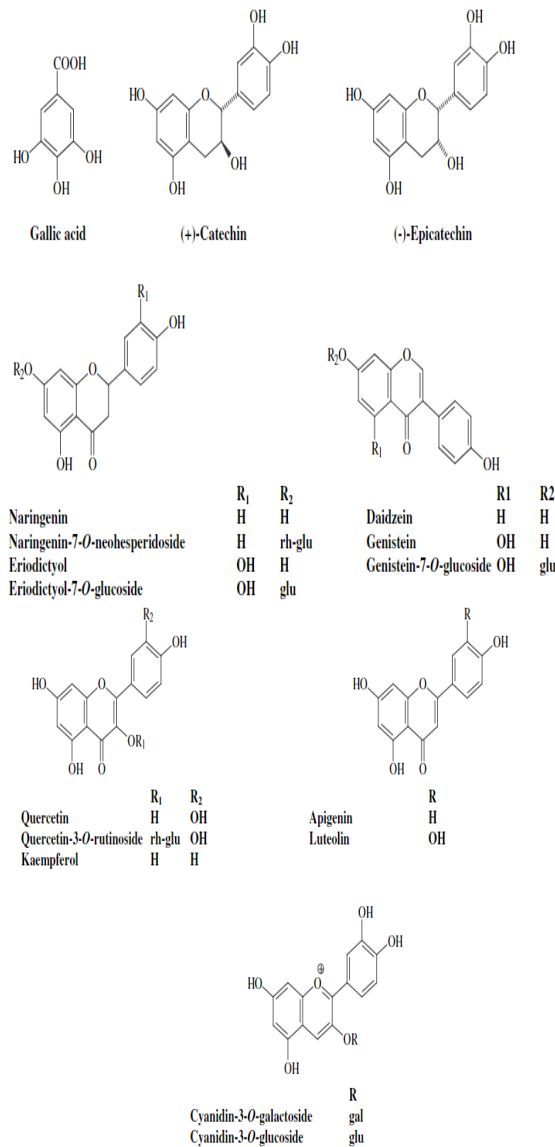
Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών (Bodoira & Maestri, 2020) και παρέχουν φαινολική υδροξυλική ομάδα που αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες (Sehitoglu et al., 2015). Η εκχύλισή τους από το φυτό γίνεται, συνήθως, με οργανικούς διαλύτες (Bodoira et al., 2019).

Τα φαινολικά συστατικά, ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, χωρίζονται στα φλαβονοειδή με βασική σκελετική δομή τη C6-C3-C6, τα οποία είναι και η κύρια τάξη φαινολικών συστατικών του φιστικιού και στα μη φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τις φλαβανόλες (όπως κατεχίνες, επικατεχίνες), φλαβανόνες (όπως η κερκετίνη, καμπερόλη, λουτεολίνη, απιγενίνη), ισοφλαβόνες (όπως η γενιστεΐνη), 3-φλαβανόλες, προ-ανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες. Ενώ ακόμη τα φαινολικά οξέα και τα στυλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη) ανήκουν στα μη φλαβονοειδή συστατικά (Taghizadeh et al., 2018 -Mandalari et al., 2022).

Τα φαινολικά συστατικά που επικρατούν στην ψίχα σύμφωνα με διάφορες έρευνες, είναι οι κατεχίνες, το 7-O-γλυκοζίδιο της εριοδικτυόλης, εριοδικτυόλη (Liu, Blumberg, & Chen, 2014), γαλλικό οξύ, O-γλυκοζίτες της κερκετίνης (γαλακτοζίδιο, γλυκοζίδιο, ρουτινοζίδιο και εξοζίδιο), 3-O-γλυκοζίτη της μυρικετίνης, λουτεολίνη, εξοζίδιο της (επί)κατεχίνης (Grace et al., 2016), πρωτοκατεχοϊκό οξύ (Liu et al., 2014), διμερές της προκυανιδίνης, επικατεχίνη, O-ξυλοζίδιο μυρικετίνης, O-εξοζίδιο μυρικετίνης, τριγλυκοζίτης κερκετίνης (Noguera-Artiaga et al., 2019), δεοξυδιεξοζίδιο, καφεϊκό οξύ, 3-O-γλυκοζίδιο καμπερόλης, 3-O-γαλακτοζίδιο της κυανιδίνης, , O-διεξοζίδιο της καμπερόλης, τριγλυκοζίδιο της κερκετίνης (Noguera-Artiaga et al., 2018) (Εικόνα 3).

Τα φαινολικά συστατικά των φιστικιών είναι βιοπροσβάσιμα στο στομάχι και στο λεπτό έντερο και κατά συνέπεια είναι διαθέσιμα για απορρόφηση, δημιουργώντας έτσι ένα συνδετικό κρίκο μεταξύ της κατανάλωσης τους και της ωφέλιμης αποτελεσματικότητάς τους στην ανθρώπινη υγεία (Mandalari et al., 2013 - Barreca et al., 2021).

Οι ανθοκυανίνες έχουν αντιοξειδωτική, αντι-καρκινογόνα, αντι-φλεγμονώδη και αντι-αγγειογενετική δράση. Οι κατεχίνες συμβάλλουν στην μείωση της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών ενώ οι ισοφλαβόνες έχουν χημειοπροληπτικές ιδιότητες (Arena et al, 2019).



rh: rhamnose; glu: glucose; gal: galactose

Εικόνα 3 Χημική δομή φαινολικών συστατικών (Tomaino et al., 2010).

Ο Tomaino και άλλοι, αναφέρουν σε έρευνα τους πως η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών συστατικών του περικαρπίου είναι μεγαλύτερη από αυτή της ψίχας (Tomaino et al., 2010).

A.2.2 Αντι-μικροβιακή και αντι-ική ικανότητα των πολυφαινολών

Υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι τα φαινολικά εκχυλίσματα του φιστικιού είναι δραστικά έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας gram⁺ βακτηρίων, όπως των *Listeria monocytogenes* (both ATCC strains and food isolates), *Staphylococcus aureus* και το

ανθεκτικό στην μεθικιλίνη κλινικά απομονωθέντο στέλεχος *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Bisignano, Filocamo, Faulks, & Mandalari, 2013).

Η αντι-ική ικανότητα των πολυφαινολών έχει διερευνηθεί για το στέλεχος του τύπου 1 (HSV-1) του ιού του έρπη. Η έρευνα έδειξε πως το πολυφαινολικό εκχύλισμα του φιστικιού, συνέβαλλε στην μείωση της έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών ICP8,UL42 και US11, καθώς και στην μείωση της σύνθεσης του DNA του (Musarra-Pizzo et al., 2020).

A.3 Φασματοσκοπικές τεχνικές

A.3.1 Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed, FTIR, spectroscopy)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων (IR), μετρά την απορρόφηση της ακτινοβολίας από μια λειτουργική ομάδα συναρτήσεως του κυματαριθμού δόνησής της (Kaufmann, 2002). Η φασματοσκοπία FTIR καταγράφει το φάσμα IR πολύ πιο γρήγορα από το παραδοσιακό φασματόμετρο (Mohamed, 2017). Είναι μια αναλυτική τεχνική με πολλά πλεονεκτήματα. Αναλυτικότερα, εξασφαλίζει σε σύντομο χρονικό διάστημα τόσο την εύκολη προετοιμασία του δείγματος όσο και ανάλυση του, χωρίς να το καταστρέφει. Ακόμη, διακρίνεται για το χαμηλό της κόστος και τον σεβασμό της στο περιβάλλον (Sujka, Koczko, Ceglińska, Reder, & Ciemniowska-Żytkiewicz, 2017 - Mendes & Duarte, 2021).

Καταγράφει φάσματα μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων, όπως τα αέρια, υγρά, στερεά, λεπτών μεμβρανών και νανοϋλικών (Kaufmann, 2002). Σε κάποια από τα τρόφιμα που εφαρμόζεται είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, μέλι, καφές, ξηροί καρποί, άλευρα, έλαια, κέικ και νιφάδες, κρέας και αλκοολούχα ποτά (Sujka et al., 2017 -Mendes & Duarte, 2021). Μέσω αυτής της τεχνικής, εξασφαλίζεται ο προσδιορισμός των λειτουργικών ομάδων οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε τρόφιμα και ποτά. Χρησιμοποιείται είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, βοηθώντας στην ταυτοποίηση άγνωστων χημικών ενώσεων (Kaufmann, 2002).

A.3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR)

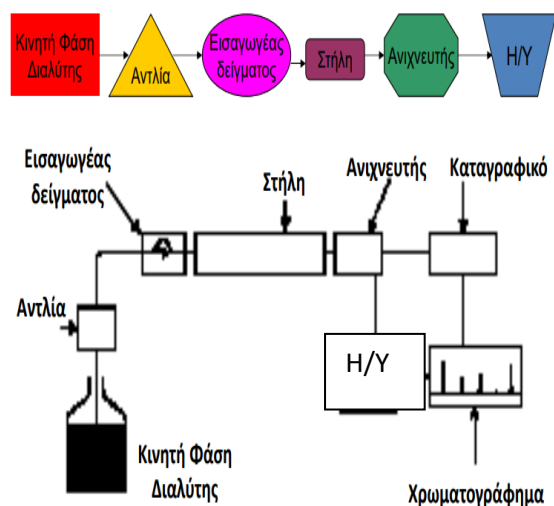
Η τεχνική ATR βασίζεται στη χρήση διάφανου κρυστάλλου ή πρίσματος με υψηλό δείκτη διάθλασης ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με το δείγμα. Η δέσμη ακτινοβολίας

μέσω κρύσταλλου προσπίπτει στο δείγμα με γωνία 45° και ακολουθούν πολλαπλές εσωτερικές ανακλάσεις ή μία μόνον εσωτερική ανάκλαση όταν χρησιμοποιούνται πρίσματα. Κατά συνέπεια, αυξάνεται ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο προκαλώντας την αύξηση των ταινιών του φάσματος ακόμη και υπό την ύπαρξη χαμηλών συγκεντρώσεων. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος. Η ομαλότητα της επιφάνειας επαφής δείγματος-κρυστάλλου/πρίσματος μπορεί να βελτιωθεί με χρήση εξοπλισμού που ασκεί πίεση και έτσι είναι δυνατόν να αποκτηθεί πολύ καλής ποιότητας φάσμα FTIR (Kazarian & Chan, 2006).

A.4 Υγροχρωματικές τεχνικές

A.4.1 Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF-MS)

Το HPLC-MS είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό πολλών φυσικών προϊόντων (Careri et al., 1998; Xing et al., 2007). Ειδικότερα ο ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική επειδή είναι ένας ήπιος ιονισμός που εφαρμόζεται τόσο σε πρωτονιομένα όσο και αποπρωτονιομένα μόρια. Ο τετραπλός ανιχνευτής χρόνου πτήσης (QTOF) εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια προσδιορισμού της μάζας παρέχοντας την στοιχειακή σύνθεση γονικών και ιοντικών θραυσμάτων. Αυτό οδηγεί στην αναγνώριση και στην διαφοροποίηση ισοβαρών ενώσεων (Rodríguez-Medina et al., 2009; Gómez-Romero et al., 2011). Η τεχνική βασίζεται στην ύπαρξη δυο φάσεων, μιας κινητής και μιας στατικής. Η υγρή κινητή φάση διέρχεται μέσα από την στατική με την χρήση αντλιών υψηλής πίεσης. Η στατική φάση αποτελείται από μικρής διαμέτρου, και επομένως υψηλής αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετακίνησης αυτών επί της στατικής φάσεως υπό την επίδραση της κινητής φάσης. Έτσι προκύπτει και ο χρόνος κατακράτησης του κάθε συστατικού που αντιστοιχεί στον χρόνο που μεσολαβεί από την στιγμή που ένα συστατικό εισέρχεται ως μείγμα προς ανάλυση, μέχρι την στιγμή που αυτό εκλύεται από το σύστημα (Εικόνα 4). Το HPLC, που είναι τεχνική διαχωρισμού και όχι ταυτοποίησης, συνδυάζεται με τη φασματομετρία μαζών και έτσι επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση πολύπλοκων μη πτητικών βιολογικών δειγμάτων.



Εικόνα 4 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας

A.5 Περιγραφή τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας

A.5.1 Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας

Με αυτούς απομακρύνεται ένας διαλύτης από διάλυμα στερεής ουσίας (επιθυμητό προϊόν) ή και υγρής αρκεί το σημείο ζέσης της να διαφέρει από το σημείο ζέσης του διαλύτη και να μη σχηματίζει αζεοτροπικό μίγμα μ' αυτόν. Με την περιστροφή επιτυγχάνεται ομαλή απομάκρυνση του διαλύτη χωρίς κινδύνους εκτίναξης. Έτσι, απομακρύνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα μεγάλες ποσότητες διαλύτη ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά.

A.5.2 Λυοφιλίωση

Λυοφιλίωση είναι μια τεχνική ξήρανσης, κατά την οποία το νερό αφού καταψυχθεί έπειτα απομακρύνεται από το δείγμα αρχικά με εξάχνωση (πρωτογενής ξήρανση) και έπειτα με εκρόφηση (δευτερογενής ξήρανση) (Bhambere et al., 2015).

A.5.3 Ανάδευση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική ανάδευσης, που χρησιμοποιεί την μηχανική επίδραση που προκαλείται από την έκρηξη μικρού μεγέθους φυσαλίδων προκειμένου

να γίνει γρήγορη αποδιοργάνωση των ιστών, διευκολύνοντας έτσι την μεταφορά των φυτο-χημικών, από το δείγμα στον διαλύτη. Τέλος, τόσο ο μικρός χρόνος όσο και οι χαμηλές θερμοκρασίες των υπερήχων, προστατεύουν τα ευάλωτα στην θερμοκρασία συστατικά, όπως οι πολυφαινόλες (Alara, Abdurahman, & Ukaegbu, 2021).

A.6 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η οξείδωση είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την μεταφορά ηλεκτρονίου από ένα άτομο στο άλλο. Κύριο αποδέκτη ηλεκτρονίων αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες και το οξυγόνο το οποίο περιέχει δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια και τείνει να σχηματίζει ελεύθερες ρίζες που είναι γνωστές ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Αυτές οι μορφές μπορεί να προσφέρουν οφέλη στον οργανισμό όταν βρίσκονται σε φυσιολογική συγκέντρωση αλλά μπορεί να αποβούν και επικίνδυνα. Αυτό συμβαίνει όταν τα αντιοξειδωτικά είναι ανεπαρκή, οπότε τα ROS προκαλούν καταστροφές στα κύτταρα και επέρχεται το οξειδωτικό στρες. Η συνεχής καταστροφή διάφορων βιομορίων, όπως τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, οδηγούν σε μια σειρά από αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, και αυτές έπειτα στην πρόκληση ασθενειών όπως ο καρκίνος και η γήρανση. Ως αντιοξειδωτική ορίζεται εκείνη η ουσία η οποία, ευρισκόμενη σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα, μπορεί να οξειδωθεί και να συμβάλει στο να καθυστερήσει ή να εμποδίσει τελικά την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Επομένως, η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά όπως τα φαινολικά συστατικά, μπορεί να μειώσει την υπέρβαρα των ελεύθερων ριζών και επομένως των διάφορων ασθενειών που προκαλούνται από αυτές (Sehitoglu et al., 2015).

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών συστατικών. Αυτές περιλαμβάνουν *in vitro* δοκιμές όπως η δοκιμασία με το 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), η δοκιμή Folin–Ciocalteu, και η δοκιμή ABTS (Mandalari et al., 2022).

A.6.1 Δοκιμή DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην μέτρηση της απώλειας του χρώματος του διαλύματος DPPH (ιώδες χρώμα) όπως αποτυπώνετε από την μεταβολή της απορρόφησης στα 517 nm λόγω της αντίδρασης του DPPH με λιπόφιλες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Μικρότερη απορρόφηση σημαίνει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος

(Taghizadeh et al., 2018 - Kim, Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y., 2002 - Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011).

A.6.2 Δοκιμή ABTS

Το ABTS⁺ το οποίο παράγεται μέσω οξειδωσης του ABTS²⁻ με το K₂S₂O₈, διαλύεται και σε οργανικούς και σε υδατικούς διαλύτες. Επομένως συγκριτικά με το DPPH, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων ενώσεων. Η αντίδραση αυτών των ενώσεων με το ABTS⁺, οδηγεί στην απώλεια του έντονου γαλαζοπράσινου χρώματος του (Kim et al., 2002 - Roginsky & Lissi, 2005 - Floegel et al., 2011).

A.6.3 Δοκιμή Folin- Ciocalteu

Είναι μια γρήγορη δοκιμή προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά. Οι πολυφαινόλες αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μετατρέποντας το χρώμα του από κίτρινο σε μπλε. Το μπλε σύμπλεγμα που σχηματίζεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με χρήση της φασματοφωτομετρίας ορατού φωτός. Η μέγιστη απορρόφηση εξαρτάται από το αλκαλικό διάλυμα και την συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (Blainski, Lopes, & Pallazo, 2013 - Agbor, Vinson, & Donnely, 2014 - Abdelkader, Ahcen, Rachid, & Hakim, 2014).

A.7 Σκοπός και αντικείμενο μελέτης

Αντικείμενο της εργασίας είναι η παραλαβή όξινων μεθανολικών εκχυλισμάτων από την ψίχα του φιστικιού ποικιλίας Αιγίνης ελληνικής προέλευσης μέσω της τεχνικής της ανάδευσης υποβοηθούμενη από υπερήχους (Microwave Assisted Extraction – UAE)

Τα όξινα μεθανολικά αυτά εκχυλίσματα θα μελετηθούν :

- Χρωματογραφικά με χρήση του HPLC-QTOF
- Φασματοσκοπικά (FT-IR)
- Ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις δοκιμές ABTS και DPPH καθώς και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu
- Ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο εργαστήριο Γενικής Χημείας καθώς και στο εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

B.1 Δειγματοληψία – Παραλαβή ψίχας

Έγινε συλλογή (2022) κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης από την περιοχή Μώλου Φθιώτιδας και μετά την παράδοσή τους στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, διατηρήθηκαν σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C) έως την ανάλυσή τους. Προκειμένου να γίνει η παραλαβή της ψίχας, έπρεπε να αφαιρεθεί το περικάρπιο και το κέλυφος. Το περικάρπιο αφαιρέθηκε χειρωνακτικά, ενώ το κέλυφος με την βοήθεια φιστικοθραύστη (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Φιστικοθραύστης

B.2 Άλεση-Ομογενοποίηση

Η ψίχα προκειμένου να αλεσθεί και να μετατραπεί σε χονδροειδείς κόκκους, τοποθετήθηκε σε μπλέντερ με μεταλλικές λεπίδες κοπής (Philips, HR 2860) (Εικόνα 6)



Εικόνα 6 Μπλέντερ με μεταλλικές λεπίδες

Η διαδικασία της ομογενοποίησης, επετεύχθη με την κοκκομέτρηση του δείγματος της ψίχας, όπως προέκυψε από το μπλέντερ, και με την βοήθεια κόσκινων διαμέτρου 1000-500 μm . Το στάδιο αυτό παίζει μεγάλο ρόλο στην αποτελεσματικότητα των αναλύσεων που θα ακολουθήσουν. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά την φασματοσκοπική ανάλυση το μέγεθος των κόκκων να μην είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, διαφορετικά προκαλείται θόρυβος ενώ ακόμη δεν διεισδύει αποτελεσματικά η ακτινοβολία εντός του δείγματος και επομένως μειώνεται η ένταση των απορροφήσεων. Ακόμη, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των κόκκων του δείγματος τόσο αποδοτικότερες είναι οι εκχυλίσεις.

Αναλυτικότερα, η κοκκομέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση:

- Δύο κόσκινων, το ένα μεγέθους 1000 μm και το άλλο 500 μm
- Ψήκτρας καθαρισμού των κόσκινων

- Πλαστικό περιέκτη με ερμητικό κλείσιμο για την αποθήκευση του δείγματος στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση του.

Το κόσκινο των 500 μm τοποθετήθηκε κάτω από το κόσκινο των 1000 μm . Οι χονδροειδείς κόκκοι που προέκυψαν από το μπλέντερ τοποθετήθηκαν πάνω από το κόσκινο των 1000 μm . Συλλέχθηκε το δείγμα που συγκεντρώθηκε μεταξύ των δύο κόσκινων (δηλαδή μεγέθους κόκκων 500-1000 μm), και τοποθετήθηκε σε πλαστικό σάκο και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20°C) (Εικόνες 7-10).



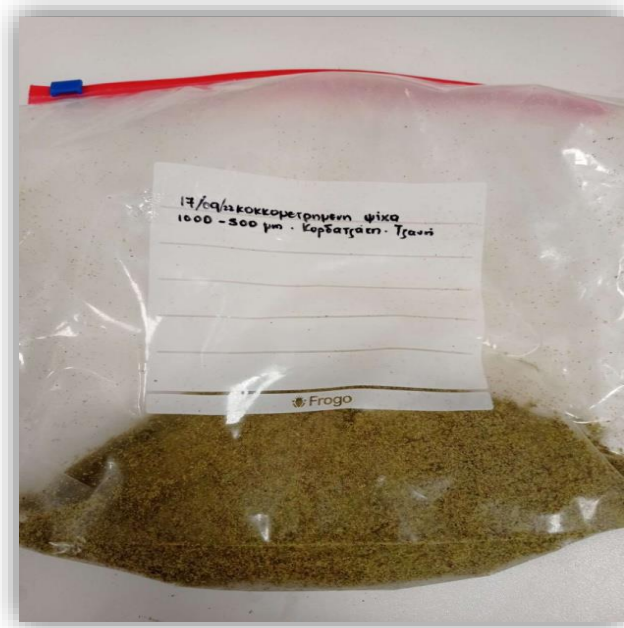
Εικόνα 7 Κόσκινο μεγέθους 500 μm



Εικόνα 8 Κοκκομέτρηση



Εικόνα 9 Ψύκτρα καθαρισμού κόσκινων



Εικόνα 10 Σάκος αποθήκευσης κοκκομετρημένης ψίχας

B.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε υγρασία

B.3.1 Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό υγρασίας χρησιμοποιήθηκαν:

- Κοκκομετρημένο δείγμα μεγέθους 500-1000 μm
- Φούρνος
- Ξηραντήριο
- Ζυγαριά ακριβείας (Kern, ABT 220-4M)

Υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε υγρασία των δειγμάτων σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο του AOAC. Για το σκοπό αυτό, κεραμική κάψα προθερμάνθηκε σε ηλεκτρικό φούρνο για 5 min στους 100°C και ακολούθως αφέθηκε σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (P_2O_5) για να αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Με χρήση ζυγού ακριβείας (Kern, ABT 220-4M) μετρείται η μάζα της κάψας (M1). Στη συνέχεια προστέθηκαν στην κάψα 2,5 g (M2) κοκκομετρημένου δείγματος. Ακολούθως, θερμάνθηκε στους 102°C μετρείται η μάζα τους σε τακτά χρονικά διαστήματα (M3), μέχρι αυτή να σταθεροποιηθεί (η διαφορά δυο διαδοχικών μετρήσεων να μην είναι μεγαλύτερο από 0.001 g) (Yanniotis & Zarboutis, 1996). Όταν συμβεί αυτό, σημαίνει πως έχει απομακρυνθεί η υγρασία που περιέχεται στο δείγμα. Η διαδικασία

αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών από τον οποίο προέκυψαν οι μάζες M1, M2, M3.. Η υγρασία που αρχικά περιέχεται στους καρπούς υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Y = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

Ακολούθως υπολογίστηκε ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (Τ.Α.)

B.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 και με την χρήση του τύπου υπολογισμού υγρασίας αυτή υπολογίστηκε $Y = 5,80 \%$ (w/w).

Πίνακας 1 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων και υπολογισμός των μαζών M1, M2, M.

	m ψίχα (g)	m Κάψας M1 (g)	m Κάψας + Ψίχας M2 (g)	M3 (g)
	2,50	14,50	17,00	16,85
	2,53	12,26	14,79	14,65
	2,54	14,18	16,73	16,58
Μ.Ο.	2,52	13,65	16,17	16,03
Τ.Α.	0,02	1,21	1,21	1,20

Σε άγριες ποικιλίες του γένους *Pistacia Vera L.* καλλιεργημένες στο βουνό Khajeh-Kalat η περιεχόμενη υγρασία της ψίχας βρέθηκε $6,03 \%$ (w/w) (Galedar, Tabatabaefar, Jafari, Sharifi, Mohtasebi & Fadaei, 2010). Ακόμη, στις δυο κύριες ποικιλίες φιστικιάς που καλλιεργούνται στην Τουρκία, *Uzun* και *Siir*, κυμαίνονταν από $4-5 \%$ (w/w) (Satil, Fatih & Ayas, Nezihe & Baser, Husnu, 2003). Τέλος, σε Αμερικάνικα δείγματα φιστικιών του γένους *Pistacia Vera L.* η υγρασία ήταν $5,19 \%$ (w/w) (Liu et al., 2014).

B.3.3. Συμπέρασμα

Η περιεκτικότητα σε υγρασία του δείγματος ψίχα του φιστικιού ποικιλίας Αιγίνης ελληνικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας είναι παραπλήσια με αυτή των άλλων ερευνών. Η συγκεκριμένη υγρασία ικανοποιεί

τις ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης τους εύρους των 5-7 % (w/w) μέχρι την περαιτέρω χρήση τους (Gazor & Minaei, 2005 - Mandalari et al., 2022).

B.4 Απολίπανση δείγματος Προκειμένου να διευκολυνθεί η μελέτη των φαινολικών συστατικών της ψίχας έπρεπε πρώτα να απομακρυνθεί το περιεχόμενο έλαιο. Τα λιπίδια αποτελούν μια μεγάλη ετερογενή κατηγορία οργανικών ενώσεων, που το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι δε διαλύονται στο νερό αλλά σε μη-πολικούς οργανικούς διαλύτες. Η ιδιαιτερότητά τους αυτή οφείλεται στο ότι διαθέτουν μεγάλες υδρόφοβες αλειφατικές αλυσίδες. Επομένως για την απομάκρυνση τους χρησιμοποιείται άπολος διαλύτης.

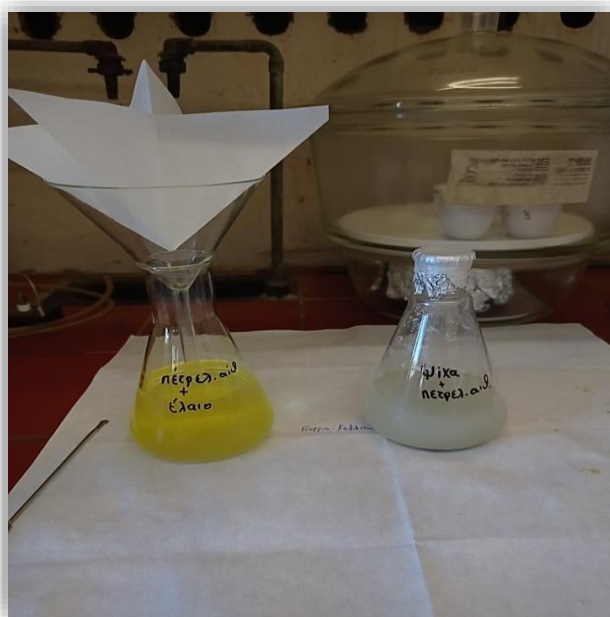
Για την απολίπανση της ψίχας, χρησιμοποιήθηκε:

- Δείγμα με μέγεθος κόκκων 500-1000 μm
- Κάψα για το ζύγισμα της απαιτούμενης ποσότητας
- Ζυγαριά με δυο δεκαδικά ψηφία
- Πετρελαϊκός αιθέρας ως διαλύτης
- Λουτρό υπερήχων
- Δυο κωνικές φιάλες
- Διηθητικό χαρτί
- Ογκομετρικός σωλήνας
- Πλαστικό σακουλάκι ερμητικά κλεισμένο

Για την απομάκρυνση του ελαίου, αρχικά μετρήθηκαν εντός της κάψας 8 g κοκκομετριμένης ψίχας με την βοήθεια ζυγαριάς, τα οποία μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη. Με χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετρήθηκαν και έπειτα τοποθετήθηκαν εντός της ίδιας κωνικής φιάλης, 120 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Η κωνική τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για 15 min. Έπειτα ακολούθησε διήθηση όπου απομακρύνθηκε το έλαιο με τον διαλύτη με χρήση διηθητικού χαρτιού εντός μιας άλλης κωνικής φιάλης. Για άλλες δυο φορές ακολούθησε η ίδια διαδικασία κρατώντας το ίδιο στερεό υπόλειμμα και προσθέτοντας 120 mL πετρελαϊκού αιθέρα ανά φορά, προκειμένου να αφαιρεθεί πλήρως το έλαιο από την ψίχα. Η απολιπασμένη ψίχα αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε σακουλάκι, μέχρι την επόμενη χρήση του (Εικόνες 11-12).



Εικόνα 11 Κάψα και ζυγαριά για την μέτρηση του δείγματος



Εικόνα 12 Απολίπανση ψίχας

B.5. Παρασκευή οξινισμένου υδρομεθανολικού διαλύματος

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, προστέθηκαν 40 mL μεθανόλης, 50 μ L HCl και απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Η χρήση οξέος μεγιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης.

B.6. Παραλαβή όξινων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων με την τεχνική της ανάδευσης υποβοηθούμενης από υπερήχους

Για την παραλαβή όξινων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Ζυγός με ακρίβεια δυο δεκαδικών ψηφίων
- Απολιπασμένη ψίχα
- Οξινισμένο υδρομεθανολικό διάλυμα
- Κωνική φιάλη των 25 mL
- Δυο δοκιμαστικοί σωλήνες (των 5 και 10 mL)
- Λουτρό υπερήχων
- Φυγόκεντρος
- Περιέκτες
- Πιπέτα Pasteur

Ζυγίστηκαν 2 g απολιπασμένης ψίχας τα οποία τοποθετήθηκαν εντός κωνικής φιάλης των 25 mL. Προστέθηκαν 14 ml οξινισμένου υδρομεθανολικού διαλύματος. Έγινε ανάδευση για 15 min στους 25 $^{\circ}$ C σε λουτρό υπερήχων και έπειτα έγινε φυγοκέντριση στις 7000 στροφές για 5 min. Το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε σε περιέκτη με πιπέτα Pasteur ενώ στο στερεό υπόλειμμα επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία της ανάδευσης και φυγοκέντρισης για άλλες δυο φορές. Κάθε φορά τα υπερκείμενα συλλέγονταν στον ίδιο περιέκτη (Εικόνα 13).

Το σύνολο των υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων που αποκτήθηκε με τις προηγούμενες διαδικασίες, τοποθετήθηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα συνδεδεμένο με υδατόλουτρο στους 25-35 $^{\circ}$ C. Στόχος ήταν να παραληφθεί το στερεό υπόλειμμα της εκχύλισης. Έτσι εξατμίστηκε η μεθανόλη έχοντας μικρότερο σημείο ζέσεως από το νερό (Εικόνες 14-16).



Εικόνα 13 Λουτρό υπερήχων



Εικόνα 14 Περιστρεφόμενος εξαμιστήρας



Εικόνα 15 Δείγμα φαινολικών συστατικών πριν την έναρξη λειτουργίας του περιστρεφόμενου συμπυκνωτήρα



Εικόνα 16 Δείγμα φαινολικών συστατικών μετά την λήξη λειτουργίας περιστρεφόμενου συμπυκνωτήρα

Μετά την ολοκλήρωση της εξάτμισης της μεθανόλης το εκχύλισμα μεταφέρθηκε για λυοφιλίωση με διάρκεια δυο ημερών μέχρι ξηρού, έως ότου δηλαδή εξατμιστεί το νερό (Εικόνες 17-18).



Εικόνα 17 Λυοφιλίωση



Εικόνα 18 Στερεό δείγμα μετά την λήξη της λυοφιλίωσης

B.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικού με τις δοκιμές DPPH, ABTS.

Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των φυτοχημικών συστατικών που περιέχουν τα φυτά, πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης.

B.7.1 Δοκιμή DPPH

B.7.1.1 Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH, ζυγίστηκαν 3,2 mg DPPH. Αυτό μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε με MeOH μέχρι την χαραγή. Η φιάλη αναδεύτηκε έντονα για λίγα δευτερόλεπτα και αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την χρησιμοποίησή της.

Στην συνέχεια παρασκευάστηκε το τυφλό διάλυμα, όπου σε έναν περιέκτη προστέθηκαν 4 mL διαλύματος DPPH. Σε άλλους τρεις περιέκτες (τρεις επαναλήψεις) προστέθηκαν, σε κάθε ένα από αυτά, 4 mL διαλύματος DPPH καθώς και 100 μ L του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος. Ακολούθησε ανάδευση με χρήση της συσκευής vortex και 30 s και επώαση στο σκοτάδι για 30 min. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των απορροφήσεων στα 515 nm έναντι του τυφλού με χρήση φωτόμετρου μηδενίζοντας το όργανο με διάλυμα MeOH. Υπολογίστηκε ο μέρος όρος των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με την τιμή IC50, όπου χαμηλότερη τιμή IC50 σημαίνει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Για τον υπολογισμό του IC50 παρασκευάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις δείγματος φαινολικών συστατικών :

- 0,5 mg δείγματος /1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 1 mg δείγματος /1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 2 mg δείγματος /1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 3 mg δείγματος /1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 4 mg δείγματος /1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος

Για τον υπολογισμό του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης έγινε χρήση της Εξίσωσης B.8.1.1.1 :

$$\% \text{ παρεμποδιστικής δράσης} = \frac{A_{515} \text{ τυφλό} - A_{515} \text{ δείγμα}}{A_{515} \text{ τυφλό}} \times 100 \text{ (Εξίσωση B.8.1.1.1)}$$

Επιπλέον δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης συναρτήσει των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δείγματος. Μέσω της εξίσωσης που προέκυψε από το διάγραμμα ($IC_{50} = (50 - 21,717) / 20,119$) υπολογίστηκε το IC_{50} .

B.7.2 Δοκιμή ABTS

B.7.2.1 Πειραματική διαδικασία

Οι συγκεντρώσεις από το δείγμα φαινολικών συστατικών που παρασκευάστηκαν προκειμένου να γίνει η δοκιμή ABTS ήταν οι εξής :

- 0,5 mg δείγματος / 1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 0,2 mg δείγματος / 1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 0,1 mg δείγματος / 1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 0,05 mg δείγματος / 1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος
- 0,01 mg δείγματος / 1 mL υδρομεθανολικού εκχυλίσματος

Ζυγίστηκαν 96 mg ABTS και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Η φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή και ακολούθησε ανάδευση. Επιπλέον, ζυγίστηκαν 37,9 mg διαλύματος $K_2S_2O_8$ και μεταφέρθηκαν σε περιέκτη στον οποίο προστέθηκε και 1 mL απιονισμένο νερό και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με χρήση της συσκευής vortex. Από το διάλυμα που προέκυψε, ελήφθησαν με χρήση πιπέτας 440 μ L και προστέθηκαν στην ογκομετρική φιάλη με το ABTS. Η ογκομετρική φιάλη αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι για 18 h, σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου σταθεροποιηθεί η οξείδωση του $ABTS^+$. Πριν από περαιτέρω χρήση, το διάλυμα $ABTS^+$ αραιώθηκε με MeOH, έως ότου η απορρόφηση αποκτήσει τιμή $0,7 \pm 0,005$ (διάλυμα εργασίας).

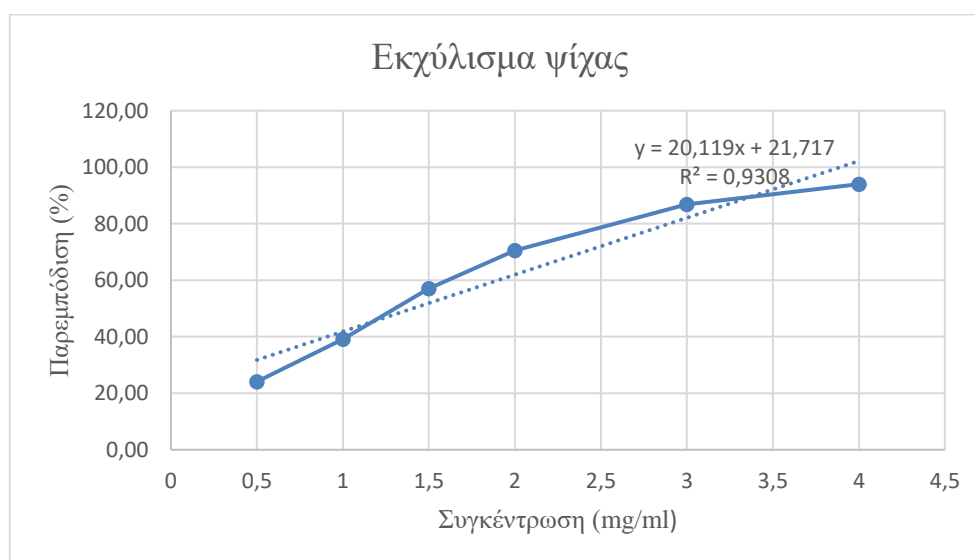
Στην συνέχεια, παρασκευάστηκε το τυφλό διάλυμα με 100 μ L MeOH και 2 mL από το διάλυμα εργασίας. Ακόμη σε τρεις επιπλέον περιέκτες, προστέθηκαν 2 mL διαλύματος εργασίας και 100 μ L από το υδρομεθανολικό εκχύλισμα. Ακολούθησε επώαση για 6 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών στα 734 nm έναντι του τυφλού με χρήση φωτόμετρου το οποίο μηδενίστηκε με MeOH. Λήφθηκε ο μέρος όρος των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων (Εικόνες 20-25).

B.7.3 Αποτέλεσμα-Συζήτηση

Ο μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων του δείγματος φαινολικών συστατικών για κάθε συγκέντρωση, σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH παρουσιάζεται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2 Μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης σύμφωνα με την δοκιμή DPPH

C (mg/mL)	Απορρόφηση	Παρεμπόδιση (%)
0,5	0,69	24,10
1	0,55	39,19
1,5	0,391	57,03
2	0,27	70,51
3	0,12	86,89
4	0,05	93,99

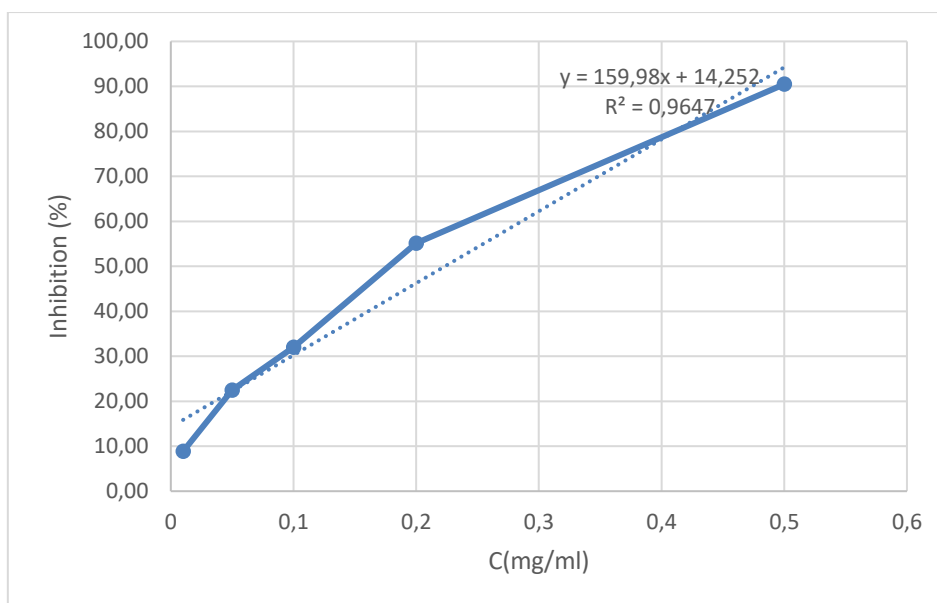


Διάγραμμα 1 Διάγραμμα συγκεντρώσεων συναρτήσει της παρεμποδιστικής δράσης σύμφωνα με την δοκιμή DPPH.

Ο μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων του δείγματος φαινολικών συστατικών για κάθε συγκέντρωση, σύμφωνα με την δοκιμή ABTS παρουσιάζεται στον πίνακα 3:

Πίνακας 3 Μέσος όρος του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης και των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων της κάθε συγκέντρωσης σύμφωνα με την δοκιμή ABTS

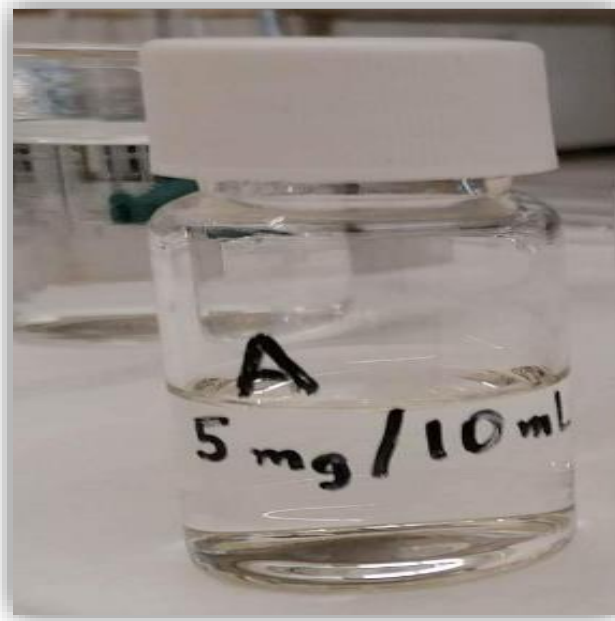
C (mg/mL)	Απορρόφηση	Παρεμπόδιση (%)
0,01	0,67	8,84
0,05	0,57	22,45
0,1	0,5	31,97
0,2	0,33	55,10
0,5	0,07	90,48



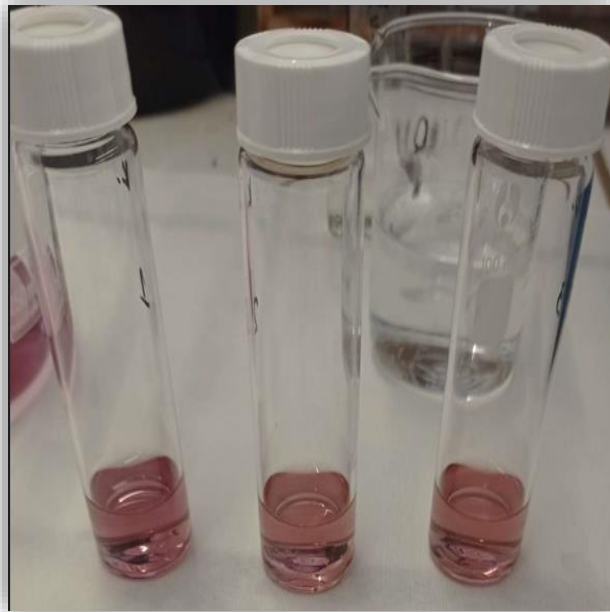
Διάγραμμα 2 Διάγραμμα συγκεντρώσεων συναρτήσει της παρεμποδιστικής δράσης σύμφωνα με την δοκιμή ABTS.

Από την εξίσωση του διαγράμματος 1 το IC₅₀ για την δοκιμή DPPH βρέθηκε 1,41 mg/mL ενώ για την δοκιμή ABTS από την εξίσωση του διαγράμματος 2 βρέθηκε 0,22 mg/mL. Οι Taghizadeh et al. (2018) αναφέρουν πως στην ψίχα πέντε ποικιλιών *pistachio vera L.* (*Ahmad aghaei, Akbari, Kalehghoochi, Owhadi, Badami-e-sefid*) από τέσσερις γεωγραφικές περιοχές του Ιράν, το IC₅₀ βρέθηκε χαμηλότερο, χρησιμοποιώντας μικρότερες συγκεντρώσεις δείγματος (100-300 μg/mL). Ακόμη, σε πείραμα που διεξήχθη σε *Pistacia Vera L.* ποικιλίας *Bronte* το IC₅₀ βρέθηκε 14,99 ±1,43 mg/l (Tomaino et al., 2010). Τέλος, σε πείραμα που διεξήχθη στην Ισπανία σε 11 ποικιλίες του είδους *Pistacia Vera L.* διαπιστώθηκε ότι σύμφωνα με την δοκιμή ABTS μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν οι ποικιλίες Larnaka, Mateur, Avdat, και Αίγινα ενώ σύμφωνα με την μέθοδο DPPH η Larnaka παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ακολουθούμενη από τις Mateur, Avdat, και

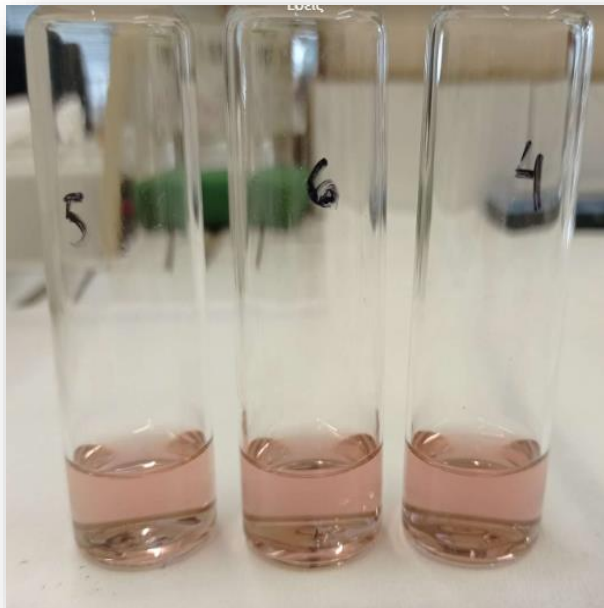
Αίγινα, ενώ οι ποικιλίες Golden Hills και Kalehghouchi έδειξαν την χαμηλότερη (Moreno-Rojas et al., 2022).



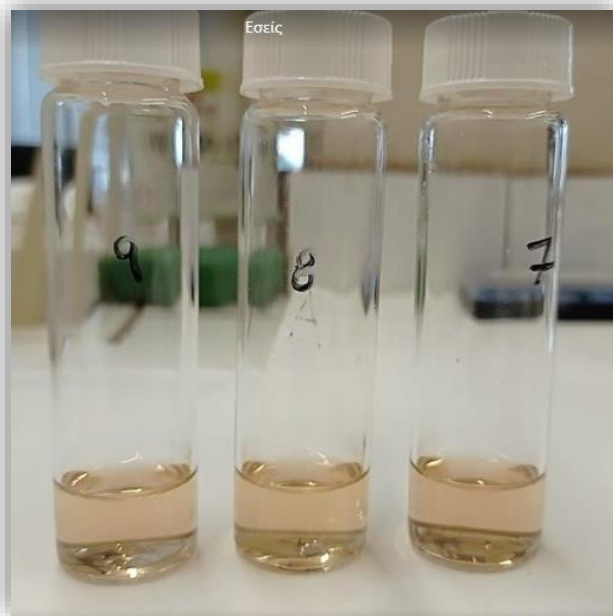
Εικόνα 19 Δοκιμή DPPH: 0,5 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση



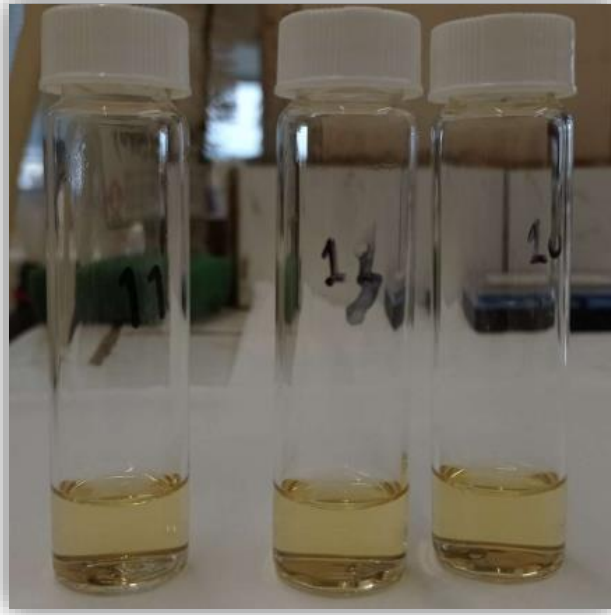
Εικόνα 20 Δοκιμή DPPH: 1 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση



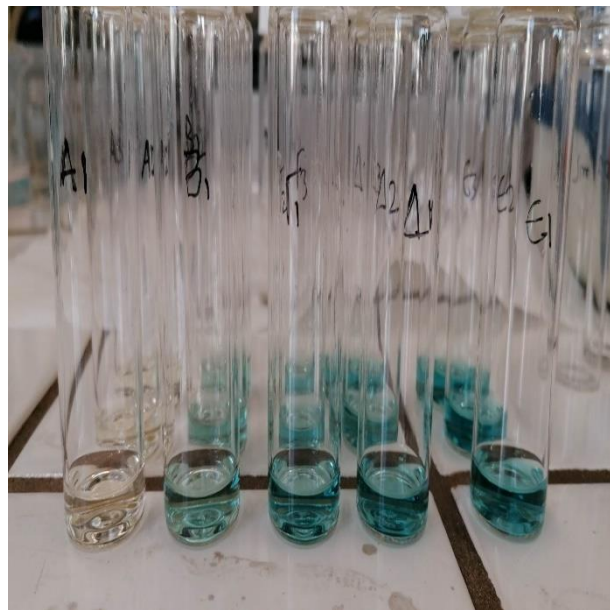
Εικόνα 21 Δοκιμή DPPH: 2 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση



Εικόνα 22 Δοκιμή DPPH: 3 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση



Εικόνα 23 Δοκιμή DPPH: 4 mg δείγματος σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος μετά την επώαση



Εικόνα 24 Δοκιμή ABTS: Όπου A1: 0,05 mg/mg, A2: 0,2 mg/mL, A3: 0,1 mg/mL, A4: 0,05 mg/mL και A5: 0,01 mg/mL.

B.7.4 Συμπέρασμα

Φαίνεται πως η ελληνική ποικιλία Αιγίνης, πιθανόν να παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την ποικιλία Bronte ενώ σύμφωνα με έρευνες σε ποικιλίες Αιγίνης καλλιεργούμενες σε άλλες γεωγραφικές ζώνες παρουσιάζουν εξίσου

υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με ποικιλίες όπως η Golden Hills. Οι διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών μεταξύ ποικιλιών μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στα χημικά χαρακτηριστικά του νερού ή χώματος καθώς και σε γενετικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα (Taghizadeh et al., 2018). Ακόμη οι Noguera-Artiaga et al. (2018) έφτασαν στο συμπέρασμα βάσει της δοκιμής ABTS πως το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά δεν είναι πάντα ανάλογο με την αντιοξειδωτική δράση αντίθετα η ποιοτική σύσταση παρά η συγκέντρωση, είναι περισσότερο υπεύθυνη για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τέλος, σε έρευνα που διεξήχθη σε επτά ποικιλίες φιστικιάς στην Ανδαλουσία υποστηρίζεται πως τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των αντιοξειδωτικών μεθόδων πιθανών να οφείλονται σε άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται στο υδροφοβικό κλάσμα και αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες (Moreno-Rojas et al., 2022).

B.8 Προσδιορισμός πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

B.8.1 Πειραματική διαδικασία

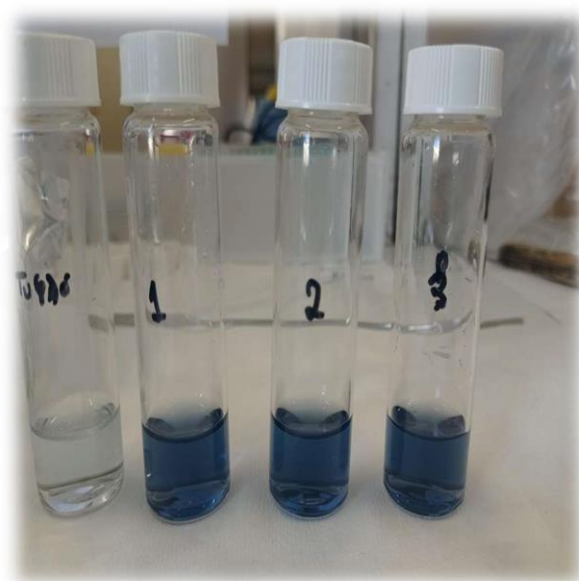
Αρχικά ζυγίστηκαν 1 mg ξηρού δείγματος φαινολικών συστατικών τα οποία διαλύθηκαν σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος.

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 7,5 mg Na_2CO_3 και απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε ανάδευση στο λουτρό υπερήχων μέχρι την διαλυτοποίηση του Na_2CO_3 .

Για την παρασκευή του τυφλού προστέθηκαν σε έναν περιέκτη 400 μL MeOH, 100 μL απιονισμένο νερό και 2,5 mL Folin-Ciocalteu (0,2 M). Μετά από 5 min προστέθηκε 2 mL Na_2CO_3 . Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 s με χρήση της συσκευής vortex και επώαση στο σκοτάδι για 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ανά 30 min πραγματοποιούνταν ανάδευση για 30 s. Ακριβώς η ίδια διαδικασία έγινε σε άλλους τρεις περιέκτες (τρεις επαναλήψεις), με τη διαφορά πως αντί για MeOH προστέθηκαν, σε κάθε ένα από αυτά, 400 μL από το υδρομεθανολικό εκχύλισμα. Στην συνέχεια, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 765 nm με χρήση φωτομέτρου μηδενίζοντας το όργανο με το τυφλό. Υπολογίστηκε ο μέρος όρος των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με βάση το γαλλικό οξύ, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος σε MeOH (μητρικό διάλυμα – stock solution) συγκέντρωσης 1mg/mL, στη συνέχεια με αραιώση (με τελικό όγκο $v=2$ mL)

παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα γαλλικού οξέος με συγκεντρώσεις 0,012, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 mg/mL. Στην πορεία, παρασκευάστηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε αραίωση. Σε κάθε τριπλέτα προστέθηκαν 400 μ L από την ανάλογη συγκέντρωση, 100 μ L απιονισμένο νερό, 2,5 mL Folin-Ciocalteu (0,2 M), και ύστερα από 5 min προστέθηκε 2 mL Na_2CO_3 . Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 s με χρήση της συσκευής vortex και επώαση στο σκοτάδι για 1,5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ανά 30 min πραγματοποιούνταν ανάδευση για 30 s. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 765 nm. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων (Εικόνα 25).



Εικόνα 25 Μετατροπή του κίτρινου χρώματος του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu σε μπλε μετά την αντίδραση του με το δείγμα φαινολικών συστατικών.

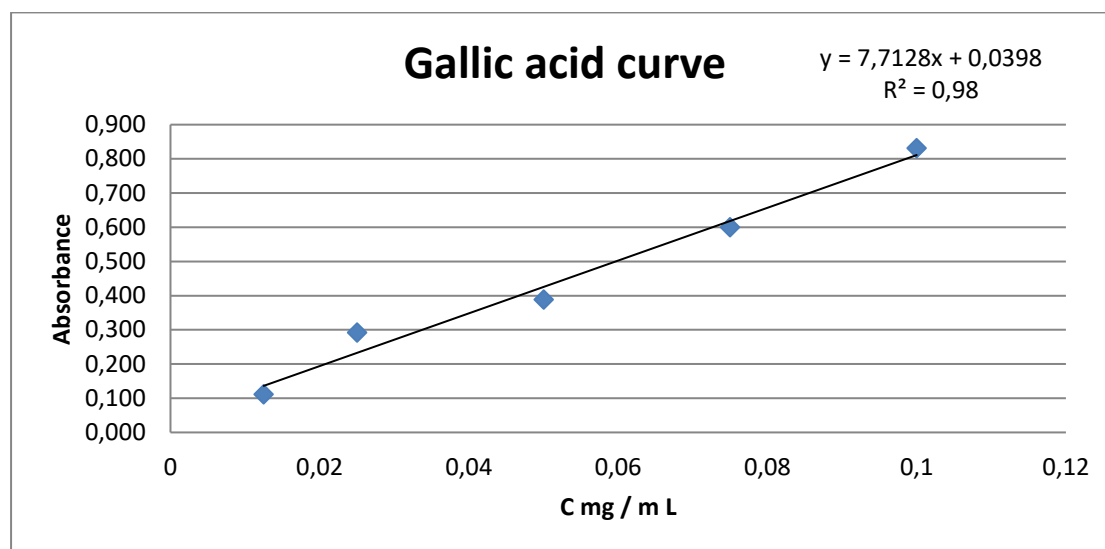
B.8.2 Αποτέλεσμα-Συζήτηση

Στον πίνακα 4 φαίνονται οι συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος και οι αντίστοιχες απορροφήσεις με τις οποίες κατασκευάστηκε στην συνέχεια η πρότυπη καμπύλη.

Πίνακας 4 Απορροφήσεις γαλλικού οξέος για τις συγκεντρώσεις 0,012, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 mg/mL

Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg/mL)	Απορρόφηση (nm)
0,012	0,112
0,025	0,292
0,05	0,388
0,075	0,600
0,1	0,831

Η πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος βάσει των παραπάνω μετρήσεων αποτυπώνεται στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Επιπλέον, ο μέσος όρος των απορροφήσεων των τριών επαναλήψεων για το 1 mg υδρομεθανολικού δείγματος φαινολικών συστατικών υπολογίστηκε 0,6 nm.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της ευθείας που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος ($y=7.7128x + 0,0398$) τα αποτελέσματα της μεθόδου F-C, εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg Gallic acid/g Dry extract). Κατά συνέπεια για απορρόφηση $y=0,6$ nm, η συγκέντρωση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος φαινολικών συστατικών βρέθηκε ίση με 73 mg GA/g DE. Σύμφωνα με έρευνα που έγινε στο Iran για την αξιολόγηση του φαινολικού προφίλ και της αντιοξειδωτικής ικανότητας πέντε ποικιλιών *Pistacia vera*, τα αποτελέσματα σύμφωνα με την μέθοδο F-C όπου ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη κυμαίνονταν μεταξύ 135-138 mg GA/g DE (Taghizadeh et al., 2018). Σε άλλη έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από την ψίχα ποικιλίας *Pistacia Vera var. Sarakis*. Βρέθηκε ότι όταν ο διαλύτης για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών είναι το νερό, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά ισοδυναμεί με 92 mg GA/g DE και αν είναι η μεθανόλη με 112 mg GA/g DE (Taghizadeh, Rezaee, Davarynejad, Karimi, Nemati & Asili, 2018).

B.8.3 Συμπέρασμα

Οι Taghizadeh et al. (2018) κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών επιδρά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και με σειρά αιθανόλη>μεθανόλη>νερό>εξάνιο. Κατά συνέπεια συγκριτικά με τις έρευνες που προαναφέρθηκαν, το υδρομεθανολικό εκχύλισμα φαινολικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα φαίνεται να παρουσιάζει χαμηλότερο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά.

B.9 Φασματοσκοπική ανάλυση φαινολικών συστατικών με την χρήση της τεχνικής FTIR

Μελετήσαμε φασματοσκοπικά την ψίχα φιστικιού για να δούμε σε σύντομο χρονικό διάστημα το φαινολικό του προφίλ και έπειτα με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών προσδιορίσαμε με ακρίβεια τα φαινολικά συστατικά τα οποία περιέχει.

Ελήφθησαν τα φάσματα για το ανεπεξέργαστο δείγμα της ψίχας πριν την απομάκρυνση του λαδιού, της απολιπασμένης ψίχας μετά την είσοδο της στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα με σκοπό την απομάκρυνση των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών καθώς και του ξηρού δείγματος φαινολικών συστατικών αμέσως μετά την λυοφιλίωση.

B.9.1 Πειραματική διαδικασία

Με σκοπό την λήψη φασμάτων FTIR έγινε χρήση του φασματοφωτόμετρου IROS 05 της εταιρείας Ostec. Η καταγραφή τους έγινε με βάση την τεχνική ATR και με υποδοχέα δείγματος πρίσμα διαμαντιού. Πριν την λήψη των φασμάτων του δείγματος έγινε καταγραφή του φάσματος υποβάθρου (Background) με την χρήση μόνο του κρυστάλλου ATR. Έπειτα τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος στο πρίσμα του διαμαντιού και πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος του (διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} , 64 σαρώσεις). Για κάθε δείγμα καταγράφηκαν τρία φάσματα και πριν από κάθε λήψη, γινόταν καταγραφή του υποβάθρου.

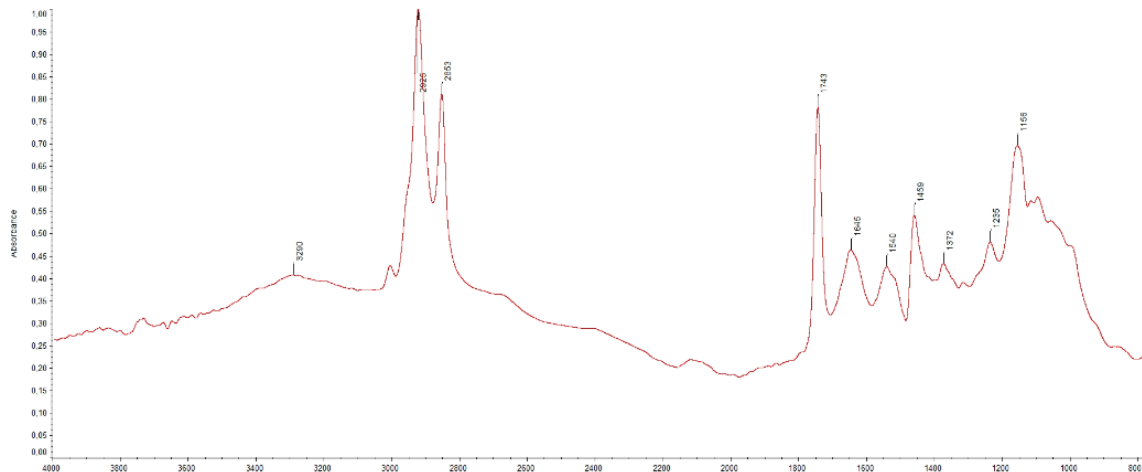
B.9.1.1 Επεξεργασία φασμάτων FTIR

Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό OMNIC 8.2.0.387 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA).

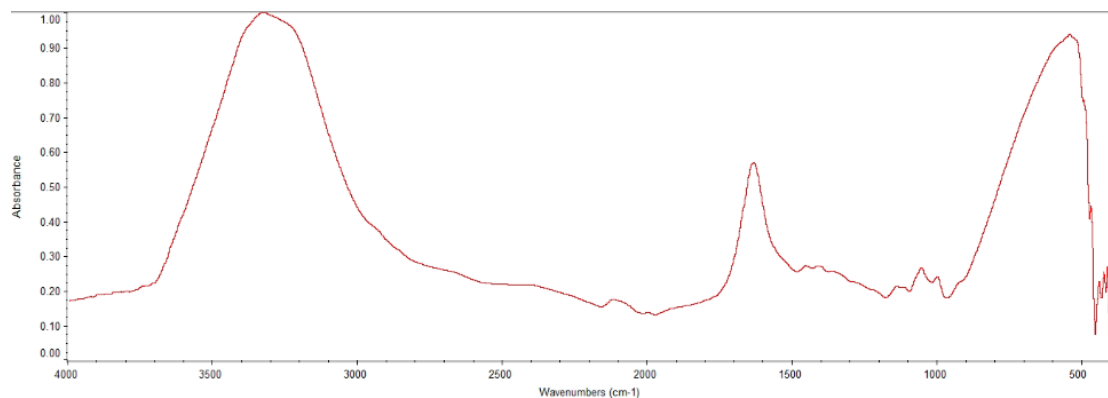
Για την λήψη των τελικών φασμάτων έγιναν τρεις επαναλήψεις για το κάθε στάδιο. Τα φάσματα εξομαλύνθηκαν (automatic smooth) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay (πέντε κινούμενων σημείων με χρήση πολυώνυμου δεύτερου βαθμού) και η γραμμή βάσης διορθώθηκε χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση αυτόματης διόρθωσης βασικής γραμμής (automatic baseline correct) (πολυώνυμο δεύτερου βαθμού, 20 επαναλήψεις). Στη συνέχεια, από τις τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα υπολογίστηκε το μέσο φάσμα του και μετασχηματίστηκε με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk. Η μετατροπή Kubelka-Munk αντιστάθμισε μερικά από τα ακόλουθα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά του ακατέργαστου φάσματος: οι ζώνες χαμηλής έντασης ήταν αυξημένες σε σχέση με τις έντονες ζώνες απορρόφησης και οι ζώνες ισχυρής έντασης εμφάνιζαν ευρεία και στρογγυλά σχήματα κορυφής. Τέλος, η κλίμακα απορρόφησης φασμάτων κανονικοποιήθηκε.

B.9.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

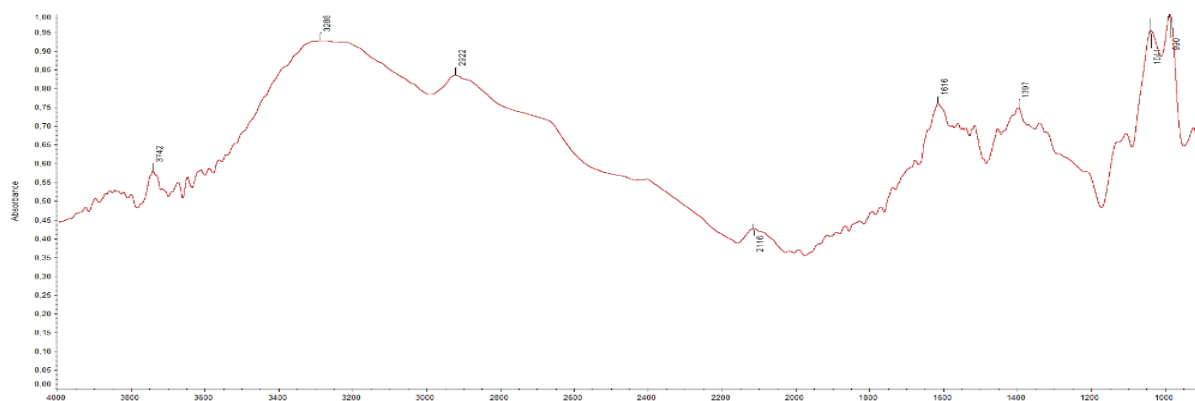
Ακολουθούν τα φάσματα από τα τρία στάδια επεξεργασίας της ψίχας που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικόνες 26- 28).



Εικόνα 26 Φάσμα FTIR ανεπεξέργαστης κοκκομετριμένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού



Εικόνα 27 Φάσμα απολιπασμένης κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φυσικιού μετά τη χρήση του περιστρεφόμενου εξατμιστήρα.



Εικόνα 28 Φάσμα ξηρού δείγματος φαινολικών συστατικών ψίχας κελυφωτού φυσικιού μετά την λυοφιλίωση.

Πίνακας 5 Απόδοση των κορυφών του φάσματος κοκκομετρημένης ψίχας (Socrates, 2004)

Κυματριθμός (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα	Τύπος Δόνησης
4000-3200	O-H	Τάσης
3030-3020	CH ₃	Τάσης
3010	=C-H	Τάσης
2925	CH ₂	Τάσης
2859	CH ₂	Τάσης
1743-1540	C=O	Τάσης
1459	CH ₂	Κάμψης
1400-1397	C=C (αρωματικός δακτύλιος)	Τάσης
1372	CH ₃	Κάμψης

Στο φάσμα FTIR η ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων αρωματικού δακτυλίου καθώς και υδροξυλίων και εστέρων συνδέεται και με την παρουσία φαινολικών συστατικών στην ψίχα κελυφωτών φυσικιών ποικιλίας Αιγίνης. Επιπλέον, οι κορυφές στα 3030-

3010, 2925, 2859, 1459, 1372 cm^{-1} που παρουσιάζονται στο ανεπεξέργαστο δείγμα και όχι στο τελικό απολιπασμένο, δείχνει την ύπαρξη λιπαρών συστατικών τα οποία με την διαδικασία που ακολουθήθηκε απομακρύνθηκαν.

B.9.3 Συμπέρασμα

Επομένως, με τη χρήση της μεθόδου FTIR είναι εφικτό σε σύντομο χρονικό διάστημα να αποκτηθεί μια εικόνα της ύπαρξης φαινολικών συστατικών στο δείγμα. Συνδυαστικά με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζων μπορεί να γίνει ακριβής προσδιορισμός της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης αυτών.

B.10 Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζων με αναλυτή χρόνου πτήσης (Q-TOF LC-MS)

B.10.1 Πειραματική διαδικασία

Η ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε στα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα της ψίχας φιστικιών. Για την παρασκευή αυτού του εκχυλίσματος, ζυγίστηκαν με ζυγό ακριβείας 10 mg δείγματος και προστέθηκαν σε 10 mL διαλύματος μεθανόλης- H_2O και έπειτα τοποθετήθηκαν για 10 s σε λουτρό υπερήχων. Στην συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε με φίλτρο γενικής χρήσης (PTFE 25 m, 045 nm). Από αυτό λήφθηκε 1 mL και εισήχθη στο όργανο για ανάλυση.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του φασματόμετρου μάζων Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) συνδεδεμένο με υγρή χρωματογραφία Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), εξοπλισμένη με στήλη NUCLEOSHELL Bluebird RP 18, 2.7 μm , 100 x 2.6 mm (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο νερό με οξικό οξύ 0,1 % ως διαλύτης A και ακετονιτρίλιο με οξικό οξύ 0,1 % ως διαλύτης B, με ρυθμό ροής 1,0 mL/min και πίεση 600 bar. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, σύμφωνα με τον πίνακα 6.

Πίνακας 6 Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης υγρής χρωματογραφίας

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
8.0	70	30
12.0	60	40
16.0	50	50
18.0	90	10
33.0	90	10

Ο ενέσιμος όγκος εκχυλίσματος του κάθε δείγματος ήταν 10 μ L και η ένεση έγινε μέσω αυτόματου δειγματολήπτη. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αρνητικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ECI). Για να επιτευχθεί συνεχής διόρθωση της βαθμονόμησης του συστήματος κατά την λειτουργία του αρνητικού ιοντισμού διοχετεύτηκε κατάλληλο διάλυμα με ιόντα αναφοράς, τα οποία είχαν τιμές m/z 112,9856 και 1033,9881. Οι παράμετροι του οργάνου που εφαρμόστηκαν για τα πειράματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων έγινε με την βοήθεια του λογισμικού Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.01 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

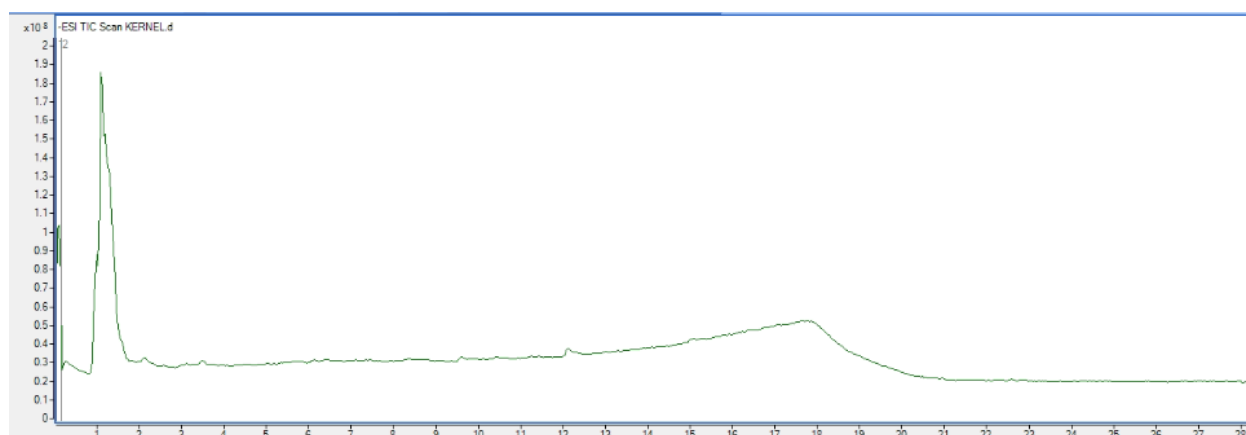
Πίνακας 7 Παράμετροι οργάνου

Θερμοκρασία αέριου αποδιαλύτωσης	300 °C
Ροή αερίου αποδιαλύτωσης	10 L/min
Πίεση αερίου εκνεφωτή	45 psig
Δυναμικό τριχοειδούς	3500 V
Δυναμικό θραυσματοποίησης	150 V
Δυναμικό αποκορυφωτή/ διαχωριστή ιόντων	65 V

Η ταυτοποίηση των περισσότερων ενώσεων έγινε με βάση το σφάλμα μάζας (mass error), με ακρίβεια ± 5 ppm και το χρόνο κατακράτησης (retention time, R.T.) διαθέσιμων πρότυπων ενώσεων.

B.10.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Το χρωματογράφημα που απεικονίζει τον χρόνο έκλυσης του δείγματος φαινολικών συστατικών συναρτήσει της αφθονίας τους φαίνεται στην εικόνα 29.



Εικόνα 29 Χρωματογράφημα δείγματος φαινολικών συστατικών του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικιών

Στον πίνακα 8 φαίνονται τα φαινολικά συστατικά που εντοπίστηκαν στο δείγμα ψίχας φιστικιών ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης βάση πρότυπων ενώσεων.

Πίνακας 8 Φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στην ψίχα φιστικιών ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης βάση πρότυπων ενώσεων

Πρότυπες Ενώσεις	Μοριακός Τύπος	Γραμμομοριακή Μάζα (g/mol)	[M-H] ⁻ Θεωρητικό	[M-H] ⁻ Πειραματικό	Σφάλμα μάζας (ppm)	Χρόνος Έκλυσης Δείγματος (min)
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	170,02152	169,01425	169,0144	0,2958	1,749
Ομογεντισικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	168,04226	167,0350	167,0350	0,0000	2,12
Γεντισικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	154,0266	153,0193	153,0196	-1,9605	2,458
Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07176	289,0715	0,8994	3,54
4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	138,0317	137,0244	137,0243	0,7298	3,607
4-υδροξυφαινολοξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	152,04734	151,0401	151,0404	-2,1849	3,776
Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07176	289,0717	0,2076	4,351
Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	168,0423	167,035	167,0344	3,5921	4,486
Γαλλική_επιγαλοκατεχίνη	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,08491	457,0776	457,0766	2,2753	4,857
Μυρικιτρίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,09548	463,0882	463,0865	3,6710	6,682
Αμπισικό οξύ	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,13616	263,1289	263,1289	0,0000	9,014

Επομένως η μεγαλύτερη κορυφή που απεικονίζεται στο χρωματογράφημα πιθανόν να αντιστοιχεί στο γαλλικό οξύ με χρόνο έκλουσης τα 1,75 min. Επιπλέον, φαίνεται να έχουν προσδιοριστεί όλες οι διακριτές κορυφές του χρωματογραφήματος. Σε πείραμα που έγινε σε φάρμα της Ισπανίας σε διάφορες ποικιλίες φιστικιάς μεταξύ των οποίων και η ποικιλία Αιγίνης, ταυτοποιήθηκαν με χρήση της μεθόδου LC-MS-QToF/PDA τα φαινολικά συστατικά της ψίχας. Μεταξύ αυτών ήταν το γαλλικό οξύ και επικατεχίνη, καθώς και άλλα φαινολικά συστατικά κάποια από τα οποία ήταν και τα πρωτοκατεχουϊκό οξύ, ο 3-Ο-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης, το Ο-εξοσίδιο της μυρικετίνης και το 3-Ο-ρουτινοσίδιο της κερκετίνης (Noguera-Artiaga et al., 2019). Ακόμη, σε πείραμα που έγινε σε ποικιλία Kerman από τους Noguera-Artiaga et al. και Grace et al., προσδιορίστηκε και η κατεχίνη αλλά και φαινολικά συστατικά κοινά με τους Noguera-Artiaga et al. (2019) (Noguera-Artiaga et al., 2018 - Grace et al., 2016). Τέλος, σε πείραμα που διεξήχθη στην Ανδαλουσία σε ψίχα επτά ποικιλιών φιστικιάς μεταξύ των οποίων οι ποικιλίες Αιγίνης, Λάρνακα και άλλες διαπιστώθηκε σύμφωνα με την μέθοδο UHPLC-MS ότι για τις περισσότερες από αυτές το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ ακολουθούμενο από το βανιλικό οξύ (Moreno-Rojas et al., 2022).

B.10.3 Συμπέρασμα

Με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (Q-TOF LC-MS) και με την βοήθεια πρότυπων ενώσεων εξασφαλίστηκε η ταυτοποίηση 11 φαινολικών ενώσεων στο υδρομεθανολικό εκχύλισμα με κυρίαρχο αυτών το γαλλικό οξύ. Πολλά αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποικιλία Αιγίνης.

Πολλές έρευνες υποστηρίζουν πως το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά είναι σημαντικά μεγαλύτερο στο περικάρπιο από ότι στην ψίχα των φιστικιών (Carle & Schweiggert, 2016).

B.11 Προσδιορισμός αντι-μικροβιακής δράσης του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικιών

B.11.1 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος και προετοιμασία μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των φαινολικών συστατικών της ψίχας κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης

(+) κατά Gram	(-) κατά Gram
<i>Staphylococcus aureus</i> (B134)	<i>Escherichia coli</i> (B16)
<i>Bacillus subtilis</i> (B109)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (B29)

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για τους σκοπούς του πειράματος προέρχονται από την συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το EMBT. Η συντήρησή τους γίνεται σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C) σε θρεπτικό διάλυμα Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50 % του συνολικού όγκου για προστασία της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών.

Η επώαση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον πίνακα 10 :

Πίνακας 10 Συνθήκες επώασης μικροοργανισμών

Μικροοργανισμός	Ώρες Επώασης (h)	Θερμοκρασία Επώασης(°C)
<i>E.coli</i>	18-24	37
<i>P.fluorescens</i>	24-48	25
<i>B.subtilis</i>	18-24	37
<i>S.aureus</i>	18-24	37

Το θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στα τρυβλία ήταν το Tryptone Soy Agar (TSA). Για την παρασκευή του ζυγίστηκαν 37 g TSA τα οποία διαλύθηκαν με ανάδευση σε 1 lt απιονισμένο νερό (Εικόνα 30).

Επιπλέον για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Ringer, όπου για την παρασκευή του διαλύθηκαν δυο ταμπλέτες Ringer σε 1 lt απιονισμένο νερό. Καθένας από τους δοκιμαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αραιώσεις περιείχε 9 mL διαλύματος Ringer.



Εικόνα 30 Πορεία δημιουργίας θρεπτικού δ/τος

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για περίπου 2 h. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες ενώ για λόγους καθαρά επαναληψιμότητας γίνεται πάντα τριπλή επανάληψη.

B.11.2 Ζωτικότητα μικροοργανισμών

B.11.2.1 Πειραματική διαδικασία

Πριν την προσθήκη των μικροοργανισμών σε κάποιο θρεπτικό διάλυμα (στο πείραμα TSB), προηγήθηκε η ανανέωση τους. Διεξήχθει μια ανανέωση πριν το πείραμα με σκοπό την επίτευξη όσο των δυνατών καλύτερων αποτελεσμάτων από πλευρά

ζωτικότητας. Κατά την ανανέωση, έγινε λήψη 100 μL κυττάρων από το stock και έπειτα μεταφορά αυτής της ποσότητας σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB. Ακολούθησε επώση στις κατάλληλες για κάθε μικροοργανισμό συνθήκες.

Παραλήφθηκε από τον δοκιμαστικό σωλήνα με το TSB, μια μικρή ποσότητα από τον καθένα με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου. Έπειτα μεταφέρθηκε σε τρυβλίο με TSA με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί η ευδιάκριτη απομόνωση μιας αποικίας. Ακολούθησε πάλι επώση στις κατάλληλες για κάθε μικροοργανισμό συνθήκες (Εικόνα 31).

B.11.2.2 Συζήτηση-Αποτελέσματα



Εικόνα 31 Ζωτικότητα

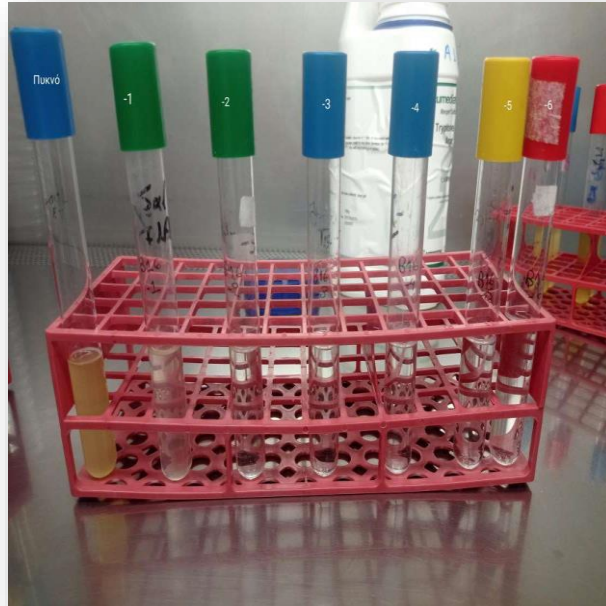
Όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν υψηλή καθαρότητα και ζωτικότητα.

B.11.3 Μέθοδος καταμέτρησης μικροοργανισμών

B.11.3.1 Πειραματική διαδικασία

Προκειμένου να είναι εφικτή η καταμέτρηση μικροοργανισμών στο αρχικό πυκνό υγρό θρεπτικό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις. Με τη χρήση μικροπιπέτας λήφθησαν 1000 μL από το πυκνό διάλυμα μικροοργανισμών και μεταφέρθηκαν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, με διάλυμα Ringer. Αυτό αποτέλεσε την

πρώτη αραιώση (10^{-1} CFU/mL). Από την αραιώση αυτή, λήφθηκαν 100 μ L και μεταφέρθηκαν σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα (10^{-2} CFU/mL). Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως την αραιώση 10^{-6} CFU/mL. Οι δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς (Εικόνα 32).

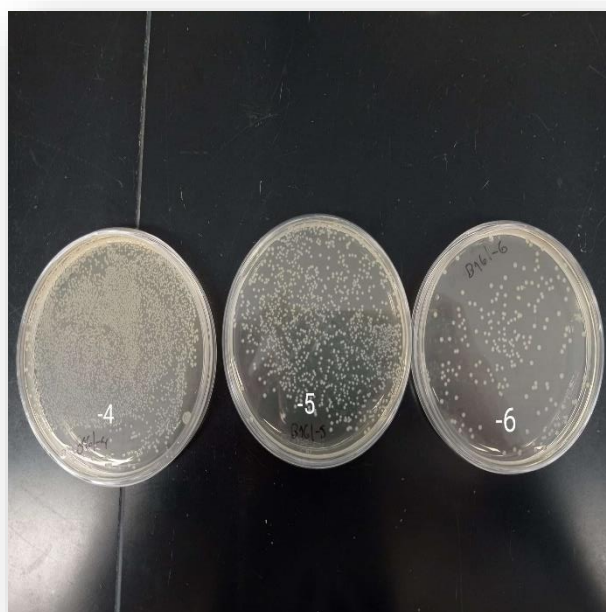


Εικόνα 32 Δεκαδικές αραιώσεις

Από τις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} CFU/mL λήφθηκαν 100 μ L με την χρήση μικροπιπέτας και προστέθηκαν σε τρυβλίο με θρεπτικό διαλυμα TCA με την μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις για κάθε μια αραιώση. Τα τρυβλία με τον μικροοργανισμό *Pseudomonas* επώαστηκαν για 24 h στους 25 $^{\circ}$ C και τα υπόλοιπα στους 35 $^{\circ}$ C.

B.11.3.2 Αποτέλεσμα-Συζήτηση

Escherichia coli :



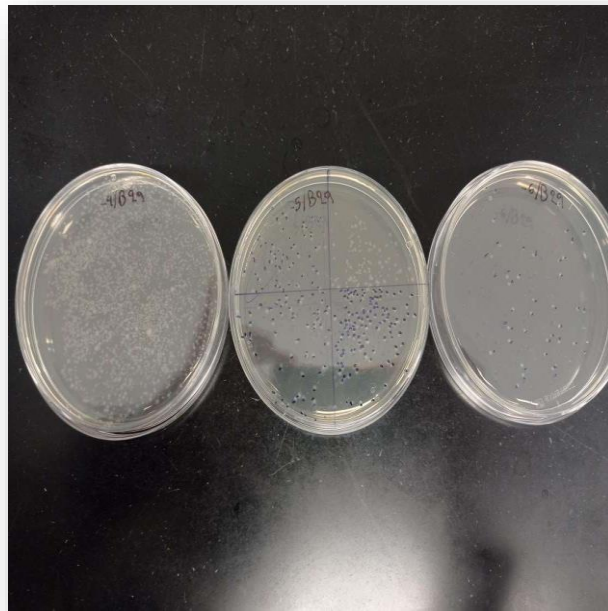
Εικόνα 33 Πληθυσμός μικροοργανισμού *E.coli* στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Βρίσκοντας τον μέσο όρο του αριθμού των αποικιών των δυο επαναλήψεων για τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-6} βρέθηκε ότι στο αρχικό πυκνό διάλυμα υπήρχαν $7,9 \cdot 10^7$ CFU/mL μικροοργανισμοί. Ο υπολογισμός προέκυψε σύμφωνα με τον πίνακα 11.

Πίνακας 11 Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού *Escherichia coli*

Αραίωση	CFU/mL
-6	208 ± 11.3
-5	792 ± 67.9
-4	$7,9 \cdot 10^3$
-3	$7,9 \cdot 10^4$
-2	$7,9 \cdot 10^5$
-1	$7,9 \cdot 10^6$
0	$7,9 \cdot 10^7$

Pseudomonas fluorescens :



Εικόνα 34 Πληθυσμός μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens* στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Βρίσκοντας τον μέσο όρο του αριθμού των αποικιών των δυο επαναλήψεων για τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-6} βρέθηκε ότι στο αρχικό πυκνό διάλυμα υπήρχαν $3,6 \cdot 10^7$ CFU/mL μικροοργανισμοί. Ο υπολογισμός προέκυψε σύμφωνα με τον πίνακα 12.

Πίνακας 12 Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens*

Αραίωση	CFU/mL
-6	53 ± 14.1
-5	356 ± 135.8
-4	$3,6 \cdot 10^3$
-3	$3,6 \cdot 10^4$
-2	$3,6 \cdot 10^5$
-1	$3,6 \cdot 10^6$
0	$3,6 \cdot 10^7$

***Bascilus subtilis* :**



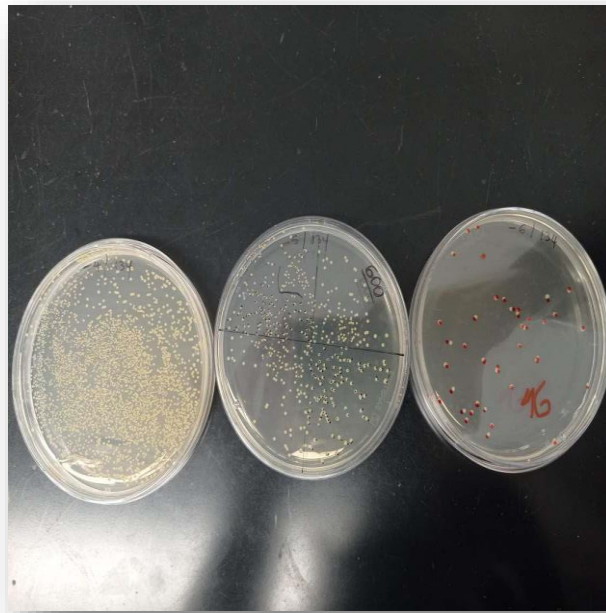
Εικόνα 35 Πληθυσμός μικροοργανισμού *Bascilus subtilis* στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Βρίσκοντας τον μέσο όρο του αριθμού των αποικιών των δυο επαναλήψεων για τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-6} βρέθηκε ότι στο αρχικό πυκνό διάλυμα υπήρχαν $5,5 \cdot 10^5$ CFU/mL μικροοργανισμοί. Ο υπολογισμός προέκυψε σύμφωνα με τον πίνακα 13.

Πίνακας 13 Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού *Bascilus subtilis*

Αραίωση	CFU/mL
-6	$0,5 \pm 0,7$
-5	$5,5 \pm 0,7$
-4	$5,5 \cdot 10$
-3	$5,5 \cdot 10^2$
-2	$5,5 \cdot 10^3$
-1	$5,5 \cdot 10^4$
0	$5,5 \cdot 10^5$

Staphylococcus aureus :



Εικόνα 36 Πληθυσμός μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* στις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Βρίσκοντας τον μέσο όρο του αριθμού των αποικιών των δυο επαναλήψεων για τις αραιώσεις 10^{-5} και 10^{-6} βρέθηκε ότι στο αρχικό πυκνό διάλυμα υπήρχαν $5,5 \cdot 10^7$ CFU/mL μικροοργανισμοί. Ο υπολογισμός προέκυψε σύμφωνα με τον πίνακα 14.

Πίνακας 14 Υπολογισμός αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus*

Αραίωση	CFU/mL
-6	$54 \pm 11,3$
-5	$546 \pm 76,4$
-4	$5,5 \cdot 10^3$
-3	$5,5 \cdot 10^4$
-2	$5,5 \cdot 10^5$
-1	$5,5 \cdot 10^6$
0	$5,5 \cdot 10^7$

B.11.4 Αντι-μικροβιακή δράση του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας

B.11.4.1 Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάστηκαν 4 συγκεντρώσεις υδρομεθανολικού εκχυλίσματος φαινολικών συστατικών προκειμένου να μελετηθεί η δράση κάθε μιας έναντι των επιλεγμένων μικροοργανισμών. Επιπλέον, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το υδρομεθανολικό διάλυμα επιδρά στο αποτέλεσμα παρασκευάστηκε από αυτό ένα δείγμα ποσότητας 1 mL (900 μ L ΜΕΟΗ, 100 μ L αποστειρωμένο H₂O).

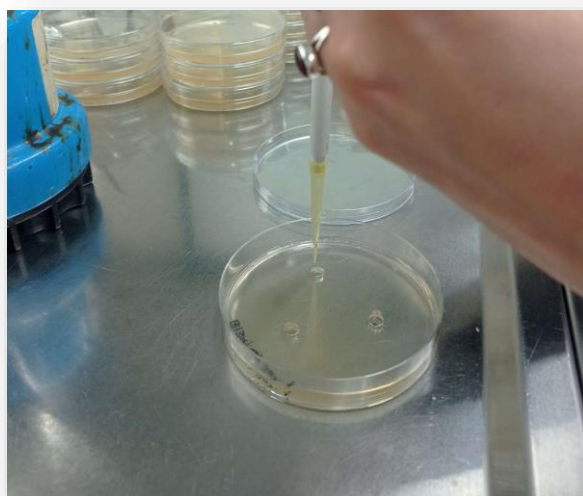
Οι συγκεντρώσεις των 4 δειγμάτων υδρομεθανολικού διαλύματος φαινολικών συστατικών ήταν οι εξής:

- 1 mg φαινολικών συστατικών σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος
- 3 mg φαινολικών συστατικών σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος
- 5 mg φαινολικών συστατικών σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος
- 10 mg φαινολικών συστατικών σε 1 mL υδρομεθανολικού διαλύματος

Μελέτης της επίδρασης του υδρομεθανολικού δείγματος :

Προστέθηκαν 100 μ L από τον κάθε μικροοργανισμό από την αραιώση 10^{-5} με χρήση μικροπιπέτας σε τρυβλία με θρεπτικό διάλυμα TSA, και απλώθηκαν σε όλο το τρυβλίο.

Έπειτα, ανοίχτηκαν τρία βοηθία σε κάθε τρυβλίο και προστέθηκε σε κάθε ένα από αυτά 15 μ L δείγματος (Εικόνα 37).



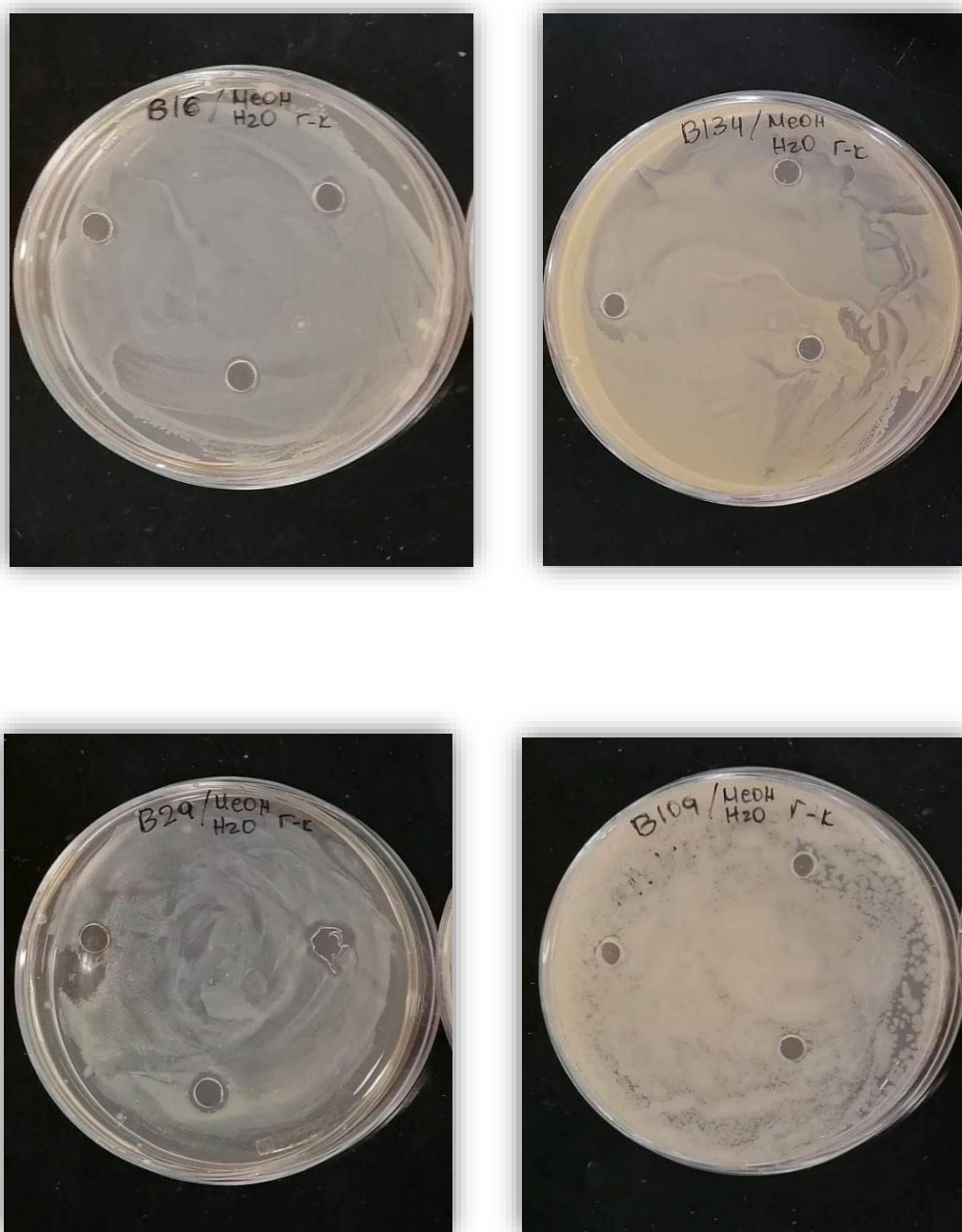
Εικόνα 37 Απεικόνιση των βοηθίων και εισαγωγή δείγματος με χρήση μικροπιπέτας

B.11.4.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Για την κάθε συγκέντρωση έγινε υπολογισμός της μέσης παρεμπόδισης σύμφωνα με τα τρία βοθρία και τις τρεις επαναλήψεις.

-Επίδραση υδρομεθανολικού δ/τος :

Το υδρομεθανολικό δ/μα απουσία δείγματος φαινολικών συστατικών δεν παρουσίασε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Εικόνα 38).



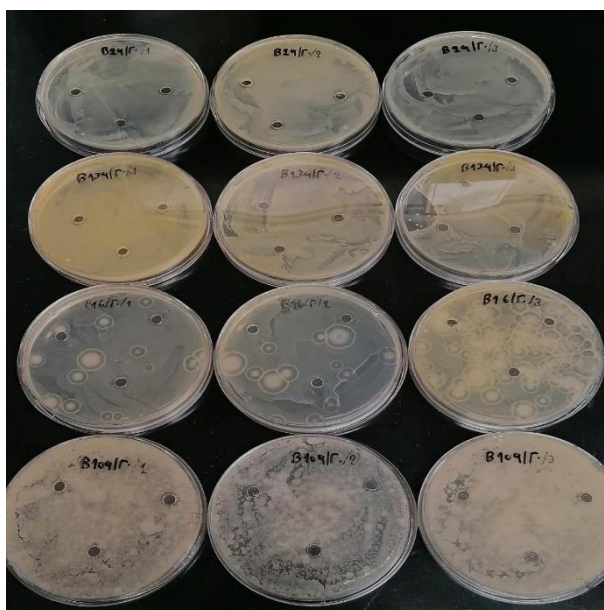
Εικόνα 38 Επίδραση υδρομεθανολικού δ/τος στην ανάπτυξη μικροοργανισμών

-Επίδραση 1 mg φαινολικών συστατικών:

Ζυγίστηκε με χρήση ζυγού ακριβείας 1 mg στερεού δείγματος φαινολικών συστατικών και έπειτα διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL υδρομεθανολικό διάλυμμα (900 μ L MEOH, 100 μ L H₂O). Το ίδιο επαναλήφθηκε και στις επόμενες συγκεντρώσεις.

Έπειτα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως με το υδρομεθανολικό διάλυμμα.

Το 1 mg φαινολικών συστατικών δεν παρουσίασε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Εικόνα 39).



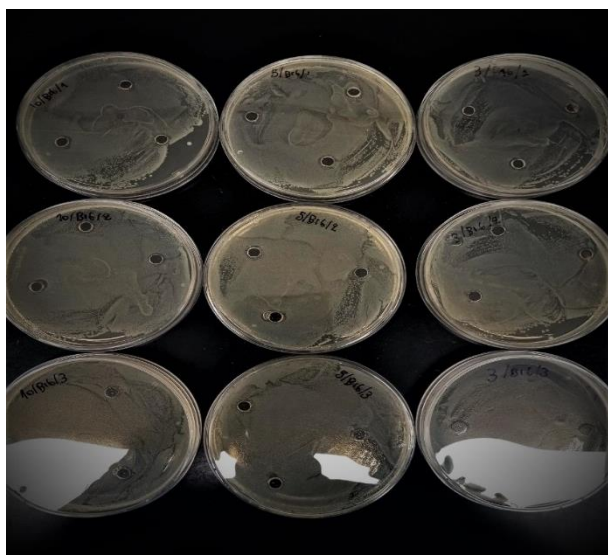
Εικόνα 39 Επίδραση 1 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη μικροοργανισμών

-Επίδραση 3, 5, 10 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E.coli*:

Η μέση παρεμπόδιση 3, 5, 10 mg του υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *E.col* παρουσιάζεται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15 Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *E.coli*

C (mg/mL)	Μέση παρεμπόδιση (mm)
1	Καμιά
3	6,52±0,4
5	6,81±1,02
10	6,97±1,03



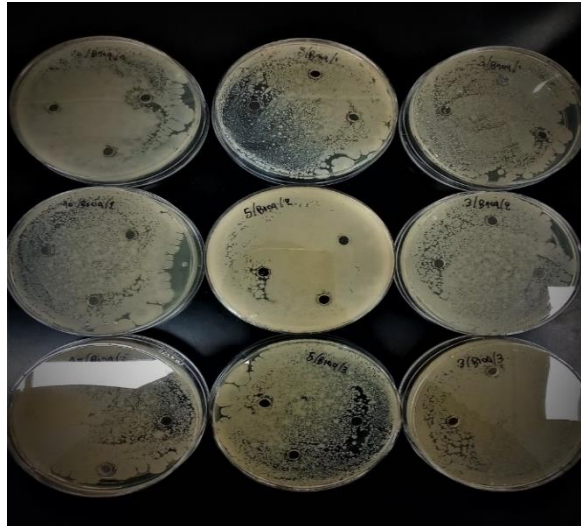
Εικόνα 40 Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *E.coli*

-Επίδραση 3, 5, 10 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis*:

Η μέση παρεμπόδιση των 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis* παρουσιάζεται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16 Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis*

C (mg/mL)	Μέση παρεμπόδιση (mm)
1	Καμιά
3	Καμιά
5	Καμιά
10	Καμιά



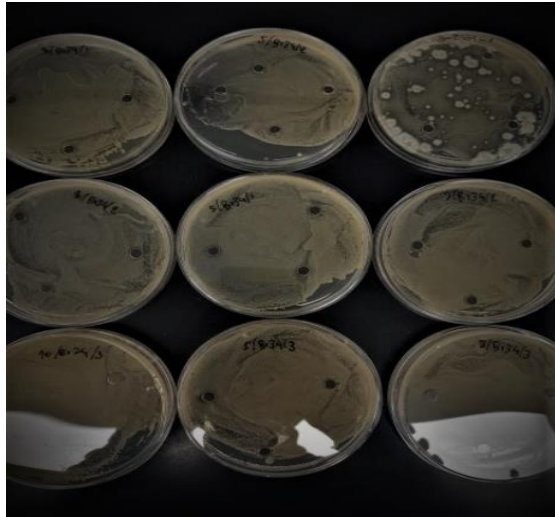
Εικόνα 41 Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus subtilis*

-Επίδραση 3, 5, 10 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus*:

Η μέση παρεμπόδιση των 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* παρουσιάζεται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17 Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus*

C (mg/mL)	Μέση παρεμπόδιση (mm)
1	Καμιά
3	Καμιά
5	6,33±0,44
10	6,7±1,01



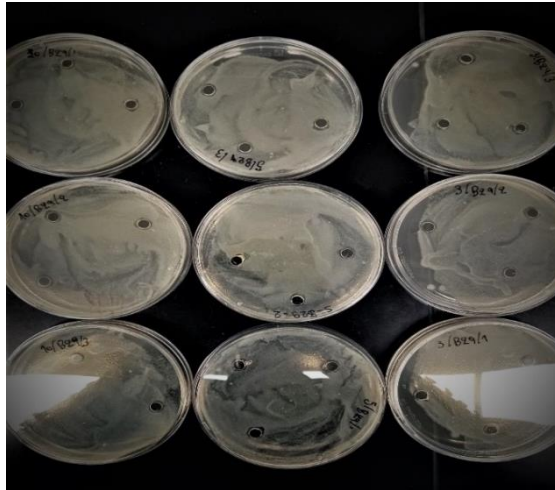
Εικόνα 42 Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus*

-Επίδραση 3, 5, 10 mg φαινολικών συστατικών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens*:

Η μέση παρεμπόδιση των 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens* παρουσιάζεται στον πίνακα 18

Πίνακας 18 Επίδραση των συγκεντρώσεων 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών έναντι του μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens*

C (mg/mL)	Μέση παρεμπόδιση (mm)
1	Καμιά
3	6,66±0,72
5	7±0,82
10	7,12±1,07



Εικόνα 43 Επίδραση 3, 5, 10 mg υδρομεθανολικού δ/τος φαινολικών συστατικών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Pseudomonas fluorescens*

Συνοψίζοντας, τα φαινολικά συστατικά της ψίχας των φιστικιών ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης παρουσιάζουν παρεμπόδιση στην ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών εκτός του *Bacillus subtilis*. Κάτω από 3 mg δεν εμφανίζουν καμιά παρεμποδιστική δράση ενώ αυτή φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Η παρεμποδιστική δράση έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* για τις συγκεντρώσεις 3, 5, 10 mg κυμαίνεται από 6,3-7,12 mm. Τη μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση την παρουσιάζει στα (-) κατά Gram επιλεγμένα βακτήρια, κυρίως έναντι στον μικροοργανισμό *Pseudomonas fluorescens* αφού για την ίδια συγκέντρωση (3 mg) προκαλεί μεγαλύτερη παρεμπόδιση ($6,66 \pm 0,72$ mm) ενώ ακολουθεί ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* ($6,52 \pm 0,4$ mm). Τέλος, η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* ξεκινά από τα 5 mg. Σε άλλη έρευνα, βρέθηκε ότι η ψίχα από φιστικιά που καλλιεργήθηκε στην Καλιφόρνια, εμφάνισε παρεμποδιστική δράση στα (+) κατά Gram βακτήρια και όχι στα (-) κατά Gram. Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την παρεμπόδιση του *S.aureus* ήταν τα 0,03 mg και για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς >2 mg (Bisignano et al., 2013). Σε ακόμη μια έρευνα, αποδείχθηκε πως τα μεθανολικά εκχυλίσματα ψίχας φιστικιού εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση σε διάφορα στελέχη του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* (La Camera et al., 2018). Στην βιβλιογραφία αναγράφεται πως η αντιμικροβιακή δράση εξαρτάται από την φύση του φαινολικού συστατικού (Wen, Delaquis, Stanich, & Toivonen, 2003). Οι διαφορές μεταξύ ποικιλιών μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες, η σύνθεση του λιπάσματος, η θρέψη που επηρεάζουν την δράση των φαινολικών εκχυλισμάτων (Farnsworth, 1990).

B.12 Γενικά συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η παραλαβή όξινων υδρομεθανολικών εκχυλισμάτων από την ψίχα του φιστικιού ποικιλίας Αιγίνης ελληνικής προέλευσης και ο προσδιορισμός της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών του όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τις δοκιμές DPPH, ABTS. Τα αποτελέσματα αυτών εκφράστηκαν με την τιμή IC50 η οποία βρέθηκε υψηλότερη σύμφωνα με την δοκιμή ABTS (0,22 mg/ml) συγκριτικά με της δοκιμής DPPH (1,41 mg/ml). Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των αντιοξειδωτικών μεθόδων πιθανόν να οφείλονται σε άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά που βρίσκονται στο υδροφοβικό κλάσμα και αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες. Το όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα φαίνεται να παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση με αυτή άλλων ποικιλιών και γεωγραφικών περιοχών. Έρευνες υποστηρίζουν πως η ποιότητα των φαινολικών συστατικών, παρά η συγκέντρωση αυτών, η οποία επηρεάζεται από παράγοντες όπως το νερό ή το χώμα παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση.

Η περιεκτικότητα του όξινου υδρομεθανολικού εκχυλίσματος της ψίχας φιστικιού Ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης σε φαινολικές ενώσεις προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της δοκιμής Folin – Ciocalteu και τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν χαμηλή περιεκτικότητα σε μεθανολικά φαινολικά συστατικά (73 mg GA/g DE). Σύμφωνα με έρευνες, πρέπει να γίνεται επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών γιατί επιδρά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Το όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα μελετήθηκε φασματοσκοπικά με την χρήση της μεθόδου FTIR. Κατέστη εφικτό να αποκτηθεί μια εικόνα του φαινολικού προφίλ του δείγματος σε σύντομο χρονικό διάστημα εξασφαλίζοντας την εύκολη προετοιμασία του και χωρίς την καταστροφή του. Πράγματι, το φάσμα FTIR έδειξε την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων αρωματικού δακτυλίου καθώς και υδροξυλίων και εστέρων που συνδέονται με την παρουσία φαινολικών συστατικών. Συνδυαστικά με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζων έγινε ακριβής προσδιορισμός της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης αυτών.

Μέσω της ανάλυσης LC –QTOF – MS, με την βοήθεια πρότυπων ενώσεων ταυτοποιήθηκαν 11 φαινολικές ενώσεις με κυρίαρχο αυτών το γαλλικό οξύ. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και το ομογεντισικό οξύ, το γεντισικό οξύ, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το βανιλικό οξύ, η μυρικιτρίνη, το αμπισικό οξύ, η γαλλική επιγαλοκατεχίνη, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το 4-υδροξυφαινοξικό οξύ. Πολλά αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποικιλία Αιγίνης.

Ως προς την αντιμικροβιακή δράση και διαπιστώθηκε πως το όξινο υδρομεθανολικό εκχύλισμα προκαλεί την αναστολή της ανάπτυξης όλων των βακτηρίων εκτός του *Bacillus subtilis*. Τη μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση την παρουσίασε στα (-) κατά Gram επιλεγμένα βακτήρια, κύριως έναντι στον μικροοργανισμό *Pseudomonas fluorescens*. Κάτω από 3 mg δεν εμφανίζουν καμιά παρεμποδιστική δράση ενώ αυτή φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.

B.13 Ερευνητικές προτάσεις

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εμπλούτισε την βιβλιογραφία με τα ελλιπή μέχρι στιγμής δεδομένα σχετικά με τα φαινολικά συστατικά της ψίχας φιστικιάς ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης. Εξίσου περιορισμένες είναι οι μελέτες που αφορούν γενικότερα την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών της ψίχας φιστικιών. Επομένως, για να δημιουργηθεί μια πληρέστερη βάση δεδομένων όσο αναφορά τα φαινολικά συστατικά της ψίχας των φιστικιών κρίνεται σκόπιμο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες σε φιστικιές ελληνικής ποικιλίας Αιγίνης μεταξύ διάφορων ελληνικών γεωγραφικών περιοχών καθώς και μεταξύ ποικιλιών Αιγίνης εκτός του Ελλαδικού χώρου. Έτσι, θα καταστεί εφικτό να πραγματοποιηθούν συγκρίσεις σχετικές με την επίδραση των γεωγραφικών περιοχών στα φαινολικά συστατικά της ψίχας φιστικιάς Αιγίνης. Τέλος, σημαντικά στοιχεία θα ήταν δυνατόν να ληφθούν από μελέτες που θα εστιάσουν στην επίδραση των φαινολικών συστατικών της ψίχας σε ένα μεγαλύτερο εύρος μικροοργανισμών.

B.14 Ξένη Βιβλιογραφία

1. Abdelkader M, Ahcen B, Rachid D, Hakim H (2014) Phytochemical study and biological activity of sage (*Salvia officinalis* L.). *International journal of bioengineering and life sciences* 8(11): 1253–12
2. Agbor GA, Vinson JA, Donnely PE (2014) Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* 3(8): 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>
3. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci.* 2021 Apr 2;4:200-214. doi: 10.1016/j.crfs.2021.03.011. PMID: 33899007; PMCID: PMC8058613.
4. Antonella Smeriglio;Valeria D'Angelo;Marcella Denaro;Domenico Trombetta;Maria Paola Germanò; (2021). *The Hull of Ripe Pistachio Nuts (Pistacia vera L.) as a Source of New Promising Melanogenesis Inhibitors* . *Plant Foods for Human Nutrition*, (), – . doi:10.1007/s11130-021-00883-x
5. Arena, Katia; Cacciola, Francesco; Mangraviti, Domenica; Zoccali, Mariosimone; Rigano, Francesca; Marino, Nino; Dugo, Paola; Mondello, Luigi (2019). *Determination of the polyphenolic fraction of Pistacia vera L. kernel extracts by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (), –. doi:10.1007/s00216-019-01649-w
6. Bailey, H.M.; Stein, H.H. Raw and roasted pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). Are “good” sources of protein based on their digestible indispensable amino acid score as determined in pigs. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 3878–3885. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Barreca, D.; Trombetta, D.; Smeriglio, A.; Mandalari, G.; Orazio, R.; Felice, M.R.; Gattuso, G.; Nabavi, S.M. Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *117*, 194–204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Benny, J.; Giovino, A.; Marra, F.P.; Balan, B.; Martinelli, F.; Caruso, T.; Marchese, A. Transcriptomic Analysis of the *Pistacia vera* (L.) Fruits Enable the Identification of Genes and Hormone-Related Gene Linked to Inflorescence Bud Abscission. *Genes* **2022**, *13*, 60. <https://doi.org/10.3390/genes13010060>
9. Benny, J.; Marra, F.P.; Giovino, A.; Balan, B.; Caruso, T.; Martinelli, F.; Marchese, A. Transcriptome Analysis of *Pistacia vera* Inflorescence Buds in Bearing and Non-Bearing Shoots Reveals the Molecular Mechanism Causing Premature Flower Bud Abscission. *Genes* **2020**, *11*, 851. <https://doi.org/10.3390/genes11080851>
10. Bhambere, Deepak & Gaidhani, Kunal & Harwalkar, Mallinath & Nirgude, Pallavi. (2015). LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4. 516-543.
11. Bisignano, C.; Filocamo, A.; Faulks, R.M.; Mandalari, G. In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 341, 62–67. [
12. Blainski A, Lopes GC, Pallazo de Mello JC (2013) Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852– 6865. <https://doi.org/10.3390/molecules1806685>
13. Bodoira, Romina M.; Maestri, Damian M. (2020). *Phenolic Compounds from Nuts: Extraction, Chemical Profiles and Bioactivity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (), *acs.jafc.9b07160*–. doi:10.1021/acs.jafc.9b07160

14. Bodoira, Romina; Velez, Alexis; Rovetto, Laura; Ribotta, Pablo; Maestri, Damián; Martínez, Marcela (2019). *Subcritical Fluid Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nuts: Experiments, Modeling, and Optimization*. *Journal of Food Science*, (), 1750-3841.14507-. doi:10.1111/1750-3841.14507
15. Careri M, Mangia A, Musci M. 1998. Overview of the applications of liquid chromatography–mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. *J Chromatogr A* 794: 263–297.
16. Carle R., Schweiggert R.M. Identification of Phenolic Compounds in Red and Green Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS. *Agric. Food Chem.* 2016;64:5334–5344. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01745
17. Costa, Joana; Silva, Isa; Vicente, António A.; Oliveira, M. Beatriz P.P.; Mafra, Isabel (2017). *Pistachio nut allergy: an updated overview*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (), 00–00. doi:10.1080/10408398.2017.1379947
18. Di Lodovico S, Napoli E, Di Campli E, Di Fermo P, Gentile D, Ruberto G, Nostro A, Marini E, Cellini L, Di Giulio M. Pistacia vera L. oleoresin and levofloxacin is a synergistic combination against resistant Helicobacter pylori strains. *Sci Rep.* 2019 Mar 15;9(1):4646. doi: 10.1038/s41598-019-40991-y. PMID: 30874618; PMCID: PMC6420558.
19. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Database. Available online: <https://www.fao.org/faostat/ru/#faq> (accessed on 26 February 2022)
20. Farnsworth NR. 1990. The role of ethnopharmacology in drug development. In: Chadwick DJ, Marsh J, editors. *Bioactive compounds from plants*. Ciba Foundation Symposium, 154. Chichester: Wiley
21. Ferguson, L., Polito, V., & Kallsen, C. (2005). The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In: L. Ferguson (Ed.), *Pistachio production manual* (pp. 31-39). USA: University of California Inc.
22. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. Doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008.
23. Glei, M.; Ludwig, D.; Lamberty, J.; Fischer, S.; Lorkowski, S.; Schlörmann, W. Chemopreventive Potential of Raw and Roasted Pistachios Regarding Colon Carcinogenesis. *Nutrients* **2017**, 9, 1368. <https://doi.org/10.3390/nu9121368>
24. Gómez-Romero M, Zurek G, Schneider B, Baessmann C, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2011. Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. *Food Chem* 124: 379–386
25. Grace MH, Esposito D, Timmers MA, Xiong J, Yousef G, Komarnytsky S, Lila MA. In vitro lipolytic, antioxidant and anti-inflammatory activities of roasted pistachio kernel and skin constituents. *Food Funct.* 2016 Oct 12;7(10):4285-4298. doi: 10.1039/c6fo00867d. PMID: 27604963.
26. Gusella, G.; Vitale, A.; Polizzi, G. Potential Role of Biocontrol Agents for Sustainable Management of Fungal Pathogens Causing Canker and Fruit Rot of Pistachio in Italy. *Pathogens* **2022**, 11, 829. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080829>
27. Halvorsen, B.L.; Carlsen, M.H.; Phillips, K.M.; Bøhn, S.K.; Holte, K.; Jacobs, D.R.; Blomhoff, R. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, 84, 95–135

28. Hamid Reza Gazor & Saeid Minaei (2005): Influence of Temperature and Air Velocity on Drying Time and Quality Parameters of Pistachio (*Pistacia vera* L.), *Drying Technology: An International Journal*, 23:12, 2463-2475
29. Harris, L. J. (2013). Improving the safety and quality of nuts. In: L. Harris (Ed.), *Food Science, Technology and Nutrition*. UK: Woodhead Publishing Inc.
30. Kashaninejad, M. and Tabil, L.G., 2011. Pistachio (*Pistacia vera* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Volume 4: Mangosteen to white sapote*. E. M. Yahia, ed., 218-246. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Ltd
31. Kaufmann, Elton N. (2002). *Characterization of Materials // Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. , (), -. doi:10.1002/0471266965.com107.pub2
32. Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717. Doi:10.1021/jf020071c
33. La Camera, E., Bisignano, C., Crisafi, G., Smeriglio, A., Denaro, M., Trombetta, D., & Mandalari, G. (2018). *Biochemical Characterization of Clinical Strains of Staphylococcus spp. and Their Sensitivity to Polyphenols-Rich Extracts from Pistachio (Pistacia vera L.) Pathogens*, 7(4), 82. doi:10.3390/pathogens7040082
34. Liu, Y.; Blumberg, J.B.; Chen, C.-Y.O. Quantification and bioaccessibility of California pistachio bioactives. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1550–1556. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. M. Nazari Galedar, A. Tabatabaefar, A. Jafari, A. Sharifi, S. S. Mohtasebi & H. Fadaei (2010) Moisture Dependent Geometric and Mechanical Properties of Wild Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nut and Kernel, *International Journal of Food Properties*, 13:6, 1323-1338, DOI: [10.1080/10942910903062099](https://doi.org/10.1080/10942910903062099)
36. Mandalari, G.; Barreca, D.; Gervasi, T.; Roussel, M.A.; Klein, B.; Feeney, M.J.; Carughi, A. Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.): Production, Nutrients, Bioactives and Novel Health Effects. *Plants* **2022**, *11*, 18. <https://doi.org/10.3390/plants11010018>
37. Mandalari, G.; Bisignano, C.; Filocamo, A.; Chessa, S.; Sarò, M.; Torre, G.; Faulks, R.M.; Dugo, P. Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. *Nutrition* **2013**, *29*, 338–344. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Mendes, E., & Duarte, N. (2021). Mid-infrared spectroscopy as a valuable tool to tackle food analysis: A literature review on coffee, dairies, honey, olive oil and wine. *Foods*, 10, 477. Doi:10.3390/foods10020477.
39. Mohamed, M.A. (2017). *Membrane Characterization // Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. , (), 3–29. doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2
40. Moreno-Rojas JM, Velasco-Ruiz I, Lovera M, Ordoñez-Díaz JL, Ortiz-Somovilla V, De Santiago E, Arquero O, Pereira-Caro G. Evaluation of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Eleven Pistachio Cultivars (*Pistacia vera* L.) Cultivated in Andalusia. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Mar 22;11(4):609. doi: 10.3390/antiox11040609. PMID: 35453293; PMCID: PMC9029509.
41. Musarra-Pizzo, M.; Pennisi, R.; Ben-Amor, I.; Smeriglio, A.; Mandalari, G.; Sciortino, M.T. In vitro anti-HSV-1 Activity of polyphenol-rich extracts and pure polyphenol compounds derived from pistachios kernels (*Pistacia vera* L.). *Plants* 2020, 9, 267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Noguera-Artiaga, L., Salvador, M. D., Fregapane, G., Collado-González, J., Wojdyło, A., López-Lluch, D., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2019). *Functional and Sensory Properties of Pistachio Nuts as Affected by Cultivar*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.9951

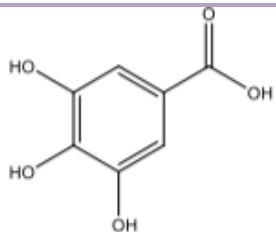
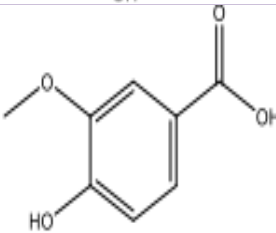
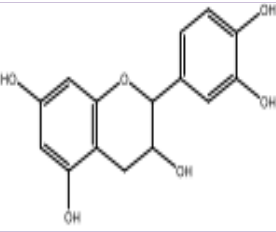
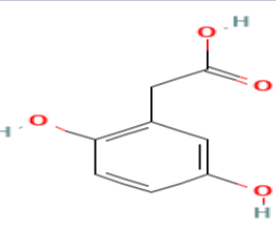
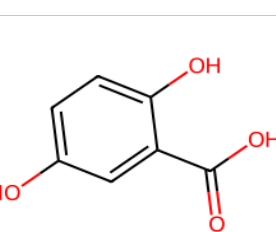
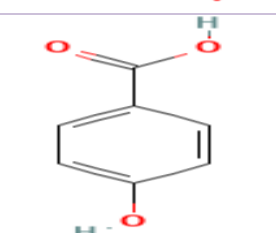
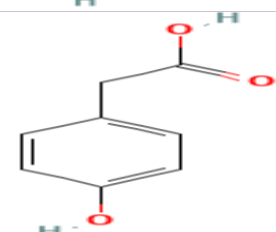
43. Noguera-Artiaga, Luis; Pérez-López, David; Burgos-Hernández, Armando; Wojdyło, Aneta; Carbonell-Barrachina, Ángel A. (2018). *Phenolic and triterpenoid composition and inhibition of α -amylase of pistachio kernels (Pistacia vera L.) as affected by rootstock and irrigation treatment. Food Chemistry, (), S0308814618306472–. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.033*
44. P.J. Sola-Campoy, F. Robles, T. Schwarzacher, C. Ruiz Rejón, R. de la Herrán, R. Navajas-Pérez, The molecular cytogenetic characterization of pistachio (*Pistacia vera* L.) suggests the arrest of recombination in the largest heteropycnotic pair HC1, PLoS One 10 (2015) e0143861, doi:http://dx.doi.org/ 10.1371/journal.pone.0143861
45. Popa, D.-S.; Bigman, G.; Rusu, M.E. The role of vitamin K in humans: Implication in aging and age-associated diseases. *Antioxidants* **2021**, *10*, 566. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Rauf, Abdur; Patel, Seema; Uddin, Ghias; Siddiqui, Bina S.; Ahmad, Bashir; Muhammad, Naveed; Mabkhot, Yahia N.; Hadda, Taibi Ben (2017). Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86(), 393–404. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.017
47. Rodríguez-Medina IC, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2009. Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray–Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices. *J Chromatogr A* 1216: 4736–4744.
48. Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004
49. S.G. Kazarian; K.L.A. Chan (2006). *Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. , 1758(7), 0–867. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.011*
50. Satil, Fatih & Ayas, Nezihe & Baser, K. Husnu Can. (2003). Fatty Acid Composition of Pistachio Nuts in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*. 39. 322-324. 10.1023/B:CONC.0000003408.63300.b5.
51. Sehitoglu, M. Hilal; Han, Hatice; Kalin, Pınar; Gülçin, İlhami; Ozkan, Ali; Aboul-Enein, Hassan Y. (2015). *Pistachio (Pistacia vera L.) Gum: a potent inhibitor of reactive oxygen species. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30(2), 264–269. doi:10.3109/14756366.2014.915395*
52. Shakerardekani, Ahmad, Fereshteh Fathi, and Hamid Alipour. "A Review of Pistachio Kernel Composition during Fruit Ripening." *Journal of Nuts* (2022).
53. Socrates, George. *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons, 2004.
54. Sonmezdag, Ahmet Salih; Kelebek, Hasim; Selli, Serkan (2018). *Effect of hulling methods and roasting treatment on phenolic compounds and physicochemical properties of cultivars ‘Ohadi’ and ‘Uzun’ pistachios (Pistacia vera L). Food Chemistry, (), S0308814618314675–. doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.065*
55. Sujka, K., Koczoń, P., Ceglińska, A., Reder, M., & Ciemniewska-Żytkiewicz, H. (2017). The application of FT-IR spectroscopy for quality control of flours obtained from polish producers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 4315678. Doi:10.1155/2017/4315678
56. Taghizadeh SF, Davarynejad G, Asili J, Nemati SH, Karimi G. Assessment of phenolic profile and antioxidant power of five pistachio (*Pistacia vera*) cultivars collected from four geographical regions of Iran. *Avicenna J Phytomed*. 2018 Jan-Feb;8(1):33-42. PMID: 29387572; PMCID: PMC5787995.
57. Taghizadeh, Seyedeh Faezeh; Rezaee, Ramin; Davarynejad, Gholamhossein; Karimi, Gholamreza; Nemati, Seyed Hossein; Asili, Javad (2018). Phenolic profile and antioxidant

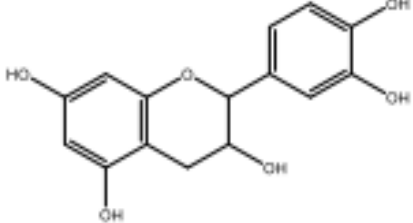
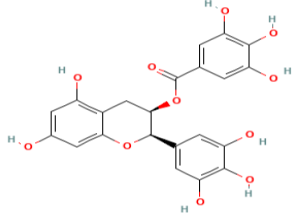
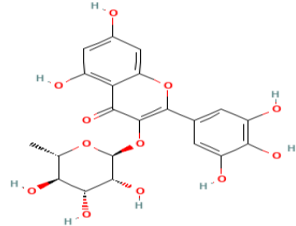
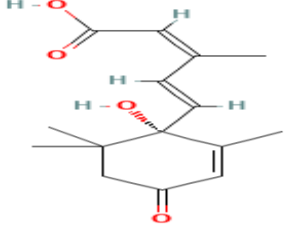
- activity of *Pistacia vera* var. *Sarakhs* hull and kernel extracts: the influence of different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, (), -. doi:10.1007/s11694-018-9829-x
58. Tomaino, A.; Martorana, M.; Arcoraci, T.; Monteleone, D.; Giovinazzo, C.; Saija, A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., Variety *Bronte*) seeds and skins. *Biochimie* **2010**, *92*, 1115–1122. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 59. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *FoodData Central*. Available online: fdc.nal.usda.gov (accessed on 16 September 2021).
 60. UC Davis Western Institute for Food Safety & Security; FDA. Pistachios. Available online: https://www.wifss.ucdavis.edu/wpcontent/uploads/2016/10/Pistachios_PDF.pdf (accessed on 21 September 2021)
 61. Vavilov, N.I. *Избранные Произведения* (Selected Works); Nauka: Leningrad, Russia, 1967
 62. Wen AM, Delaquis P, Stanich K, Toivonen P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.* 20:305–311.
 63. Whitehouse, W. The Pistachio Nut: A New Crop for the Western United States. *Econ. Bot.* 1957,11, 281–321
 64. Xia, Ke; Yang, Ting; An, Li-Ya; Lin, Yue-Ying; Qi, Yu-Xing; Chen, Xiong-Zhi; Sun, Da-Li (2020). *The relationship between pistachio (Pistacia vera L) intake and adiposity. Medicine*, 99(34), e21136-. doi:10.1097/md.00000000000021136
 65. Xing J, Xie C, Lou H. 2007. Recent applications of liquid chromatography– mass spectrometry in natural products bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal* 44: 368–378.
 66. Yanniotis, S., & Zarboutis, I. (1996), Water sorption isotherms of pistachio nuts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 372-375.
 67. Yuan, W.; Zheng, B.; Li, T.; Liu, R.H. Quantification of Phytochemicals, Cellular Antioxidant Activities and Antiproliferative Activities of Raw and Roasted American Pistachios (*Pistacia vera* L.). *Nutrients* **2022**, *14*, 3002. <https://doi.org/10.3390/nu14153002>
 68. Zakyntinos, G. and Rouskas, D., (2001). Wild and cultivated *Pistacia* species in Greece. In: Padulosi, S., Hadj-Hassan, A., Towards a comprehensive documentation and use of *Pistacia* genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Europe, Irbid, 88-92.

B.15 Ελληνική Βιβλιογραφία

69. Βασιλακάκης, Μ.Δ. Στοιχεία Γενικής και Ειδικής Δενδροκομίας, Γαρταγάνη: Θεσσαλονίκη, 2010.
70. Μπρουσοβάνα Νικ., « η Φιστικιά» εκδόσεις: Στρ. Κλαπάκης Λάρισα;
71. Ποντίκης Κ.Α. «Ειδική Δενδροκομία», ΓΠΑ, Εκδόσεις Α. Σταμούλης Τόμος Δεύτερος, (1996).

Πίνακας 19 Πίνακας χημικών ενώσεων

Συντακτικός Τύπος	Ελληνική ονομασία κατά IUPAC	Εμπειρική ονομασία
	3,4,5- τριδροξυβενζοϊκό οξύ	Γαλλικό οξύ
	4-υδροξυ-3- μεθοξυβενζοϊκό οξύ	Βανιλικό οξύ
	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4- διδροξυφαινυλο)- 3,4-διυδρο-2 <i>H</i> - χρωμενιο-3,5,7- τριόλη	Κατεχίνη
	(2,5- διυδροξυφαινυλο) οξικό οξύ	Ομογεντισικό οξύ
	2,5- διυδροξυβενζοϊκό οξύ	Γεντισικό οξύ
	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	-
	4-(υδροξυφαινυλο) οξικό οξύ	-

	<p>(2R,3S)-2-(3,4- διδροξυφαινυλο)- 3,4-διδρο-2H- χρωμεν-3,5,7-τριόλη</p>	<p>Επικατεχίνη</p>
	<p>3,4,5- τριδροξυβενζοϊκός εστέρας της (2R,3R)- 5,7-δεοξυ-2-(3,4,5- τριδροξυφαινυλο)- 3-χρωμανόλη</p>	<p>Γαλλική επιγαλοκατεχίνη</p>
	<p>3', 4', 5, 5',7- πενταδροξύ-3-(α-L- ραμνοπυρανοσυλοξυ) φλαβόνη</p>	<p>Μυρικιτρίνη</p>
	<p>(2Z, 4E)-5-[(1S)-1- υδροξυ-2, 6, 6- τριμεθυλο- οξοκυκλοεξ-2-εν-1- υλο]-3-μεθυλοπεντα- 2, 4-διενοϊκό οξύ</p>	<p>Αμπισικό οξύ</p>