Χανιά, 2010

Μελέτη Καθαρισμού και Ανάκτησης Οργανικών Συστατικών Αποβλήτων Ελαιουργείου με τη Χρήση Φυσικοχημικών Διεργασιών και Μεμβρανών Διαφορετικών Ιδιοτήτων και Προέλευσης

Χάρης Μ. Γαλανάκης

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος,

Πολυτεχνείο Κρήτης

Διδακτορική Διατριβή

Στους γονείς μου

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη μιας μεθόδου για την ταυτόχρονη ανάκτηση ενός υπολείμματος πλούσιου σε εδώδιμες ίνες και ενός αιθανολικού εκχυλίσματος πλούσιου σε φαινόλες, από συμπυκνωμένα απόβλητα ελαιουργείου (WO2008/082343). Η εκχύλιση των παραπάνω συστατικών βασίστηκε στη θερμική επεξεργασία με όξινα υδρο-αιθανολικά μίγματα, πριν την απομόνωση του αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη (AIR) σε μίγμα αυτής μέχρι 85% v/v. Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση της παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας στις λειτουργικές ιδιότητες των περιεχόμενων πηκτινών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επεξεργασία των αποβλήτων σε μέτρια θερμοκρασία (60 ^{o}C) για 2-3 h, ενεργοποιεί την ενδογενή πηκτινομεθυλεστεράση και προωθεί την από-μεθυλίωση των πηκτινών, παρά την υψηλή συγκέντρωση των φαινολών. Αυτή η διεργασία αύξησε τη διαλυτοποίηση των πηκτινών αλλά ταυτόχρονα μείωσε τις ιδιότητες ζελοποίησής των. Η εναλλακτική θερμική επεξεργασία στους 80 ^{o}C προκάλεσε αμελητέα ενεργοποίηση του ενζύμου και βελτίωσε τις ιδιότητες ζελοποίησης του ανακτώμενου υλικού. Στη συνέχεια, το στάδιο εκχύλισης μελετήθηκε με διαφορετικά μίγματα. Η βέλτιστη διεργασία (5% v/v αιθανόλη και 1% w/v κιτρικό οξύ) σε σχέση με τη μέγιστη ανάκτηση AIR και ινών εφαρμόστηκε στην ανάκτηση του υλικού για τις ρεολογικές δοκιμές. Πιο συγκεκριμένα, το υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR (WSAIR) ήταν ικανό να σχηματίσει ζελέ, ενώ οι ιξωδο-ελαστικές ιδιότητες αυτού εκτιμήθηκαν συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος (πηκτινών). Επιπλέον, η ανάκτηση φαινολών μέσα στο αιθανολικό μίγμα βρέθηκε ότι εξαρτάται από τη διαλυτοποίηση αυτών μέσα στο προκύπτον υδρο-αιθανολικό μίγμα, ενώ το στάδιο της εκχύλισης με αιθανόλη (5% v/v) και ο χρόνος κατακρήμνισης δεν ήταν σημαντικοί παράγοντες για τη διεργασία. Η θέρμανση των αποβλήτων στους 50, 60 και 80 ^{o}C προκάλεσε τη μείωση της συγκέντρωσης φαινολών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων, πιθανώς εξαιτίας συνακόλουθων ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων ανάλογα με τη θερμοκρασία. Εντούτοις, τα εκχυλίσματα των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων αποβλήτων διατήρησαν σταθερές τις περιεχόμενες φαινόλες και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε διάρκεια 18 εβδομάδων.

Στη συνέχεια, τα τρία προαναφερθέντα υλικά (AIR, WSAIR και αιθανολικό εκχύλισμα) ανακτήθηκαν με μερικές αλλαγές στη μέθοδο και χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα τροφίμων. Τα AIR και WSAIR χρησιμοποιήθηκαν ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (κεφτέδες χαμηλών λιπαρών) μαζί ή ξεχωριστά με ίνες καρότου και συγκρίθηκαν σε σχέση με τις ιδιότητες που αποκτά το προϊόν κατά τη ψήση αυτού. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το AIR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον σκοπό αφού έχει περιορισμένη ικανότητα συγκράτησης νερού, σε αντίθεση με το WSAIR το οπόιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μαζί με τις ίνες καρότου, καθώς βελτίωσε τις ιδιότητες του προϊόντος, περιορίζοντας την προσρόφηση ελαίου κατά τη

διάρκεια τηγανίσματός του σε φριτέζα. Από την άλλη μεριά, το αιθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε περαιτέρω και εφαρμόστηκε ως πρόσθετου για την παραγωγή ενός «ροφήματος φαινολών» (με 1,7% αιθανόλη). Αυτό το ελαφρύ ποτό είχε συγκέντρωση ολικών φαινολών ανάλογη με αυτή 100 g ελαιολάδου, ενώ οι αντίστοιχες αντιοξειδωτικές του ιδιότητες ήταν συγκρίσιμες με αυτές παραδοσιακών ροφημάτων, όπως είναι το πράσινο τσάι και η μαλοτήρα. Τελικά, ο διαχωρισμός των συστατικών των δύο υποστρωμάτων (το WSAIR αραιωμένο με νερό και το «ρόφημα φαινολών») μελετήθηκαν περαιτέρω με τέσσερις τύπους μεμβρανών υπερδιήθησης και μία νανοδιήθησης. Οι μεμβράνες με μοριακό κατώφλι των 25 και 100 kDa έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σχέση με το καθαρισμό των πηκτινών στο συμπύκνωμα από τα κατιόντα και τις φαινόλες. Επίσης, η μεμβράνη των 25 kDa ήταν ικανή να διαχωρίσει μερικώς τα «βαρύτερα» κλάσματα μερικών φαινολικών ομάδων και ταυτόχρονα να διατηρήσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροφήματος στο διήθημα. Εν κατακλείδι, η νανοδιήθηση καθάρισε μερικώς το ρόφημα από κάποια κατιόντα που περάσαν στο διήθημα, αλλά αυτή η διεργασία προκάλεσε επίσης την απώλεια ορισμένων αντιοξειδωτικών συστατικών.

Abstract

In the current PhD study, a novel method for the simultaneous recovery of a dietary fibre containing material and a phenol rich ethanolic extract from thermally concentrated olive mill wastewater (OMW) was developed. Extraction with acidic hydro-ethanolic mixtures was made on thermally concentrated OMW prior to the isolation of the alcohol insoluble residue (AIR) with condensed (up to 85% v/v) ethanol. Firstly, the effect of prolonged heat processing during concentration on the functional properties of the contained pectin was evaluated. It was shown that a low temperature blanching of OMW for 2-3 h at 60 ^{o}C, activates endogenous pectin methyl esterase and promotes demethylation, despite the high concentration of phenols. This process resulted in enhanced pectin solubilization, but partial loss of its gelling functionality. An alternative heating process at 80°C resulted in negligible enzyme action and improved gelling properties of the recovered material. Thereafter, the extraction step was investigated with different hydro-ethanolic mixtures and the optimum procedure (5% v/v ethanol and 1% w/v citric acid) with regard to the maximum AIR and fiber recovery was preferred for the rheological assay. The water soluble fraction of AIR (WSAIR) was able to form gels and the viscoelastic properties of the gels were evaluated as a function of galacturonic acid content. Moreover, phenols recovery inside the ethanolic medium was shown to be governed by their solubilization in the hydro-ethanolic mixture, while extraction step with ethanol (5% v/v) and precipitation time were not critical for the recovery. Heating of OMW at 50, 60 and 80 ^{o}C resulted in the reduction of phenol concentration and antioxidant abilities of the extracts, probably due to induced enzymatic and nonenzymatic reactions at each temperature, respectively. Nevertheless, extracts from the heat treated samples preserved their phenols and antioxidant capacity during storage of 18 weeks.

Afterwards, the two assayed materials were recovered with some modifications in the method and utilized as food additives. AIR as well as WSAIR were utilized as fat replacement in low fat meatballs together or separately with carrot and compared with regard to cooking properties. Results indicated that AIR could not be considered as a potential fat replacement in meatballs due to the restricted water holding ability, while WSAIR could be utilized together with carrot fibers, since it was able to improve the cooking properties of the product, by restricting the oil uptake of it during deep fat frying. The ethanolic extract was further concentrated and utilized as additive to produce a “phenol beverage” (1.7% ethanol). This soft drink was shown to possess a total phenol concentration relative to this of 50-100 g olive oil, while its corresponding antioxidant properties were comparable with these of traditional beverages, like green and mountain tea. Ultimately, the separation of the ingredients of two substrates (WSAIR diluted with water and “phenol beverage”) were further investigated with four types of ultrafiltration and one nanofiltration membrane. The membranes of 25 and 100 kDa showed satisfying

results with regard to the clarification of pectin in the concentrate stream from cations and phenols. The membrane of 25 kDa was also able to partially separate the heavier fragments of some phenolic classes and simultaneously to sustain the antioxidant properties of the beverage in the permeate stream. Finally, nanofiltration clarified the beverage from cations that passed in the permeate stream, but this process resulted in loss of antioxidant compounds, too.

Κατάλογος Δημοσιεύσεων

Παγκόσμιος Οργανισμός Κατοχύρωσης Πνευματικής Ιδιοκτησίας

- Tornberg, E. & Galanakis, C. M. (2008). Olive waste recovery. *World Intellectual Property Organization*, WO2008/082343.

Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά

Δημοσιευμένες εργασίες της διατριβής:

I. Galanakis, C. M., Tornberg, E., Gekas, V. (2010a). A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1009-1017.

II. Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010e). The effect of heat processing on the functional properties of pectin contained in olive mill wastewater. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1001-1008.

III. Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010c). Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1018-1025.

IV. Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010b). Clarification of high-added value products recovered from olive Waste. *Journal of Food Engineering*, 99(2), 190-197.

V. Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010d). Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, In Press.

Άλλες σχετικές εργασίες προς δημοσίευση:

- Barbier, C., Galanakis, C. M. & Tornberg, E. The behaviour of raw and pure natural antioxidants in an in vitro meat model. *Manuscript*.

- Tsakona, S., Galanakis, C. M., & Gekas V. Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Manuscript*.

- Galanakis, C. M., Tsakona, S., & Gekas V. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Manuscript*.

Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια

- Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V., "Recovery of dietary fibres from olive mill wastewater". *Food Colloids 2008*, Le Mans, France, 6 - 9 April 2008.

- Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V., "Thermal activation of endogenous pectin methyl esterase in olive mill wastewater". *Pectins and Pectinases III*, Wageningen, The Netherlands, 21-23 April 2008.

- Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V., "The effect of ethanol during extraction of pectin and dietary fibers in olive mill wastewater". *Pectins and Pectinases III*, Wageningen, The Netherlands, 21-23 April 2008.

- Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V., "Olive dietary fibers as restricting factor of oil uptake in meatballs during deep fat frying". *55th International Congress of Meat Science and Technology*, Copenhagen, Denmark, 16-21 August 2009.

- Galanakis, C. M. "Physicochemical process and membrane technology for the recovery of organic constituents from olive mill wastewater". *Protection and Restoration of the Environment X*, Corfu, Greece, 5-9 July 2010.

Ελληνικά Επιστημονικά Συνέδρια

- Galanakis, C. M., "Thermal activation of endogenous enzymes in olive mill wastewater". *3rd Panhellenic Scientific Congress*, 15-17 October, Rethimno, Greece, 2009.

Περιεχόμενα

Περίληψη…….i
Abstract……..iii
Κατάλογος Δημοσιεύσεων……..v
Περιεχόμενα……..vii
Συντομογραφίες και Σύμβολα…….x
Κατάλογος Σχημάτων…….xi
Κατάλογος Πινάκων…….xii

Πρόλογος- …...……...1
Ευχαριστίες……...3
Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής..……5

1. ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ...…….....……7

1.1. Εισαγωγή……...7
1.2. Η φύση του προβλήματος…….8
1.3. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις……...10
1.4. Τεχνολογίες εξαγωγής ελαιολάδου και των αντίστοιχων αποβλήτων……11
1.5. Χαρακτηρισμός των αποβλήτων ελαιουργείου……..12
1.6. Τεχνολογίες επεξεργασίας και διαχείρισης αποβλήτων ελαιουργείων……...14
1.7. Διεργασίες παραγωγής προϊόντων από τα απόβλητα ελαιουργείου……...16

2. ΕΔΩΔΙΜΕΣ ΊΝΕΣ……19

2.1. Ορισμός και σύνθεση……...19
2.2. Ιδιότητες……...21
2.3. Προέλευση……22
2.4. Εδώδιμες ίνες ελαιόκαρπου και αποβλήτων ελαιουργείου……..23
2.5. Ανάκτηση εδώδιμων ινών και πηκτινών……..25
2.6. Μεταβολές πηκτινών κατά την επεξεργασία τους……...26
2.7. Πηκτινομεθυλεστεράση……...27

3. ΦΑΙΝΟΛΕΣ……...29

3.1. Περιγραφή……..……..29
3.2. Προέλευση……..…..30
3.3. Φαινόλες αποβλήτων ελαιουργείου……32
3.4. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες……33
3.5. Ανάκτηση φυσικών φαινολών……..35
3.6. Πολυφαινολοξειδάσες……..……...37

4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ…….39

4.1. Περιγραφή……..…..39
4.2. Κατακρήμνιση…….....39
4.3. Εκχύλιση……40
4.4. Διεργασίες μεμβρανών……41
4.5. Αρχές Διαχωρισμού στη Διατριβή……...44

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ……...45

5.1. Σχεδιασμός Πειραμάτων……..……45
5.2. Υλικά…….…….....47
5.3. Μελέτη ανάκτησης εδώδιμων ινών.……..49
5.3.1. Πειράματα επίδρασης της θερμοκρασίας επεξεργασίας αποβλήτων ελαιουργείου στις λειτουργικές ιδιότητες των περιεχόμενων ινών…….…….….....49
5.3.2. Πειράματα ανάκτησης και ζελοποίησης εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου…….…..51
5.4. Μελέτη ανάκτησης και συντήρησης φαινολών…….…...53
5.5. Διερεύνηση εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων……....54
5.5.1. Αιωρήματα εδώδιμων ινών ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (κεφτέδες)…….....54
5.5.2. Εκχυλίσματα φαινολών για την παραγωγή ροφήματος πλούσιο σε φαινόλες……....57
5.6. Μελέτη διαχωρισμού των συστατικών των προϊόντων……...57
5.7. Αναλύσεις…….....61
5.7.1. Νερό, έλαια και στερεά……....61
5.7.2. Ανόργανα συστατικά……....62
5.7.3. Αλκοόλες…….....63
5.7.4. Φαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα…….…….....63
5.7.5. Εδώδιμες ίνες και σχετικοί παράμετροι…….……..65
5.7.6. Φυσικοχημικοί και άλλοι παράμετροι…….…….....67
5.7.7. Στατιστική ανάλυση…….…….....68

6. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΙΝΩΝ……...69

6.1. Περιγραφή μελέτης……..69
6.2. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ…….....71
6.3. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στη διαλυτοποίηση, αποδόμηση και ανάκτηση πηκτινών…….…….....74
6.4. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στις ιδιότητες ενυδάτωσης και ζελοποίησης του ανακτημένου υλικού…….….....77
6.5. Χαρακτηρισμός αποβλήτων ελαιουργείου και προεπεξεργασία αυτών…….....81
6.6. Ανάπτυξη μεθόδου ανάκτησης……....82
6.7. Χαρακτηρισμός και ιδιότητες ζελοποίησης του υδατοδιαλυτού κλάσματος του ανακτημένου υπολείμματος……86

7. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΩΝ……...93

7.1. Περιγραφή μελέτης……..93
7.2. Επίδραση του χρόνου κατακρήμνισης…….....95
7.3. Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης στο στάδιο εκχύλισης…….....95
7.4. Επίδραση της θερμικής προ-επεξεργασίας ……...…….….97
7.5. Συντήρηση των θερμικά επεξεργασμένων εκχυλισμάτων…….…..97
7.6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων…….…...98

8. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΤΗΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ……..105

8.1. Περιγραφή μελέτης……...105
8.2. Χαρακτηρισμός και ιδιότητες ζελοποίησης των ανακτημένων υπολειμμάτων ινών……108
8.3. Εφαρμογή των ανακτημένων υπολειμμάτων ινών σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος……...111
8.4. Εφαρμογή του εκχυλίσματος φαινολών ως πρόσθετου σε ρόφημα……...116
8.5. Εφαρμογή του εκχυλίσματος φαινολών ως αντιοξειδωτικό σε μοντέλο κρέατος……117

9. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ……119

9.1. Περιγραφή μελέτης……119
9.2. Χαρακτηριστικά των υγρών τροφοδοσίας……..121
9.3. Παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας των μεμβρανών……...122
9.4. Καθαρισμός του διαλύματος πηκτινών……..124
9.5. Καθαρισμός του ροφήματος φαινολών…….....124
9.6. Συζύτηση αποτελεσμάτων……..126

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ……...129

10.1. Συμπεράσματα διατριβής……129
10.2. Πρωτοτυπίες διατριβής……....133
10.3. Προοπτικές έρευνας……134

Βιβλιογραφία……135

Διεθνής βιβλιογραφία……....135
Ελληνική βιβλιογραφία……150

Συντομογραφίες και Σύμβολα

Ελληνικά Σύμβολα

ΑΔ	Αντιοξειδωτική δραστικότητα	**ΜΒ**	Μοριακό βάρος
ΒΜ	Βαθμός μεθυλίωσης	**ξ. β.**	Ξηρού βάρους
Ίνες	Εδώδιμες ίνες	**ΠΜΕ**	Πηκτινομεθυλεστεράση
κ.β.	Κατά βάρος	**ΠΦΟ**	Πολυφαινολοξειδάσες
κ.ό.	Κατά όγκο		

Λατινικά Σύμβολα

AIR	Υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη (alcohol insoluble residue)	***G''***	συντελεστής απώλειας των ζελέ (loss modulus)
Ara	Αραβινόζη	**Man**	Μανόζη
BOD	Βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (biochemical oxygen demand)	**MWCO**	Τιμή μοριακού κατωφλίου (molecular weight cut off)
CDTA	trans-1,2-κυκλο-εξανο-διαμίνη-N,N,N,N-τετραοξικό νάτρια	**RF**	Σχετική ροή (relative flux)
COD	Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (chemical oxygen demand)	**Rha**	Ραμνόζη
DPPH	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζυλιο	**Sucr**	Σακχαρόζη
EtOH	αιθανόλη	**tan*δ***	εφαπτομένη απωλειών (loss tangent)
Glc	Γλυκόζη	**TMP**	δια-μεμβρανική πίεση (transmembrane pressure-TMP)
FR	Ανάκτηση ροής (flux recovery)	**Xyl**	Ξυλόζη
Fuc	Φουκόζη	**WRC**	Χωρητικότητα συγκράτησης νερού (water retention capacity)
GalA	Γαλακτουρονικό οξύ	**WSAIR**	υδατοδιαλυτό υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη (water soluble, alcohol insoluble residue)
G'	συντελεστής αποθήκευσης των ζελέ (storage modulus)		

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα	Τίτλος (συνοπτικά)	Σελίδα
1.1.	Συστήματα παραγωγής ελαιολάδου.	11
2.1.	(α) Η από-εστεροποίηση και (β) η β-αποδόμηση των πηκτινών.	28
3.1.	Τυπικά παραδείγματα φαινολών.	30
3.2.	Χημικοί τύποι μερικών φαινολών των αποβλήτων ελαιουργείου.	33
3.3.	Αντιδράσεις που καταλύονται από τις πολυφαινολοξειδάσες.	38
5.1.	Σχεδιασμός πειραμάτων και μελετών της διδακτορικής διατριβής	46
5.2.	Διεργασία ανάκτησης του αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος (AIR) από τα απόβλητα ελαιουργείου.	52
5.3.	Παράσταση της διεργασίας μεμβρανών που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό των συστατικών των προϊόντων.	60
6.1.	Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης ανάκτησης εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου.	70
6.2.	Σχηματισμός μεθανόλης έναντι χρόνου για διάφορες θερμοκρασίες επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου.	72
6.3.	Καμπύλη Arrhenius για την ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης από τα απόβλητα ελαιουργείου στους 25-60 ^{o}C.	73
6.4.	Log *G'* και log *G''* των ζελέ (1,5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει της τάσης διάτμησης. Τα υλικά ζελοποίησης ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων μετά από επεξεργασία 180 min στους 25, 60 και 80 ^{o}C.	79
6.5.	Log *G'* και log *G''* των ζελέ (25 g υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος/100 mL) συναρτήσει της τάσης διάτμησης. Τα υλικά ζελοποίησης ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων μετά από επεξεργασία 180 min στους 25, 60 και 80 ^{o}C.	80
6.6.	Log *G'*, log *G''*, log ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος, όπως προσδιορίσθηκε στο 1 Hz (για ζελοποίηση 2 h στους 20 ^{o}C).	88
6.7.	Η εφαπτομένη απωλειών (tanδ) όπως μετρήθηκε στο 1 Hz (για ζελοποίηση 2 h στους 20 ^{o}C) και παρουσιάζεται συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος.	89
6.8.	Log *G'*, log *G''*, log ιξώδους των ζελέ (2,5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Τα ζελέ σχηματίστηκαν για 48 h στους 5 ^{o}C και μετρήθηκαν στο 1 Hz και 20 ^{o}C.	91

6.9.	Εφαπτομένη απωλειών (tanδ) των ζελέ (2,5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Τα ζελέ σχηματίστηκαν για 48 h στους 5 ^{o}C και μετρήθηκαν στο 1 Hz και 20 ^{o}C.	92
7.1.	Σχηματική αναπαράσταση της μελέτης ανάκτησης και συντήρησης φαινολών.	94
8.1.	Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων.	107
8.2.	Log G', log G'', log ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος, όπως προσδιορίσθηκε στο 1 Hz.	110
8.3.	Η εφαπτομένη απωλειών (tanδ) συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος, όπως μετρήθηκε στο 1 Hz.	110
8.4.	Εξέλιξη της σχετικής συγκέντρωσης οξυμυογλοβίνης (%) συναρτήσει διαφορετικών δειγμάτων (που προστέθηκαν στο μοντέλο προϊόντος κρέατος) και χρόνου διάμεσου (Barbier, 2009).	118
9.1.	Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης διαχωρισμού των συστατικών των προϊόντων ανάκτησης από τα απόβλητα ελαιουργείου	120

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας	Τίτλος (συνοπτικά)	**Σελίδα**
1.1.	Τυπική χημική σύσταση του ελαιολάδου.	12
1.2.	Βιβλιογραφικά δεδομένα για τη σύσταση αποβλήτων τριφασικών ελαιουργείου.	13
1.3.	Τεχνολογίες επεξεργασίας αποβλήτων ελαιουργείων.	15
1.4.	Διεργασίες παραγωγής προϊόντων και ανάκτησης συστατικών από τα απόβλητα ελαιουργείων.	17
2.1.	Χημική ταξινόμηση των συστατικών των εδώδιμων ινών.	20
2.2.	Εδώδιμες ίνες δημητριακών λαχανικών, φρούτων και αγροβιομηχανικών αποβλήτων.	23
3.1.	Περιεχόμενο και περιεκτικότητα φαινολών διαφόρων πηγών προέλευσης, των δευτερογενών προϊόντων και των αντίστοιχων παραπροϊόντων.	31
5.1.	Χαρακτηριστικά των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή, όπως δίνονται από τον κατασκευαστή αυτών και αντίστοιχες συνθήκες λειτουργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθαρισμού των προϊόντων.	48
5.2.	Χημική σύνθεση των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στα προϊόντα σύγκοπτου κρέατος, όπως δίνεται από τους προμηθευτές	48
5.3.	Συνταγές για την προετοιμασία των κεφτέδων.	56
6.1.	Ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου.	71
6.2.	Χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων AIR που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου κατόπιν επεξεργασίας για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	75
6.3.	Χαρακτηριστικά των WSAIR που ανακτήθηκαν από δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου που επεξεργάστηκαν για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	75
6.4.	Χωρητικότητα συγκράτησης νερού του WSAIR και διόγκωση των WIAIR, όπως ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου που επεξεργάστηκαν για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	77
6.5.	Χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιουργείου πριν και μετά την προ-επεξεργασία αυτών.	82
6.6.	Η επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης σε συνδυασμό με κιτρικό και νιτρικό οξύ, αντίστοιχα, στην απόδοση του AIR και στο υδατοδιαλυτό κλάσμα αυτού.	82
6.7.	Περιεκτικότητα υδατοδιαλυτών, μη υδατοδιαλυτών και ολικών ινών των αδιάλυτων στην αιθανόλη υπολειμμάτων που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων με διαφορετικά μίγματα εκχύλισης.	84

6.8.	Η σύνθεση σακχάρων των ινών στα αδιάλυτα στην αιθανόλη υπολείμματα, όπως ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου με διαφορετικά μίγματα εκχύλισης.	85
6.9.	Χαρακτηρισμός του AIR, WSAIR και WIAIR, το οποίο ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας 5 mL EtOH και 1 g κιτρικό οξύ/100 mL στο μίγμα της εκχύλισης.	86
7.1.	Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατακρήμνισης.	96
7.2.	Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης στο στάδιο της εκχύλισης.	96
7.3.	Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους συντήρησης. Τα εκχυλίσματα ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων κατόπιν επεξεργασίας αυτών για 3 h σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	101
8.1.	Χαρακτηρισμός των WSAIR και WIAIR, τα οποία ανακτήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο (WO2008/082343).	109
8.2.	Χαρακτηρισμός των κεφτέδων πριν και μετά το τηγάνισμα τους.	112
8.3.	Απώλειες μαγειρέματος των κεφτέδων κατά το μαγείρεμα αυτών στο τηγάνι και τη φριτέζα.	113
8.4.	Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων ροφημάτων και ποτών.	118
9.1.	Χαρακτηριστικά των υγρών τροφοδοσίας.	121
9.2.	Παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας των πειραμάτων καθαρισμού των δύο υγρών τροφοδοσίας με διαφορετικές μεμβράνες.	123
9.3.	Συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του διαλύματος πηκτινών συναρτήσει διαφορετικών μεμβρανών.	123
9.4.	Συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του ροφήματος φαινολών όπως προέκυψαν κατόπιν επεξεργασίας με διάφορες μεμβράνες.	125

Πρόλογος

Η ελιά είναι ένας καρπός άρρηκτα συνδεδεμένος με την ιστορία και την παράδοση των Μεσογειακών χωρών και ιδιαίτερα της Ελλάδας. Πιο συγκεκριμένα, η καλλιέργεια της ελιάς και η παραγωγή του ελαιολάδου αποτελούν δραστηριότητες που ήσαν γνωστές από την Μινωϊκή εποχή και οι σύγχρονοι ιστορικοί ερευνητές τις χρησιμοποιούν ως εργαλεία για την αναζήτηση της εξέλιξης των πολιτισμών.

Ωστόσο, η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου προκαλεί διεθνώς προβλήματα περιβαλλοντικής ρύπανσης εξαιτίας της εναπόθεσης στο περιβάλλον εκατοντάδων χιλιάδων τόνων υγρών αποβλήτων. Τα υγρά που είναι γνωστά ως απόβλητα ελαιουργείου, παράγονται σαν παραπροϊόν κατά τη φάση πίεσης και έκθλιψης του ελαιόκαρπου πριν την εξαγωγή του ελαιολάδου. Τα απόβλητα περιέχουν τα περισσότερα υδατο-διαλυτά συστατικά του ελαιόκαρπου, το νερό που προστίθεται για την μάλαξή του (πριν την έκθλιψη) ή τη φυγοκέντριση, κομμάτια καρποκύτταρα της ελιάς, καθώς επίσης και μικρές ποσότητες ελαιολάδου.

Το πρόβλημα διαχείρισης των αποβλήτων ελαιουργείου έχει διερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία 40 χρόνια χωρίς ωστόσο να βρεθεί μια τεχνολογικά αποδεκτή και οικονομικά βιώσιμη λύση. Οι εφαρμόσιμες μέθοδοι είναι κυριολεκτικά αμέτρητες και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές ξεπερνούν τις χίλιες. Οι προτεινόμενες λύσεις μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (α) στην αλλαγή των συστημάτων παραγωγής ελαιολάδου με στόχο την μείωση της ποσότητας των αποβλήτων, (β) στην μείωση του ρυπαντικού φορτίου μέσω της επεξεργασίας τους και (γ) στην ανακύκλωση-ανάκτηση πολύτιμων συστατικών. Σήμερα, η πιο σύγχρονη αντίληψη στην διαχείριση αγροβιομηχανικών αποβλήτων είναι η ανάκτηση και η επαναχρησιμοποίηση εδώδιμων συστατικών από αυτά. Παράλληλα, η ανάπτυξη νέων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από τα ανακτώμενα συστατικά για την φαρμακευτική βιομηχανία, τα τρόφιμα και τα καλλυντικά, αποτελεί την μεγαλύτερη πρόκληση των επιστημόνων του συγκεκριμένου ερευνητικού πεδίου. Τα απόβλητα ελαιουργείου περιέχουν πολύτιμες ενώσεις όπως οι φαινόλες και οι εδώδιμες ίνες που έχουν γνωστές αντιοξειδωτικές και λειτουργικές ιδιότητες, αντίστοιχα, και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου για την πρόληψη ασθενειών π.χ. του καρκίνου και των καρδιοαγγειακών νοσημάτων.

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι οικονομική ανάκτηση φαινολών και εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου με μια φυσική και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία και κατόπιν η επαναχρησιμοποίηση τους ως προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Οι φυσικοχημικές διεργασίες δύναται να χρησιμοποιηθούν για αυτόν το σκοπό, αφού μπορούν να διαχωρίσουν τα συστατικά των αποβλήτων διατηρώντας παράλληλα τον εδώδιμο χαρακτήρα τους.

Η διατριβή περιλαμβάνει δέκα κεφάλαια. Στα πρώτα τέσσερα κεφάλαια πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση στις εξής θεματικές ενότητες: απόβλητα ελαιουργείου (1°), εδώδιμες ίνες (2°), φαινόλες (3°) και φυσικοχημικές διεργασίες διαχωρισμού (4°). Στο 5° κεφάλαιο γίνεται εκτενής αναφορά των πειραματικών διαδικασιών και των μεθόδων προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω μελέτες. Στο 6° και 7° κεφάλαιο παρουσιάζονται δυο ξεχωριστές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την ανάκτηση εδώδιμων ινών και φαινολικών συστατικών από τα απόβλητα ελαιουργείου. Στο 8° κεφάλαιο πραγματοποιείται μια σύνθεση των παραπάνω μελετών για την ταυτόχρονη ανάκτηση των φαινολών και των εδώδιμων ινών σε δύο διαφορετικά προϊόντα. Κατόπιν, διερευνάται η εφαρμογή τους ως πρόσθετα τροφίμων και ποτών. Στο 9° κεφάλαιο παρουσιάζεται μια μελέτη καθαρισμού και διαχωρισμού των οργανικών συστατικών των ανακτημένων προϊόντων με τη χρήση τεχνολογίας μεμβρανών. Εν κατακλείδι, στο 10° κεφάλαιο συνοψίζονται τα συμπεράσματα ολόκληρης της διατριβής και συζητούνται οι μελλοντικές προοπτικές της αναπτυσσόμενης διεργασίας και των προϊόντων που προκύπτουν.

Τα πειράματα και οι μελέτες της διατριβής σχεδιάστηκαν και εφαρμόστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα. Τα πειράματα εκπονήθηκαν το διάστημα 2005-2009 στο Εργαστήριο Φαινομένων Μεταφοράς και Εφαρμοσμένης Θερμοδυναμικής του Πολυτεχνείου Κρήτης, αλλά και στο Τμήμα Διατροφής, Τεχνολογίας και Μηχανικής Τροφίμων του Πανεπιστημίου του Λουντ (Σουηδία). Η επίσκεψή μου στο εν λόγω Ίδρυμα χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα «Socrates-Erasmus» το 2006 (5 μήνες), το πρόγραμμα «επίσκεψης μεταπτυχιακών φοιτητών σε Ερευνητικά Ιδρύματα του εξωτερικού» του Πολυτεχνείου Κρήτης το 2007 (4 μήνες) και την εταιρία Forskarpatent Syd AB (Σουηδία) το 2008 (4 μήνες).

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν ηθικά, επιστημονικά και υλικά όλα αυτά τα χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τους Επιβλέποντες Καθηγητές μου, τον κ. Γκέκα Βασίλειο για την ανάθεση και επίβλεψης της διατριβής, την παρότρυνση και την καθοδήγηση επίσκεψής μου στο Πανεπιστήμιο του Λουντ και την κ. Ψυλλάκη Ελευθερία για τη συνέχιση της επίβλεψης και την πρότερη βοήθεια στα πλαίσια της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Επίσης, ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ωραιοπούλου Βασιλική, για τη βοήθεια ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, αλλά και τον Αναπλ. Καθηγητή Μαντζαβίνο Διονύσιο, τον Καθηγητή Καλογεράκη Νικόλαο, τον Καθηγητή Καλλίθρακα-Κοντό Νικόλαο και την Καθηγήτρια Eva Tornberg που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Επταμελή Επιτροπή Αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Specially, I would like to thank Professor Eva Tornberg for her endless scientific passion, ideas and general support during my visiting period in Lund University that made me feel like I was at home. Moreover, I would like to thank her for the help with regard to my PhD thesis and our patent consolidation. Sincerely, it is really difficult to explain with few words her general impact to my career. Eva, tack så mycket!!

Επιπλέον, ευχαριστώ όλους όσους συνεργάστηκα στα Εργαστήρια του Πολυτεχνείου Κρήτης και του Πανεπιστημίου του Λουντ. Ειδικά, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορ και «συγκάτοικο» στο εργαστήριο, Άννα Πατσιούρα, για τη γενικότερη βοήθεια και συνεργασία, αλλά και την Δρ. Παπαδοπούλου Αφροδίτη για τη βοήθειά της σε διαδικαστικά θέματα του εργαστηρίου. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Περδικάτση Βασίλειο για όλες τις συμβουλές του και τον Δρ. Γιαννή Απόστολο για τις ατέρμονες συζητήσεις Ακαδημαϊκού περιεχομένου.

Εν τέλει, ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου την οικογένειά μου, τους γονείς μου Αργυρούλα και Μιχάλη, τον αδερφό μου Ιωάννη και την αδερφή μου Χρυσίδα για την ηθική και υλική στήριξη, αλλά και την απύθμενη υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Γαλανάκης Χάρης

Χανιά, Μάιος 2010

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Ο σκοπός αλλά και η πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής αφορούν την ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονης ανάκτησης φαινολών και εδώδιμων ινών από τα απόβλητα τριφασικών ελαιουργείων με τη χρήση φυσικοχημικών διεργασιών (π.χ. συμπύκνωση, κατακρήμνιση, υπερδιήθηση, νανοδιήθηση κ.ά.). Ο απώτερος σκοπός είναι η χρησιμοποίηση των συστατικών αυτών ως προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Συγκεκριμένα, η απομόνωση των εδώδιμων ινών από φρούτα περιλαμβάνει συνήθως ένα αρχικό στάδιο κατακρήμνισης αυτών με αιθανόλη (85% κ.ό.) και κατόπιν διαδοχικά στάδια εκχύλισης παρουσία οξέων και βάσεων. Ακολουθώντας αυτήν την αρχή, ο διαχωρισμός των εδώδιμων ινών από τις φαινόλες στα απόβλητα βασίστηκε στην προσθήκη αιθανόλης και κατόπιν στην διήθηση του κατακρημνισμένου υπολείμματος. Η εκχύλιση επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί πριν το στάδιο της κατακρήμνισης με προσθήκη αιθανόλης και οξέος σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 20% κ.ό. και 1% κ.β., αντίστοιχα). Επιπλέον, έγινε μια προ-επεξεργασία του αποβλήτου πριν την εκχύλιση με στόχο την εν θερμώ συμπύκνωσή του. Από την αναπτυσσόμενη διεργασία προέκυψαν δύο προϊόντα: (α) ένα αιθανολικό εκχύλισμα πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις και (β) ένα αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη, πλούσιο σε εδώδιμες ίνες. Το υπόλειμμα διαχωρίστηκε περαιτέρω σε δύο κλάσματα: (β_1) στο υδατο-διαλυτό και (β_2) στο μη υδατο-διαλυτό. Το αιθανολικό εκχύλισμα και το υδατο-διαλυτό κλάσμα του υπολείμματος αραιώθηκαν με νερό και τα συστατικά τους διαχωρίστηκαν περαιτέρω με την χρήση μεμβρανών. Τα επιμέρους ερευνητικά αντικείμενα της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνουν:

- Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας συμπύκνωσης (25-80 ^{o}C) στην απόδοση (συγκέντρωση) και στην ποιότητα (ρεολογικές ιδιότητες) των ανακτώμενων εδώδιμων ινών και των φαινολών (αντιοξειδωτικές ιδιότητες).

- Μελέτη της θερμικής ενεργοποίησης ενδογενών ενζύμων (π.χ. πηκτινομεθυλεστεράση και πολυφαινολοξειδάση) του αποβλήτου στο στάδιο της συμπύκνωσης.

- Μελέτη επίδρασης του χρόνου ανάκτησης των φαινολικών συστατικών στο στάδιο της κατακρήμνισης του αδιάλυτου υπολείμματος.

- Μελέτη συντήρησης των φαινολικών συστατικών στην αιθανόλη και των αντιστοίχων αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων.

- Μελέτη επίδρασης της συγκέντρωσης αιθανόλης (0-20% με ή χωρίς την παρουσία οξέος) στο στάδιο της εκχύλισης σε σχέση με την απόδοση (συγκέντρωση) και την ποιότητα των ανακτημένων εδώδιμων ινών (ρεολογικές ιδιότητες) και των φαινολών (αντιοξειδωτικές ιδιότητες).

- Μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων και του μηχανισμού ζελοποίησης των ανακτημένων εδώδιμων ινών.

- Μερικός χαρακτηρισμός των ανακτημένων προϊόντων (α, β_1 και β_2) και διερεύνηση της εφαρμογής αυτών ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ποτά (π.χ. ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα κρέατος).

- Μελέτη συμπύκνωσης του αιθανολικού εκχυλίσματος πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις με ταυτόχρονη ανάκτηση μέρους της χρησιμοποιημένης αιθανόλης στο απόσταγμα.

- Μελέτη καθαρισμού των ανακτώμενων ινών από τα περιεχόμενα ιόντα στο υδατο-διαλυτό υπόλειμμα με την χρήση διαφορετικών μεμβρανών υπερδιήθησης (100, 25, 10 και 2 kDa) και νανοδιήθησης (120 Da).

- Μελέτη διαχωρισμού των επιμέρους ανακτώμενων φαινολικών συστατικών με την χρήση διαφορετικών μεμβρανών (100, 25, 10 και 2 kDa) και νανοδιήθησης (120 Da).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Απόβλητα Ελαιουργείου

1.1. Εισαγωγή

Η καλλιέργεια των ελαιόδεντρων και συνακόλουθα η παραγωγή του ελαιολάδου αποτελούν πρακτικές ιδιαίτερα γνωστές στην περιοχή της Μεσογείου για χιλιάδες χρόνια (Tsagaraki et al., 2007). Πρόσφατα αρχαιολογικά ευρήματα στην βόρεια ακτή του Ισραήλ αποδεικνύουν ότι οι νεολιθικοί της κάτοικοι κατανάλωναν την ελιά πριν 8000-7000 χρόνια (Galili & Sharvit, 1998). Εξάλλου, την ίδια χρονική περίοδο καλλιεργήθηκαν τα πρώτα δέντρα στη Συρία (Arvanitoyiannis et al., 2007). Σήμερα, η παγκόσμια καλλιέργεια ελαιόδεντρων περιλαμβάνει περίπου $750 \cdot 10^6$ παραγωγικά δέντρα που καλύπτουν $7 \cdot 10^6$ εκτάρια γης. Η ετήσια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και ελαιολάδου εκτιμάται ότι είναι 1 και $2{,}5 \cdot 10^6$ tn, αντίστοιχα, ενώ ο αριθμός των ελαιουργείων ανέρχεται στις 25.000. Η ιστορία και η παράδοση των Μεσογειακών χωρών αποτυπώνεται ανάγλυφα στην υφιστάμενη κατάσταση αφού κατέχουν το 98% της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας και το 97% της παραγωγής του ελαιολάδου. Η Ισπανία είναι η πρώτη χώρα παγκοσμίως με ελαιόδεντρα που καλύπτουν $2{,}1 \cdot 10^6$ εκτάρια γης και αποδίδουν $3{,}8 \cdot 10^6$ tn ελαιόκαρπους. Η Ιταλία και η Ελλάδα έπονται με 1,1 και $0{,}7 \cdot 10^6$ εκτάρια γης, αλλά και 2,2 και $1{,}9 \cdot 10^6$ tn ελαιοκάρπων, αντίστοιχα (Brenes et al., 1999; Niaounakis & Halvadakis, 2004). Κάθε ελαιόδεντρο αποδίδει ετησίως από 15 έως 40 kg ελαιών. Μεγάλη παραγωγή έχουν η Τουρκία και η Τυνησία και ακολουθούν η Πορτογαλία, το Μαρόκο, η Συρία και η Αλγερία. Πρόσφατα, η καλλιέργεια επεκτάθηκε και σε άλλες περιοχές όπως ο Καναδάς, η Αυστραλία, η Ιαπωνία, η Αργεντινή η Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006; Tsagaraki et al., 2007; Arvanitoyiannis et al., 2007).

Το ελαιόλαδο είναι ο μόνος τύπος εδώδιμου ελαίου που μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα από τον καρπό με πίεση. Άλλα φυτικά έλαια όπως π.χ. το καλαμποκέλαιο πρέπει να επεξεργαστούν διαφορετικά ώστε να ανακτηθούν (Arvanitoyiannis et al., 2007). Για αυτόν τον λόγο, η παραδοσιακή διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου περιελάμβανε την άλεση του ελαιόκαρπου σε πέτρινους μύλους και κατόπιν διαχωρισμό του ελαίου από τον πολτό με υδραυλική πίεση (Χατζησυμεών, 2009). Η σύγχρονη παραγωγή του

ελαιολάδου περιλαμβάνει την μάλαξη της ελαιόπαστας με ζεστό νερό και κατόπιν το διαχωρισμό του ελαιολάδου με φυγοκέντριση που εφαρμόζεται είτε απευθείας στο ζεστό πολτό, είτε μετά την στράγγιση του ελαιοπυρήνα από αυτόν. Και στις δύο περιπτώσεις, η διεργασία παράγει ένα μείγμα με βάση το νερό, το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία με τον εδραιωμένο όρο «**απόβλητα ελαιουργείου**» ή «**olive mill wastewater**».

Η ποσότητα των αποβλήτων που παράγονται κατά την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου κυμαίνεται από 0,2 έως 1,6 m^3/kg ελαιόκαρπου, ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο εξαγωγής (Alburquerque et al., 2006). Η ετήσια παραγωγή αποβλήτων στις Μεσογειακές χώρες εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 7 και 30 εκατομμυρίων m^3 (Sayadi & Ellouz, 1995). Μια άλλη μελέτη από τους Cabrera et al. (1996) αναφέρει την ετήσια παραγωγή με μικρότερη διακύμανση: 10 με $12 \cdot 10^6$ m^3. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η Ισπανία κατέχει και σε αυτόν τον τομέα τα πρωτεία της παραγωγής ($2\text{-}3 \cdot 10^6$ m^3). Στην Ελλάδα, η ποσότητα των αποβλήτων εκτιμάται ότι είναι περίπου $1{,}5 \cdot 10^6$ m^3 (Iconomou et al., 2000). Οι μεγάλες αποκλίσεις στις εκτιμήσεις των παραγόμενων αποβλήτων οφείλονται κυρίως σε δύο παραμέτρους: (α) οι βιολογικοί παράγοντες των ελαιόδεντρων που επηρεάζουν την παραγωγή τους ανά διετή κύκλο (Giannakas et al., 2000) και (β) η ελλιπής καταγραφή της ποσότητας και της ιχνηλασιμότητας των παραγόμενων αποβλήτων που δημιουργούν σύγχυση και λανθασμένες εκτιμήσεις (Niaounakis & Halvadakis, 2004). Η ετήσια εναπόθεση εκατομμύριων τόνων αποβλήτων στο περιβάλλον δημιούργησαν ανησυχία τόσο στους ερευνητές, όσο και στις αντίστοιχες περιβαλλοντικές αρχές που ασχολούνται εδώ και 40 χρόνια με την αντιμετώπιση του προβλήματος. Ωστόσο, οι τεράστιες ποσότητες των αποβλήτων αποτελούν μόνο μια πτυχή του προβλήματος που στην πράξη έχει αποδειχτεί ότι είναι πολύ πιο περίπλοκο.

1.2. Η φύση του προβλήματος

Η διαχείριση και επεξεργασία των αποβλήτων είναι ένα πολυσύνθετο πρόβλημα, η φύση του οποίου σχετίζεται με ρυπαντικούς, οργανωτικούς, οικονομικούς, κοινωνικούς και πολιτικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, τα κύρια χαρακτηριστικά ρύπανσης των αποβλήτων περιλαμβάνουν πολύ υψηλούς περιβαλλοντικούς δείκτες και συστατικά που αντιμετωπίζονται και βιο-διασπώνται δύσκολα (Beccari et al., 2002; Lagoudianaki et al., 2003; Davies et al., 2004; Paraskeva & Diamadopoulos, 2006; Tsagaraki et al., 2007; Kallel et al., 2009):

- Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand–COD): 40-220 g/L.
- Βιοχημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand–BOD_5): 10-110 g/L.
- Αναλογία COD/BOD_5 που κυμαίνεται από 2,5 μέχρι 5.
- Όξινο pH από 3 έως 5,9.
- Αγωγιμότητα από 8 έως 16 mS/cm.

- Συγκέντρωση στερεών από 1 έως 20 g/L.
- Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων από 0,5 μέχρι 80 g/L.
- Σκούρο χρώμα και ισχυρή οσμή εξαιτίας ύπαρξης οξειδωμένων ελαίων και αυτό-οξειδούμενων φαινολών.

Όπως φαίνεται παραπάνω, το οργανικό περιεχόμενο των αποβλήτων παρουσιάζει πολύ μεγάλο εύρος. Παράγοντες όπως η ποικιλία του ελαιόκαρπου, η εποχή της συγκομιδής, τα χαρακτηριστικά κάθε χρονιάς, οι κλιματικές συνθήκες, ο τόπος καλλιέργειας και η τεχνολογία παραγωγής του ελαιολάδου συντελούν στην διαμόρφωση αυτής της διακύμανσης. Το εύρος των παραγόμενων ποσοτήτων (Ενότητα 1.1) και του ρυπαντικού φορτίου αποτελούν σημαντικά εμπόδια για την διαχείριση και την επεξεργασία των αποβλήτων, αντίστοιχα. Το πρόβλημα γίνεται ακόμα οξύτερο εξαιτίας της εποχικής παραγωγής (Οκτώβριο με Φεβρουάριο) και της γεωγραφικής διασποράς των αποβλήτων. Οι μικρές ελαιουργικές μονάδες αντιμετωπίζουν ιδιαίτερα προβλήματα, αφού η οποιαδήποτε επεξεργασία των παραπροϊόντων (απόβλητα) έχει σημαντικό οικονομικό κόστος το οποίο δεν αυξομειώνεται αναλόγως του εποχικού κέρδους πώλησης του προϊόντος (ελαιόλαδο). Όλες οι παραπάνω παράμετροι συντελούν στην εύκολη «λύση» για τα ελαιουργεία που είναι η διάθεση των αποβλήτων στο έδαφος και τη θάλασσα χωρίς καμία επεξεργασία. Η πρακτική αυτή είναι παράνομη στις περισσότερες χώρες εξαιτίας των σημαντικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που παρουσιάζονται στην επόμενη Ενότητα (1.3). Η ενσωμάτωση των αποβλήτων στις μονάδες βιολογικής επεξεργασίας αστικών λυμάτων είναι επίσης παράνομη αφού δημιουργεί προβλήματα λόγω της τοξικότητας των φαινολών και της εναπόθεσης των στερεών στους σωλήνες.

Προς το παρόν η Ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν καλύπτει καμία ενιαία πολιτική για την διαχείριση των αποβλήτων ελαιουργείων και τα πρότυπα καθορίζονται από κάθε χώρα ξεχωριστά (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006). Σύμφωνα με την Ιταλική νομοθεσία, τα απόβλητα πρέπει να επεξεργαστούν πριν τη διάθεσή τους στο περιβάλλον, εκτός από κάποιες περιπτώσεις όπου εναποτίθενται υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Στην Ισπανία η κυβέρνηση προώθησε την κατασκευή 1000 δεξαμενών εξάτμισης ώστε να περιοριστεί η έκταση του προβλήματος (Tsagaraki et al., 2007). Η πρακτική αυτή βρίσκει εφαρμογή στην Τυνησία (S'habou et al., 2009), αλλά και στη χώρα μας. Η ισχύουσα Ελληνική νομοθεσία κατατάσσει τα απόβλητα ελαιουργείου μαζί με παρόμοια αγροβιομηχανικά απόβλητα και καθορίζει ανώτερα επιτρεπτά όρια διαφόρων δεικτών ρύπανσης για τη διάθεση σε φυσικούς υδάτινους αποδέκτες (Χατζησυμεών, 2009). Ο έλεγχος της διαδικασίας αυτής έγκειται στην δικαιοδοσία κάθε Νομαρχίας (Kapellakis et al, 2006). Παρόλα αυτά, η αυστηρή επιτήρηση των μικρών ελαιουργικών μονάδων από τις τοπικές αρχές δυσχεραίνει την βιωσιμότητά τους και συνακόλουθα υπονομεύει την οικονομική κατάσταση του ελαιοπαραγωγικού κλάδου. Έτσι, δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος διαχείρισης των αποβλήτων και το πρόβλημα παραμένει επί της ουσίας άλυτο και διαχρονικό.

1.3. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Οι επιπτώσεις της εναπόθεσης ακατέργαστων αποβλήτων είναι γνωστές στην ιστορία, αφού υπάρχουν ευρήματα που επιβεβαιώνουν την οικολογική επιβάρυνση περιοχών της Μεσογείου για χιλιάδες χρόνια. Σήμερα, οι επιπτώσεις είναι πιο ορατές για τους εξής λόγους: (α) η παραγωγή του ελαιολάδου έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, (β) η παραγωγή πραγματοποιείται σε βιομηχανικό επίπεδο και (γ) αυξήθηκε η ευαισθητοποίηση της κοινής γνώμης για το περιβάλλον (Rossi & Malpei, 1996; Niaounakis & Halvadakis, 2004). Με βάση το ρυπαντικό φορτίο, 1 m^3 αποβλήτων ελαιουργείου είναι ισοδύναμο με 100-200 m^3 οικιακών αποβλήτων. Το ημερήσιο ρυπαντικό φορτίο που εναποτίθεται στο περιβάλλον της Μεσογείου εκτιμάται ότι είναι 2800-3600 tn BOD_5. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν σε 5-10 φορές μεγαλύτερη ρύπανση σε σχέση με τα οικιακά απόβλητα που παράγονται για το ίδιο χρονικό διάστημα π.χ. σε Ισπανία και Ιταλία (Boari et al., 1984).

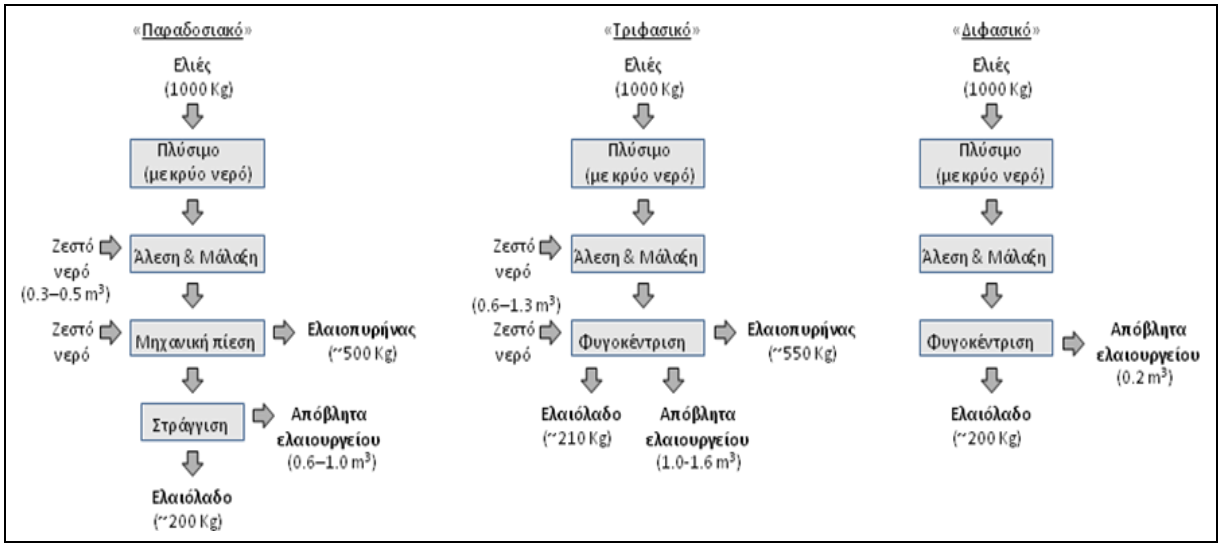
Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, η ανεξέλεγκτη διάθεση αποβλήτων σε ποτάμια, λίμνες και θάλασσα προκαλεί σημαντικά προβλήματα για ολόκληρο το οικοσύστημα με πιο άμεσες επιπτώσεις τις οσμές και τον αντιαισθητικό χρωματισμό των μέσων. Ο χρωματισμός οφείλεται στην οξείδωση και τον πολυμερισμό των περιεχόμενων τανινών, προσδίδοντας χαρακτηριστικό σκούρο καφέ χρώμα (Hamdi, 1992; Rozzi et al., 1998). Τα απόβλητα περιέχουν επίσης υψηλό οργανικό φορτίο αλλά και σημαντικές ποσότητες αναγόντων σακχάρων και φωσφόρου που προκαλούν ευτροφισμό στα υδάτινα μέσα (Arvanitoyiannis et al., 2007; Tsagaraki et al., 2007). Η εναπόθεση των αποβλήτων έχει σημαντικές επιπτώσεις και στο έδαφος, π.χ. οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις καλίου επηρεάζουν την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων και τους μικροοργανισμούς του εδάφους και συνακόλουθα την γονιμότητα του (Paredes et al., 1987). Άλλες αρνητικές συνέπειες είναι η καθήλωση του αζώτου και η μείωση της διαθεσιμότητας του μαγνησίου λόγω ανταγωνιστικής δράσης του καλίου (Sierra et al., 2001). Επιπλέον, η εναπόθεση των αποβλήτων μπορεί να επηρεάσει το πορώδες του εδάφους, την συγκράτηση του νερού και το κορεσμό της υδραυλικής αγωγιμότητας (Cox et al., 1997; Abu-Zreig & Al-Widyan, 2002).

Τέλος, όπως έχει αποδειχθεί, τα απόβλητα έχουν αντιβακτηριδιακή δράση έναντι Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων (Pérez et al., 1992; Capasso et al., 1995; Ramos-Cormenzana et al., 1996) που γενικώς αποδίδεται στις περιεχόμενες φαινόλες. Οι βιο-τοξικές ιδιότητες των φαινολών αποτελούν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για το συνήθη βιολογικό καθαρισμό των αποβλήτων (Tsagaraki et al., 2007). Επιπλέον, τα απόβλητα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη διαφόρων φυτών και λαχανικών, ενώ μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και αποκοπή καρπών (Pérez et al., 1986; Capasso et al., 1992b; Della Greca et al., 2001; Rinaldi et al., 2003). Η φυτο-τοξική δράση οφείλεται στις περιεχόμενες φαινόλες (Wang et al., 1967) και σε οξέα όπως το οξικό ή το μυρμηγκικό οξύ που αναπτύσσονται μαζί με μικροβιακούς μεταβολίτες κατά την αποθήκευση των αποβλήτων (Rinaldi et al., 2003).

1.4. Τεχνολογίες εξαγωγής ελαιολάδου και των αντίστοιχων αποβλήτων

Οι βασικές τεχνολογίες εξαγωγής ελαιολάδου είναι οι εξής (**Σχήμα 1.1**): (α) ελαιουργεία διαλείποντος έργου «παραδοσιακού τύπου» (μέθοδος πίεσης) (β) συνεχή φυγοκεντρικά ελαιουργεία «διφασικού τύπου» και (γ) συνεχή φυγοκεντρικά ελαιουργεία «τριφασικού τύπου». Τα ελαιουργεία «παραδοσιακού» και «τριφασικού» τύπου παράγουν 3 φάσεις (Vlyssides et al., 1998): (α) ελαιόλαδο, (β) ελαιοπυρήνα και (γ) απόβλητα (ή απόνερα) ελαιουργείου. Στα ελαιουργεία «παραδοσιακού τύπου» η ποσότητα του προστιθέμενου νερού κατά την διάρκεια εξαγωγής του ελαιολάδου είναι μικρή (30-50 L/1000 kg ελαιόκαρπων). Έτσι, παράγονται μικρές ποσότητες αποβλήτων που περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στερεών, οργανικών και φαινολών σε σχέση με τις άλλες διεργασίες. Στα ελαιουργεία «τριφασικού τύπου» απαιτείται επιπλέον προσθήκη νερού (1,25 με 1,75 φορές) πριν το στάδιο της φυγοκέντρισης με αποτέλεσμα την αύξηση της ποσότητας των αποβλήτων και το διπλασιασμό της συγκέντρωσης στερεών σε σχέση με το παραδοσιακό σύστημα.

Τα ελαιουργεία «διφασικού τύπου» παράγουν δύο φάσεις: (α) ελαιόλαδο και (β) απόβλητα σε μορφή λάσπης. Η ποσότητα νερού που υπεισέρχεται στο σύστημα είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τους άλλους δύο τύπους και καταλήγει μαζί με τον ελαιοπυρήνα στα απόβλητα. Η τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε πριν 20 χρόνια με στόχο την μείωση του απαιτούμενου νερού, των παραγόμενων αποβλήτων και τον περιορισμό των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Ωστόσο, το νέο σύστημα μεταφέρει επί της ουσίας το πρόβλημα στα πυρηνελαιουργεία, αφού απαιτείται επιπλέον ενέργεια για την ξήρανση της «λάσπης» και την εξαγωγή του πυρηνέλαιου, π.χ. η λάσπη έχει 55-70% υγρασία σε αντίθεση με 40-45% και 20-25% του πυρήνα των ελαιουργείων «τριφασικού» και «παραδοσιακού», αντίστοιχα. Έτσι, το κόστος για τα πυρηνελαιουργεία γίνεται δυσβάσταχτο, ενώ προκύπτουν και άλλα προβλήματα λόγω της καραμελοποίησης των περιεχόμενων πολυσακχαριτών (Tsagaraki et al., 2007).



Σχήμα 1.1. Συστήματα παραγωγής ελαιολάδου.

1.5. Χαρακτηρισμός των αποβλήτων ελαιουργείου

Ο ελαιόκαρπος είναι μια δρύπη με σχήμα αυγοειδές και χωρίζεται σε 2 κύρια μέρη¨στο περικάρπιο και στο ενδοκάρπιο (Κυριτσάκης, 1989). Μια τυπική χημική σύσταση των μερών του ελαιόκαρπου φαίνεται στον **Πίνακα 1.1**. Το εξωκάρπιο καλύπτεται από ένα στρώμα κεριού και το χρώμα του αλλάζει από πράσινο σε βυσσινί και μαύρο κατά την διάρκεια ωρίμανσης του καρπού (Bianchi et al., 1992; Mafra et al., 2001). Το μεσοκάρπιο καλύπτει το 80% του καρπού και περιέχει λεπτά κυτταρικά τοιχώματα από πηκτίνη και κυτταρίνη (Georget et al., 2001). Το ενδοκάρπιο περιβάλλει τον ελαιοπυρήνα σε μια σκληρή υποδοχή από λιγνίνη (Coimbra et al., 1995). Η περιεκτικότητα των εδώδιμων ινών (πηκτίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη) στο σύνολο του ελαιόκαρπου είναι ~6-7% κ.β., (Jiménez et al., 1994). Η αντίστοιχη περιεκτικότητα των φαινολών είναι ~2.5%. Τα απόβλητα ελαιουργείου είναι ένα προϊόν ανάμειξης του ελαιόκαρπου με νερό. Επομένως, τα συστατικά των αποβλήτων προέρχονται από τον ελαιόκαρπο και αντίστοιχα η συγκέντρωσή τους καθορίζεται από την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου. Όπως προαναφέρθηκε, η τεχνολογία εξαγωγής ελαιολάδου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ποσότητα του απαιτούμενου νερού και στην συγκέντρωση των συστατικών των αποβλήτων. Για παράδειγμα, όσο πιο πολύ νερό προστίθεται στο στάδιο της μάλαξης, τόσο περισσότερες φαινόλες μεταφέρονται στα απόβλητα (Rodis et al. 2002). Στη παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η ανάκτηση φαινολών και εδώδιμων ινών αποκλειστικά από απόβλητα «τριφασικού ελαιουργείου» διότι:

- παραμένει η κύρια τεχνολογία εξαγωγής του ελαιολάδου στην Κρήτη, π.χ. τουλάχιστον το 90% των ελαιουργείων είναι «τριφασικού τύπου».
- περιέχει περισσότερες υδατοδιαλυτές ίνες (π.χ. πηκτίνες) και λιγότερες μη-υδατοδιαλυτές ίνες (π.χ. κυτταρίνη, λιγνίνη) σε σχέση με τα απόβλητα «διφασικού τύπου».
- η ανάκτηση πυρηνέλαιου είναι κερδοφόρα και έτσι το κόστος ανάκτησης παραμένει μικρότερο στο συνολικό σχεδιασμό της διεργασίας.
- τα απόβλητα «διφασικού τύπου» θα απαιτούσαν προσθήκη νερού για την εκχύλιση εδώδιμων ινών ή φαινολών.

Πίνακας 1.1. Τυπική χημική σύσταση του ελαιόκαρπου (g/100 g) (Niaounakis & Halvadakis, 2004).

Συστατικό	Μεσοκάρπιο	Ενδοκάρπιο	Πυρήνας
Νερό	50-60	30	9,1
Έλαιο	15-30	27,3	0,7
Αζωτούχες ενώσεις	2-3	10,2	3,4
Σάκχαρα	3-7,5	26,6	41
Κυτταρίνη	3-6	1,9	38
Ανόργανα	1-2	1,5	4,1
Φαινόλες	2,25-3	0,5-1	0,1
Άλλες ενώσεις	—	2,4	3,4

Πίνακας 1.2. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τη σύσταση αποβλήτων «τριφασικών ελαιουργείων».

Παράμετρος	**Μονάδα**	**Τιμή**	**Αναφορές**
Νερό	g/100 g	83-94	Borsani & Fernando (1996) ; Davies et al. (2004)
Οργανικά συστατικά	g/100 g	4-18	Niaounakis & Halvadakis (2004); Davies et al. (2004)
Ανόργανα συστατικά	g/100 g	0,4-2,5	Niaounakis & Halvadakis (2004); Davies et al. (2004)
Ολικά στερεά	g/100 g	3,2-30	Azbar et al. (2004)
	g/100 mL*		Bradley & Baruchello (1980)
Λίπη και έλαια	g/100 g	0,03-1,1	Borsani & Fernando (1996); Paredes et al. (1999)
	g/100 mL*	0,03-2,3	Sierra et al. (2001); Galiatsatou et al. (2002)
Σάκχαρα	g/100 g	1-4,7	Aktas et al. (2001); Azbar et al. (2004)
Υδατάνθρακες	g/100 g	2-8	Borsani & Fernando (1996); Galiatsatou et al. (2002)
Πηκτίνη	g/100 g	1-1,5	Borsani & Fernando (1996); Galiatsatou et al. (2002)
Φαινόλες	g/100 mL*	0,0002-8	Azbar et al. (2004); Eroglou et al. (2004)
	g/100 g	0,6-4,0	Paredes et al. (1999); Caputo et al. (2003)
Άζωτο (N)	g/100 mL*	0,03-0,15	Sierra et al. (2001); Azbar et al. (2004)
	g/100 g	0,58-2	Paredes et al. (1999); Galiatsatou et al. (2002)
Κάλιο (K^+)	g/100 mL*	0,3-0,8	Sierra et al. (2001); Eroglou et al. (2004)
Φώσφορος (P)	g/100 g	0,06-0,32	Paredes et al. (1999)
	g/100 mL*	0,3-1,1	Sierra et al. (2001)
Ασβέστιο (Ca^{2+})	g/100 g	0,32-0,53	Paredes et al. (1999)
	g/100 mL*	0,01-0,08	Sierra et al. (2001); Eroglou et al. (2004)
Νάτριο (Na^+)	g/100 g	0,04-0,48	Paredes et al. (1999)
	g/100 mL*	0,01-0,09	Sierra et al. (2001)
Μαγνήσιο (Mg^{2+})	g/100 g	0,06-0,22	Paredes et al. (1999)
	g/100 mL*	0,01-0,04	Sierra et al. (2001); Eroglou et al. (2004)

* Η πυκνότητα των αποβλήτων κυμαίνεται γενικώς από 1,01 έως 1,10 g/mL (Niaounakis & Halvadakis, 2004).

Μια τυπική σύσταση των αποβλήτων «τριφασικών» ελαιουργείων παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1.2**. Το κύριο συστατικό των αποβλήτων είναι το νερό (80-94 g/100 g). Τα οργανικά συστατικά (4-18 g/100 g) των αποβλήτων περιλαμβάνουν διάφορες ποσότητες υδατανθράκων (2-8 g/100 g), πολυσακχαριτών (βλ. Κεφάλαιο 2) και ελεύθερων σακχάρων (1-4,5 g/100 g) που αποτελούνται κυρίως από γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννιτόλη και ιχνών σακχαρόζης (Fernández-Bolaños et al., 1983; 2004; Marsilio et al., 2001). Οι Arienzo et al. (2003) αναφέρουν ότι το ποσοστό των μονο-και πολυ-σακχαριτών του ελαιοκάρπου είναι 26% και 74%, αντίστοιχα, ενώ τα σάκχαρα των πολυσακχαριτών αποτελούνται κατά σειρά μειωμένης συγκέντρωσης από: Glc, Ara, GalA, Fru, Rha, Gal και Xyl.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.1**, τόσο η σάρκα όσο και το κουκούτσι περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινολών. Οι φαινόλες είναι κατά βάση υδατοδιαλυτές στο νερό (συντελεστής κατανομής ελαίου/νερό ~$6\cdot10^{-4}$ έως $1,5\cdot10^{0}$) και έτσι μεταφέρονται κατά ~99% στα απόβλητα (Obied et al., 2005b). Ως επακόλουθο, τα απόβλητα περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις φαινολών, π.χ. μέχρι και 8 g/100 g. Άλλα οργανικά συστατικά των αποβλήτων είναι η πηκτίνη, οι αζωτούχες ενώσεις, τα πτητικά οξέα, τα λίπη-έλαια (Fiestas Ros de Ursinos, 1957).

Τα αντίστοιχα ανόργανα συστατικά (0,4-2,5 g/100 g) περιλαμβάνουν κυρίως άλατα του καλίου και φωσφορικές ενώσεις. Το κάλιο (K^+) βρίσκεται σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερες σε σχέση με άλλα κατιόντα όπως το νάτριο (Na^+), το ασβέστιο (Ca^{2+}), το μαγνήσιο (Mg^{2+}), ο ψευδάργυρος (Zn^{2+}) και ο χαλκός (Cu^+). Τα παραπάνω μέταλλα μπορεί να συνδέονται σε μεγάλες πολυμερείς οργανικές ενώσεις, όπως π.χ. την λιγνίνη. Εξάλλου, τα ιόντα χλωρίου (Cl^-) και τα φωσφορικά (PO_4^{2-}) παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με υπόλοιπα ανιόντα (Arienzo & Capasso, 2000; Capasso et al. 2002; Tsagaraki et al., 2007).

1.6. Τεχνολογίες επεξεργασίας και διαχείρισης αποβλήτων ελαιουργείων

Οι προτεινόμενες μέθοδοι επεξεργασίας ή μεταποίησης των αποβλήτων ελαιουργείων μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

i. Μετατροπή των συστημάτων παραγωγής ελαιολάδου με στόχο την μείωση των παραγόμενων αποβλήτων (βλ. Ενότητα 1.4).
ii. Μέθοδοι αποτοξίνωσης με στόχο τη μείωση των επιπτώσεων του ρυπαντικού φορτίου στους αποδέκτες. Οι τεχνολογίες αυτές περιλαμβάνουν: φυσικές, θερμικές, φυσικοχημικές, βιολογικές ή συνδυασμό αυτών (βλ. Πίνακας 1.3).
iii. Μέθοδοι που στοχεύουν στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων και την ανάκτηση συστατικών από τα απόβλητα (βλ. Ενότητα 1.7).

Στον **Πίνακα 1.3** παρουσιάζεται μια σύνοψη των τεχνολογιών αποτοξίνωσης και των χαρακτηριστικών τους. Οι φυσικές διεργασίες χρησιμοποιούνται συνήθως ως μέθοδοι προ-επεξεργασίας των αποβλήτων για την απομάκρυνση των περιεχόμενων στερεών. Οι θερμικές διεργασίες στοχεύουν στην συμπύκνωση ή την καταστροφή των αποβλήτων, αλλά έχουν πολύ υψηλό κόστος λειτουργίας και είναι αναποτελεσματικές. Οι κοινές φυσικοχημικές μέθοδοι (εξουδετέρωση, καθίζηση κλπ) είναι σχετικά φτηνές, ωστόσο απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία των αποβλήτων. Οι προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι είναι πολύ αποτελεσματικές αλλά έχουν υψηλό κόστος. Σε κάθε περίπτωση, η πλήρης αποτοξίνωση των αποβλήτων επιτυγχάνεται συνήθως με το συνδυασμό βιολογικών, φυσικοχημικών και οξειδωτικών μεθόδων που ανεβάζει κατακόρυφα το κόστος επεξεργασίας. Έτσι, καμία από τις προτεινόμενες διεργασίες δεν έχει βρει μια ευρέως αποδεκτή εφαρμογή.

Πίνακας 1.3. Τεχνολογίες επεξεργασίας αποβλήτων ελαιουργείων.

Κατηγορία	Μέθοδος	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Παρατηρήσεις	Αναφορές
Φυσικές	Ιζηματοποίηση, διήθηση, επίπλευση, φυγοκέντριση	Απομακρύνονται τα στερεά των αποβλήτων	Πλήρη ή μερική απομάκρυνση στερεών, απομάκρυνση 70% του COD, ανάκτηση 30% του ελαίου	Κοινή μέθοδος προ-επεξεργασίας	Velioĝlu et al. (1987); Georgacakis & Dalis (1993)
	Μικρο-, υπερ-, νανο-διήθηση, αντίστροφη ώσμωση	Διαχωρισμός συστατικών που βρίσκονται στην ίδια φάση με βάση το μέγεθός τους	Απομάκρυνση COD μέχρι 99%, ωστόσο φράζουν εύκολα οι μεμβράνες	Υψηλό κόστος. Χρησιμοποιούνται στη σειρά	Canepa et al. (1988); Turano et al. (2002); Stoller & Chianese (2006); Russo (2007); Paraskeva et al. (2007)
Θερμικές	Εξάτμιση, απόσταξη	Απομάκρυνση νερού και μείωση των αποβλήτων	Απομάκρυνση COD 20-80% αλλά απαιτείται επιπλέον επεξεργασία	Μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις	Rossi & Malpei (1996); Tsagaraki et al. (2007)
	Καύση, πυρόλυση	Αποσύνθεση, καταστροφή αποβλήτων	Παράγουν τοξικά αέρια και έχουν υψηλό κόστος	Πολύ μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις	Rossi & Malpei (1996); Caputto et al. (2003)
Φυσικο-χημικές	Εξουδετέρωση, καθίζηση, προσρόφηση	προσθήκη $FeCl_3$, $Ca(OH)_2/MgO$, Na_2SiO_3, προσρόφηση σε άνθρακα	Απομάκρυνση 30-50% COD	Απομάκρυνση 80-95% COD με συνδυασμό καθίζησης/προσρόφησης	Sakira et al. (2005); Kestioglou et al. (2005); Lolos et al. (1994); Inan et al. (2003); Adhoum et al. (2004)
	Οξειδωτικές και προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι	Οζονόλυση, υγρή οξείδωση, φωτόλυση O_3/H_2O_2, φωτοκατάλυση	Απομάκρυνση 40-60% COD με απλές οξειδωτικές συνθήκες	Απομάκρυνση 85% COD με συνδυασμό μεθόδων	Gernjak et al. (2003); Mantzavinos et al. (1996, 1997); Benitez et al. (1999) Chatzisymeon et al. (2009a, b)
Βιολογικές	Αναερόβιες διεργασίες	Διάλυση, προσθήκη θρεπτικών ρύθμιση της αλκαλικότητας	Απομάκρυνση 60-80% COD για 2-5 μέρες επώαση	Απομάκρυνση 90% COD για 25 μέρες επώαση	Sabah et al. (2005); Ammary et al. (2005); Azbar et al. (2009a, b)
	Αερόβιες διεργασίες	Βιοφίλμ, ενεργοποιημένη ύλη	Απομάκρυνση 55-75% COD για λίγες μέρες επώαση	Απομάκρυνση 80% COD για περισσότερες μέρες	Velioĝlou et al. (1992); Benitez et al (1997); El Hajjouji et al. (2007)
	Ανάμιξη και χώνεψη	Μαζί με άλλα αγρο-βιομηχανικά απόβλητα	Απομάκρυνση 75-90% COD	Ρύθμιση pH και θρεπτικών μ τον συνδυασμό	Marques et al. (1998, 2001); Azbar et al. (2008)
Συνδυασμός	Οξειδωτικές-βιολογικές διεργασίες	Πραγματοποιούνται 2-3 μέθοδοι στη σειρά	Απομάκρυνση φαινολών μέχρι 75% και COD από 80 έως 99%	Υψηλό κόστος για τον συνδυασμό διεργασιών	Drouiche et al. (2004); Bressan et al. (2004); Beccari et al. (2009); Justino et al. (2010)

1.7. Διεργασίες παραγωγής προϊόντων από τα απόβλητα ελαιουργείου

Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες στρέφονται στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων από τα απόβλητα ώστε να αποσβέσουν το κόστος της απαιτούμενης επεξεργασίας τους. Πιο συγκεκριμένα, τα απόβλητα χρησιμοποιούνται είτε ως υπόστρωμα ανάπτυξης μικροοργανισμών για την παραγωγή εδαφο-βελτιωτικών, βιο-προϊόντων και ζωοτροφών, είτε ως φθηνή πηγή συστατικών που η ανάκτησή τους αποδίδει υψηλή προστιθέμενη αξία ή χρήσιμα θρεπτικά συστατικά.

Στον **Πίνακα 1.4** παρουσιάζεται μια σύνοψη προτεινόμενων διεργασιών που απαντώνται στη βιβλιογραφία. Η παραγωγή εδαφο-βελτιωτικών γίνεται με τις βιολογικές διεργασίες της λιπασματοποίησης και της κομποστοποίησης, κατόπιν ανάμειξης των αποβλήτων με άλλα οικιακά ή αγρο-βιομηχανικά απόβλητα. Επίσης, τα βιο-προϊόντα περιλαμβάνουν τα βιοπολυμερή, το βιοαέριο, την αιθανόλη, μικροβιακούς πολυσακχαρίτες (π.χ. ξανθάνες), τα πολύ-υδροξυ-αλκανίδια (PHA) και τα βιο-απορρυπαντικά. Τα βιο-προϊόντα παράγονται κατόπιν ανάπτυξης κατάλληλων μικροοργανισμών στα απόβλητα που συνήθως χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα. Τα παραγόμενα προϊόντα ανακτώνται με διάφορους τρόπους, π.χ. η αιθανόλη με απόσταξη.

Τα πιο δημοφιλή συστατικά προστιθέμενης αξίας των αποβλήτων είναι οι φαινόλες (π.χ. απλές φαινολικές ενώσεις, τανίνες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες κ.ά.), ενώ πρόσφατα έχουν μελετηθεί και οι εδώδιμες ίνες (π.χ. πηκτίνη). Οι διεργασίες ανάκτησης φαινολών περιλαμβάνουν συνήθως ένα στάδιο συμπύκνωσης των αποβλήτων (π.χ. θερμική συμπύκνωση, υπερδιήθηση ή λυοφυλίωση) και κατόπιν διαδοχικές εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη ή υδρο-αλκοολικά διαλύματα). Άλλες πρακτικές που εφαρμόζονται είναι η προσρόφηση σε ρητίνη και οι μεμβράνες υγρών γαλακτωμάτων. Οι διαδικασίες αυτές στοχεύουν είτε στην ανάκτηση μίας συγκεκριμένης φαινόλης (π.χ. της υδροξυ-τυροσόλης) σε καθαρή μορφή, είτε στην ανάκτηση πολλών φαινολών μαζί σε ένα ακατέργαστο προϊόν. Σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση παίζουν το pH, ο τύπος του διαλύτη και η αναλογία αυτού προς το υπόστρωμα (απόβλητα).

Πίνακας 1.4. Διεργασίες παραγωγής προϊόντων και ανάκτησης συστατικών από τα απόβλητα ελαιουργείων.

Προϊόντα	**Διεργασία**	**Περιγραφή**	**Παρατηρήσεις**	**Αναφορές**
Εδαφο-βελτιωτικά	Βιο-λίπανση	Βακτήρια (Azotobacter) βιοαποδομούν φαινόλες, σάκχαρα και οργανικά οξέα δημιουργώντας αζωτούχες ενώσεις και N_2	Προϋπόθεση για το λίπασμα αποτελεί να περιέχει θρεπτικά συστατικά και να μην περιέχει φυτο-τοξικές ενώσεις (φαινόλες)	Ramos-Cormenzana et al. (1995); Chatjipavlidis et al. (1996)
	Κομποστοποίηση	Ελεγχόμενη αερόβια βιολογική αποδόμηση μαζί με άλλα αγρο-βιομηχανικά απόβλητα	Απαιτούνται τουλάχιστον 2 μήνες	Tomati et al. (1996); Paredes et al. (2001); Sánchez-Arias et al. (2008)
Βιο-προϊόντα	Παραγωγή Βιο-πολυμερών	Παραγωγή εξο-πολυσακχαριτών και πολύ-υδροξυ-αλκανιδίων (PHA) από συγκεκριμένες καλλιέργειες μικροοργανισμών	Πολυσακχαρίτες (pullulan, xanthan) με καλές ρεολογικές ιδιότητες και PHA για βιο-διασπώμενα πλαστικά	Ramos- Cormenzana et al., 1995; Lopez et al. (1996; 2001); Gonzalez-Lopez et al. (1996)
	Παραγωγή βιο-απορρυπαντικών	Χρησιμοποιούνται καλλιέργειες *Pseudomonas* sp. που παράγουν ραμνο-λιπίδια	Ακολουθεί διάλυση των αποβλήτων και προσθήκη $NaNO_3$	Mercadè et al. (1993); Mercadè & Manresa (1994)
	Παραγωγή βιοαερίου	Αέριο CH_3OH/CH_4 με αναερόβια ζύμωση των οργανικών (μέχρι 80%). Θεωρητική απόδοση ίση με 37 m^3 CH_3OH /m^3 αποβλήτων	Η πραγματική απόδοση είναι πολύ μικρότερη εξαιτίας της τοξικότητας των φαινολών	Fiestas Ros de Ursinos & Borja-Padilla (1996); Gelegenis et al. (2007); Dareioti et al. (2009)
	Παραγωγή αιθανόλης	Μετατροπή των περιεχόμενων πολυσακχαριτών και των απλών σακχάρων σε αιθανόλη	Η ανάκτηση της παραγώμενης αιθανόλης γίνεται απόσταξη	Massadeh & Modallal (2008); Haagensen et al. (2009)
Ζωοτροφές	Μεταποίηση συστατικών	Ξήρανση και χημική επεξεργασία με $NaOH$-NH_3 με στόχο την μετατροπή σε εύπεπτο υπόστρωμα	Απαιτείται μείωση της συγκέντρωσης καλίου και φαινολών	Alcaide & Nefzaoui (1996)
Συστατικά προστιθέμενης αξίας	Ανάκτηση εδώδιμων ινών (π.χ. πηκτίνη)	Ανακτώνται το υπόλειμμα που είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και κατόπιν διαχωρίζεται η πηκτίνη από τα υπόλοιπα πολυμερή	Πηκτίνη με καλές ιδιότητες ζελοποίησης, προτεινόμενο υποκατάστατο λίπους σε κεφτέδες	Cardoso et al. (2003a, b); Tornberg &Galanakis (2008); Galanakis et al. (2010c)
	Ανάκτηση αντιοξειδωτικών (φαινόλες, τανίνες, φλαβονοειδή, ανθοκυανιδίνες κ.ά)	Προ-επεξεργασία με τεχνολογία μεμβρανών. Κατόπιν ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες ή προσρόφηση σε ρητίνες/ ενεργό άνθρακα/επιφανειο-δραστικά ή με μεμβράνες υγρού γαλακτώματος	Σημαντικό ρόλο παίζουν το pH, ο τύπος του διαλύτη, η αναλογία διαλύτη προς αποβλήτων και ο αριθμός των σταδίων για την ανάκτηση και τον καθαρισμό των αντιοξειδωτικών	Visioli et al. (1999); Allouche et al. (2004); Reis et al. (2006); De Leonardis et al. (2009); Al-Malah et al. (2000);Galiatsatou et al. (2002); Gortzi et al. (2008)

Από την άλλη, η παραλαβή των εδώδιμων ινών περιλαμβάνει την απομόνωση του αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος και κατόπιν διαδοχικά στάδια εκχύλισης-ανάκτησης των ινών από τα άλλα κατακρημνισμένα πολυμερή. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναπτύχθηκε μια μέθοδος (WO2008/082343) ταυτόχρονης ανάκτησης φαινολών και πηκτίνης από τα απόβλητα ελιαουργείου σε δύο διαφορετικά προϊόντα (Tornberg & Galanakis, 2008).

Οι εδώδιμες ίνες και οι φαινόλες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την τεχνολογία τροφίμων εξαιτίας των λειτουργικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, στα επόμενα δύο Κεφάλαια γίνεται μια εκτενής αναφορά σε αυτές (στο 2^{ο} και στο 3^{ο}, αντίστοιχα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΔΩΔΙΜΕΣ ΙΝΕΣ

2.1. Ορισμός και σύνθεση

Σύμφωνα με τον ορισμό τους, οι εδώδιμες ίνες είναι τα εδώδιμα μέρη των φυτών με ανάλογους πολυσακχαρίτες τα οποία είναι ανθεκτικά στην πέψη και στην προσρόφησή τους στο λεπτό έντερο, αλλά ζυμώνονται μερικώς ή ολικώς στο παχύ έντερο του ανθρώπου (AACC, 2001). Οι ίνες αποτελούν ένα συνδυασμό χημικά ετερογενών συστατικών που συνθέτονται σε μία δομή και όχι μια καθορισμένη ομάδα χημικών ενώσεων (Asp, 1996). Τα συστατικά των ινών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριους χημικούς τύπους (**Πίνακας 2.1**): (α) πολυσακχαρίτες και (β) λιγνίνες (Jimènez et al., 2000).

Οι πολυσακχαρίτες περιέχουν την κυτταρίνη και μια κατηγορία ενώσεων (ημικυτταρίνες, πηκτίνες, μυκιλάσες, κόμμεα, πολυσακχαρίτες φυκών) που ονομάζεται «μη κυτταρινούχοι πολυσακχαρίτες». Η κυτταρίνη είναι το πιο άφθονο μακρομόριο στη φύση και από στερεοχημικής σκοπιάς είναι το *β*-ισομερές του αμύλου, δηλαδή περιέχει ~10,000 μόρια Glc που συνδέονται σε μια ευθεία αλυσίδα με δεσμούς *β*-1,4). Είναι αδιάλυτη σε πυκνά διαλύματα βάσεων, αλλά διαλυτή σε πυκνά διαλύματα βάσεων. Οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες διαφόρων στερεοχημικών δομών που συνδέονται με την κυτταρίνη με δεσμούς υδρογόνου και διαλύονται σε αραιή βάση κατόπιν της απομάκρυνσης των υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών (Waldron et al., 2003; Bengtsson, 2009). Οι τελευταίοι απαρτίζονται κυρίως από τις πηκτίνες, τα πιο σύνθετα μακρομόρια της φύσης, τα οποία αποτελούνται από μονοσακχαρίτες (μέχρι 17) που συνδέονται με >20 διαφορετικούς δεσμούς (Ridley et al., 2001; O'Neill et al., 2004). Οι ημικυτταρίνες, οι πηκτίνες και η κυτταρίνη ονομάζονται «δομικοί πολυσακχαρίτες» γιατί είναι συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών (Heredia et al., 1995). Οι υπόλοιποι πολυσακχαρίτες (π.χ. μυκιλάσες, κόμμεα) συντίθενται από φυτικά εκκριτικά κύτταρα και έχουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, π.χ. ως σταθεροποιητές. Οι λιγνίνες δεν είναι πολυσακχαρίτες, αλλά σύνθετα πολυμερή που περιέχουν ~40 μονάδες οξυγονωμένων φαινυλ-προπανίων (McDougal et al., 1996).

Πίνακας 2.1: Χημική ταξινόμηση των συστατικών των εδώδιμων ινών.

Συστατικά εδώδιμων ινών	**Χημική σύνθεση δομικής μονάδας**		**Περιγραφή**	**Αναφορές**
	Κύρια αλυσίδα	**Πλευρική αλυσίδα**		
Πολυσακχαρίτες				
Κυτταρίνη	Γλυκόζη (Glc)	—	Κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αδιάλυτη σε διαλύματα π. βάσρων, διαλυτή σε διαλύματα π. οξέων	Kay et al. (1982); Kamide et al. (1984); Sato et al. (2003)
Ημικυτταρίνες	Ξυλόζη (Xyl) Μαννόζη (Man) Γαλακτόζη (GalA) Γλυκόζη (Glc)	Αραβινόζη (Ara) Γαλακτόζη (Gal) Γλυκουρονικό οξύ	Πολυσακχαρίτες κυτταρικών τοιχωμάτων με διακλαδώσεις σακχάρων. Διαφοροποιήσεις στο βαθμό διακλάδωσης και στην περιεκτικότητα γλυκουρονικού οξέος. Διαλυτοί σε αραιά αλκάλεα	Kay et al. (1982); Schneeman (1986); Olson et al. (1987)
Πηκτίνες	Γαλακτουρονικό οξύ (GalA)	Ραμνόζη (Rha) Αραβινόζη (Ara) Ξυλόζη (Xyl) Φουκόζη (Fuc)	Συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων με διαφορετικές συστάσεις μεθυλ-εστέρων. Υδατοδιαλυτό στο νερό με ιδιότητες ζελοποίησης	Olson et al. (1987); May (1990); Asp (1996) Coenen (2007)
Μυκιλάσες	Γαλακτόζη (Gal)- μαννόζη (Man) Γλυκόζη (Glc) – μαννόζη (Man) Αραβινόζη (Ara0– ξυλόζη (Xyl) Γαλακτουρονικό οξύ (GalA) – ραμνόζη (Rha)	Γαλακτόζη (Gal)	Συνθέτονται από τα φυτικά εκκριτικά κύτταρα, προστατεύουν το κουκούτσι από την ξηρασία. Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητικός παράγοντας (π.χ. guar)	Kay et al. (1982); Asp. (1996) Balyan et al. (2001)
Κόμμεα	Γαλακτόζη (Gal) Γλυκουρονικό οξύ – μαννόζη (Man) Γαλακτουρονικό οξύ (GalA) – ραμνόζη (Rha)	Ξυλόζη (Xyl) Φουκόζη (Fuc) Γαλακτόζη (Gal)	Έκκριση σε σημεία τραυματισμού των φυτών από εκκριτικά κύτταρα. Εφαρμογές στα τρόφιμα και την φαρμακοβιομηχανία, π.χ. Κόμμι Caraya	Lamb (1981); Schneeman (1986); Anderson (1989)
Πολυσακχαρίτες φυκών	Μαννόζη (Man) Ξυλόζη (Xyl) Γλυκουρονικό οξύ Γλυκόζη (Glc)	Γαλακτόζη (Gal)	Περιέχουν γλυκουρονικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις και θειικές ομάδες. Εφαρμογές στα τρόφιμα και την φαρμακοβιομηχανία, π.χ. καραγενάνη, άγαρ	Evans et al. (1973); Wright (1975); Anglo (1977); Santos & Doty (1983)
Λιγνίνες	Σιναπυλική αλκοόλη Κονιφερυλική αλκοόλη p-κουμαρυλική αλκοόλη	—	Μη-υδατανθρακικά συστατικά κυτταρικών τοιχωμάτων. Αδιάλυτο σε 72% H_2SO_4. Δεν διασπώνται από τα βακτήρια	Nedeltschewa et al. 1977); Schneeman (1986)

Από τα διάφορα συστατικά των ινών, οι πηκτίνες παρουσιάζουν το μεγαλύτερο στερεοχημικό ενδιαφέρον. Ο βασικός μονοσακχαρίτης των πηκτινών είναι το γαλακτουρονικό οξύ (GalA) που περιέχει μία καρβοξυλομάδα που ενίοτε είναι εστεροποιημένη με ένα μόριο μεθανόλης (Kay, 1982). Το ποσοστό των εστεροποιημένων μορίων GalA σε σχέση με το συνολικό αριθμό μορίων GalA της πηκτίνης ονομάζεται «βαθμός μεθυλίωσης» (BM) αυτής. Το πιο διαδεδομένο κλάσμα πηκτινών στα κυτταρικά τοιχώματα (κατά 60%) είναι οι «ομογαλακτουρονάνες» που αποτελούνται από ευθείες αλυσίδες GalA οι οποίες συνδέονται με δεσμούς *α*-1,4 (O'Neill et al., 1990). Άλλα διαδεδομένα κλάσματα πηκτινών είναι οι «ραμνογαλακτουρονάνες», δηλαδή αλυσίδες διμερών μορίων Rha και GalA που συνδέονται με δεσμούς *α*-1,4 (Albersheim et al., 1996; McNeil et al., 1980), και οι «αραβινάνες», δηλαδή μονομερή Ara που συνδέονται με δεσμούς *α*-1,5 στην κύρια αλυσίδα και με δεσμούς *α*-1,2 ή *α*-1,3 σε πλευρικές αλυσίδες (Carpita & Gibeaut, 1993; Beldman et al., 1997; Mohnen, 1999). Η δομή των πηκτινών ακολουθεί συνήθως με δύο μοντέλα: (α) «λείες και διακλαδισμένες περιοχές» και (β) «αλυσίδα ραμνογαλακτουρονάνης». Στο πρώτο μοντέλο, η πηκτίνη αποτελείται από λείες περιοχές ομογαλακτουρονάνης που συνδέονται με διακλαδισμένες αλυσίδες ραμνογαλακτουρονάνης (Schols & Voragen, 1996). Στο δεύτερο μοντέλο, η ραμνογαλακτουρονάνη αποτελεί την βασική αλυσίδα και η ομογαλακτουρονάνη συνδέεται πλευρικά σε αυτήν (Schols et al., 2009).

2.2. Ιδιότητες

Τα συστατικά των ινών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε υδατοδιαλυτά (πηκτίνες, κόμμεα, μυκιλάσες) και σε μη υδατοδιαλυτά (κυτταρίνες, λιγνίνες, μερικές ημικυτταρίνες) (Schneeman, 1986; Grigelmo-Miguel et al., 1999a). Η αναλογία αυτών στη δομή των ινών επηρεάζει την αντίστοιχη διαλυτότητά τους στο νερό και συνακόλουθα καθορίζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (Figuerola et al., 2005). Οι διαλυτές ίνες μπορούν να δημιουργήσουν ζελατινώδες (πηκτίνες, καραγεννάνες) ή πηκτικό (κόμμι ξανθάνης, κάποιες ημικυτταρίνες) πλέγμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες και με αυτό τον τρόπο να δεσμεύσουν το νερό (Olson et al., 1987). Η δυνατότητα αυτή συνεισφέρει στη σταθεροποίηση της υφής τροφίμων και γαλακτωμάτων μέσω της τροποποίησης των ρεολογικών τους ιδιοτήτων (Burkus & Temeli, 1999). Έτσι, οι διαλυτές ίνες χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητικοί παράγοντες σε γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. τυριά, γιαούρτια, παγωτά) γιατί προσδίδουν ελαστικότητα (Rodríguez et al., 2006; Staffolo et al., 2007; Soukoulis et al., 2009) ή ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα κρέατος (π.χ. λουκάνικα) γιατί αυξάνουν την απόδοση μαγειρέματος μέσω της συγκράτησης νερού (Bengtsson, 2009). Οι πηκτίνες χρησιμοποιούνται και στη φαρμακοβιομηχανία εξαιτίας της ικανότητάς τους να διαφοροποιούν την επιφάνεια ιατρικών υλικών (Morra et al., 2002; Schols et al., 2009). Από την άλλη μεριά, οι αδιάλυτες ίνες έχουν υγροσκοπικές ιδιότητες, δηλαδή διογκώνονται και προσροφούν νερό μέχρι 20 φορές το βάρος τους (Thebaudin et al., 1997). Οι εφαρμογές τους επεκτήνονται σε μπισκότα και προϊόντα αρτοποιίας με στόχο την αύξηση του όγκου αυτών και την μείωση του θερμιδικού τους περιεχομένου (Ang &

Miller, 1991; Arora & Camire, 1994). Εξάλλου, χρησιμοποιούνται ως δομικοί παράγοντες σε «σνακ» για την μείωση του χρόνου ξήρανσης αυτών (Seetharaman et al., 1994).

Σε σχέση με τις επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, οι αδιάλυτες ίνες αυξάνουν τη λειτουργία του εντέρου και μειώνουν το χρόνο πέψης (Staniforth et al., 1991), ενώ οι διαλυτές ίνες αποδομούνται πλήρως από την μικροχλωρίδα του υπογαστρίου και έτσι δεν επηρεάζουν τη λειτουργία του (Van Dokkum et al., 1988). Σύμφωνα με καλά τεκμηριωμένες μελέτες, η υψηλή κατανάλωση ινών (στο σύνολο τους) προκαλεί ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Beecher, 1999; Jiménez-Escribano et al., 2001). Για παράδειγμα, οι ίνες επηρεάζουν την προσρόφηση λιπών παρεμποδίζοντας την παγκρεατική λιπάση που συμμετέχει στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Ταυτόχρονα, η προσρόφηση αλάτων και οξέων της χολής μαζί με τις ίνες μειώνει τα επίπεδα της χοληστερίνης στον όρο του αίματος (Dunaif & Schneeman, 1981; Gallaher et al., 1992; Glore et al., 1994). Επιπλέον οι ίνες επηρεάζουν τόσο τον μεταβολισμό όσο και την βιοδιαθεσιμότητα των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να συνιστάται στη διατροφή των διαβητικών ασθενών (Stephens & Cummings, 1980; LeBlanc et al., 1991). Τέλος, διάφορες αναφορές υπάρχουν για τον προστατευτικό ρόλο των ινών έναντι συγκεκριμένων μορφών καρκίνου, π.χ. παχέος εντέρου και στήθους (Burkitt 1973; Willet et al., 1990; 1992, Howe et al., 1992).

2.3. Προέλευση

Η πλειονότητα των ινών βρίσκεται στους φυτικούς ιστούς (δημητριακά, λαχανικά, φρούτα) και μια τυπική σύσταση αυτών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.2**. Τα δημητριακά περιέχουν κατά βάση αδιάλυτες ίνες (10-27 φορές περισσότερες από τις διαλυτές) ενώ ο φλοιός βρώμης αποτελεί την πιο πλούσια πηγή αυτών (84 g/100 g ξηρού βάρους). Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν περισσότερες υδατοδιαλυτές ίνες σε σχέση με τα δημητριακά. Για παράδειγμα τα καρότα, τα πορτοκάλια και τα μήλα έχουν πολύ μικρότερες αναλογίες αδιάλυτων προς διαλυτές ίνες (1-3,5). Εξάλλου, τα μήλα και η τα πορτοκάλια αποτελούν τις πιο δημοφιλείς πρώτες ύλες για την ανάκτηση πηκτινών (May, 1990). Άλλες πηγές όπως οι πατάτες και τα ζαχαρότευτλα περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα ινών (66 και 75 g/100 g ξηρού βάρους, αντίστοιχα), το ένα τρίτο των οποίων είναι υδατοδιαλυτές. Κατά την επεξεργασία των φρούτων και των λαχανικών προκύπτουν διάφορα παραπροϊόντα, τα οποία αποτελούν φτηνά υποστρώματα για την ανάκτηση ινών (Schieber et al., 2001; Moure et al., 2001). Τυπικά παραδείγματα αποτελούν τα απόβλητα των χυμών πορτοκαλιού (Viouda-Martos et al., 2009), οι φλούδες και η πούλπα πορτοκαλιού (Aravantinos-Zafiris et al., 1994; de Santana and Gasparetto, 2009; Lopez et al., 2010) και μάνγκο (Ajila et al., 2010), φλούδες σόγιας (Olguin et al., 2010), το κέλυφος του ανανά, η σάρκα σταφυλιών και φρούτων guava (Larrauri, 1996; 1997; 1999), παραπροϊόντα χυμών μήλων, καρότων και πιο πρόσφατα των σπαραγγιών (McKee & Latner, 2000; Chantaro et al. 2008; Fuentes-Alventosa et al., 2009).

Πίνακας 2.2. Εδώδιμες ίνες δημητριακών λαχανικών, φρούτων και αγροβιομηχανικών αποβλήτων.

Πηγή Προέλευσης	Εδώδιμες ίνες (g/100 g*)			Αδ/Δ**	Αναφορά
	Ολικές	Αδιάλυτες	Διαλυτές		
Πίτουρα σιταριού	54	49	5	9,8	Claye et al. (1996)
Πίτουρα ρυζιού	51	47	4	12,8	Claye et al. (1996)
Φλούδα βρώμης	84	81	3	27,0	Frølich & Nyman (1988)
Ζαχαρότευτλο	75	50	25	2,0	Michel et al. (1988)
Κουνουπίδι	43	35	8	4,4	Femenia et al. (1997)
Σάρκα καρότου	63	32	31	1,0	Chau et al. (2004)
Αγκινάρα	59	45	14	3,2	Grigelmo-Miguel & Martin-Belloso (1999a)
Σπαράγγι	49	39	10	3,9	Redondo-Cuenca et al. (1997)
Πατάτα	66	44	22	2,0	Obeirne & Flynn (1975)
Ελαιόκαρπος	18	14	4	3,5	Guillen et al. (1992)
Μήλο	63	49	14	3,5	Claye et al. (1996)
Πορτοκάλι	38	24	14	1,8	Grigelmo-Miguel & Martin-Belloso (1998)
Λεμόνι	68	62	6	5,3	Figuerola et al. (2005)
Σταφύλι	59	56	3	24,4	Laufenberg et al. (2003)
Σάρκα αχλαδιού	44	36	8	4,5	Martín-Cabrejas (1995)
Σάρκα ροδάκινου	54	35	19	1,9	Pagan et al. (2001)

* επί ξηρού βάρους

** αναλογία αδιαλύτων προς διαλυτών ινών

2.4. Εδώδιμες ίνες ελαιόκαρπου και αποβλήτων ελαιουργείου

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2.2**, η περιεκτικότητα του ελαιόκαρπου σε ίνες είναι σχετικά χαμηλή (18% ανά ξηρού βάρους) εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες πηγές. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων ελαίου και νερού στη σάρκα (βλ. Ενότητα 1.5). Το κουκούτσι (πυρήνας) αποτελείται κατά βάση από μη υδατοδιαλυτές ίνες πλούσιες σε Glc, κυτταρίνη και λιγνίνες (Guillén et al., 1992; Coimbra et al., 1995b). Η σάρκα περιέχει κυρίως υδατοδιαλυτές ίνες όπως πηκτίνες και ημικυτταρίνες (Coimbra et al. 1999).

Πιο συγκεκριμένα, τα κυτταρικά τοιχώματα της σάρκας του ελαιόκαρπου αποτελούνται κατά 1/3 από πηκτίνες πλούσιες σε αραβινόζη (Ara >80%) τις λεγόμενες αραβινάνες και Μ. Β. που ξεπερνά τα 400 kDa, και κατά 1/3 από γλυκοροξυλάνες-ξυλογλυκάνες (Coimbra et al., 1994; Jiménez, et al. 1994; Cardoso et al., 2010). Οι πηκτίνες του ελαιόκαρπου σχηματίζουν διμερή σύμπλοκα με το Ca^{2+}, ενώ το 11-19% αυτών παραμένει εγκλωβισμένο στην κυτταρίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων (Ferreira et al., 2006). Πηκτίνες ελαιόκαρπου που ανακτήθηκαν σε όξινο περιβάλλον αποτελούνται από >50% ομογαλακτουρονάνες και ραμνογαλακτουρονάνες (Gil-Serrano et al., 1986; 1988) ήταν από τους πρώτους που απομονώσαν ημικυτταρίνες και συγκεκριμένα ξυλάνες και όξινες ξυλογλυκάνες από τον ελαιόκαρπο.

Στη συνέχεια, οι Jiménez, et al. (1994) απομονώσαν μια ξυλογλυκάνη με Μ. Β. της τάξης των 260 kDa και άλλες ημικυτταρίνες όπως αραβινοξυλάνη (>400 kDa), γαλακτο-γλυκομαννάνες και γλυκορονο-αραβινοξυλάνες. Οι ξυλογλυκάνες συνδέονται με μόρια ξυλάνης ενώ άλλες συνδέονται με γλυκομαννάνες και έχουν Μ.Β. της τάξης των 2000 και 100 kDa (Coimbra et al., 1994; 1995a; Vierhuis et al. 2001a). Εξάλλου, οι

ξυλογλυκάνες περιέχουν πλευρικούς ολιγοσακχαρίτες πλούσιους σε Ara, ενώ ο ελαιόκαρπος περιέχει και γλυκοροξυλάνες με πλευρικούς ξυλο-ολισακχαρίτες (Vierhuis et al., 2001c; Reis et al., 2003).

Παρά την μικρή περιεκτικότητα, οι ίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και την υφή του ελαιόκαρπου (Fernández-Díez, 1979). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ελαιόκαρπου αυξάνεται η δραστικότητα ενζύμων όπως οι κυτταρινάσες, η πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ) και οι γλυκοσιδάσες (Heredia et al. 1990, 1993; Mínguez-Mosquera et al., 2002). Η δράση των ενζύμων επηρεάζει κυρίως τις περιεχόμενες πηκτίνες με αποτέλεσμα τη διαλυτοποίησή τους, τη μείωση των ομογαλακτουρανών, την απελευθέρωση τμημάτων από τις πλευρικές αλυσίδες των ραμνογαλακτουρανών, την απώλεια κλασμάτων Ara από αυτές και την αύξηση των διακλαδώσεων (Mafra et al., 2001; Jiménez et al., 2001b, Cardoso et al., 2007). Παράλληλα, με την ωρίμανση ο ελαιόκαρπος γίνεται πιο μαλακός εξαιτίας και της μερικής διαλυτοποίησης ημικυτταρινών και της μείωσης της κυτταρίνης (Georget et al., 2001; Jiménez et al. 2001a). Ωστόσο, οι Vierhuis et al., (2000) αναφέρουν ότι η σύνθεση των σακχάρων και η κατανομή του Μ. Β. των ξυλογλυκανών και ξυλανών δεν επηρεάζεται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ελαιόκαρπου.

Οι εδώδιμες ίνες του ελαιόκαρπου μεταφέρονται στα απόβλητα του ελαιουργείου, όπου η σύνθεση τους εξαρτάται άμεσα από την τεχνολογία εξαγωγής. Για παράδειγμα, τα απόνερα τριφασικών ελαιουργείων περιέχουν κομμάτια ελαιόπαστας και κατά συνέπεια πιο πολλές υδατοδιαλυτές ίνες, ενώ τα αντίστοιχα απόβλητα των διφασικών συμπεριλαμβάνουν και τον πυρήνα και έτσι περιέχουν πολλές μη υδατοδιαλυτές ίνες. Παρόλα αυτά, πηκτίνες έχουν ανακτηθεί και από τα δύο υποστρώματα. Έτσι, οι Arienzo & Capasso (2000) αναφέρουν ότι την ύπαρξη πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών της τάξης των 1-100 kDa στα απόβλητα τριφασικών ελαιουργείου, ενώ οι Vierhuis et al., (2003) αναφέρουν ότι οι περιεχόμενοι πολυσακχαρίτες είναι πλούσιοι σε Ara και Gal.

Οι Capasso et al. (2002) ανακτήσανε ένα πολυμερές υλικό από τα απόβλητα τριφασικού ελαιουργείου που αποτελείτο από ένα κλάσμα ελεύθερων πολυσακχαριτών και ένα κλάσμα πολυσακχαριτών δεσμευμένο ισχυρά με συστατικά πρωτεϊνών και μελαμίνης. Αυτό το μείγμα βρέθηκε ότι είναι ανάλογο των μυκιλάσων και κατόπιν υδρόλυσής του έδωσε την εξής σύνθεση μονοσακχαριτών: Gal (14-15%), Glc (4-4,5%), Ara (10,5-11%), Xyl (1-1,2%), Rha και GalA (4,7-5,1%). Από την άλλη, οι Cardoso et al. (2003a) ανακτήσανε πηκτίνες από απόβλητα διφασικού ελαιουργείου με βαθμό μεθυλίωσης (ΒΜ) 43% και αναλογία σακχάρων: 48 mol GalA, 31 mol Ara και 7 mol Glc/100 mol. Επιπλέον, η ίδια ερευνητική ομάδα αναφέρει σε προηγούμενη μελέτη την ύπαρξη μιας αραβινόνης (97% Ara και 3% GalA) με Μ.Β. των 8,4 kDa στα απόβλητα αυτού του τύπου (Cardoso et al., 2002).

2.5. Ανάκτηση εδώδιμων ινών και πηκτινών

Η ανάκτηση πολύτιμων συστατικών όπως ίνες, πρωτεΐνες ή φαινόλες, πραγματοποιείται με ήπιες διεργασίες ώστε να διατηρείται ο βιολογικός τους χαρακτήρας. Οι απαιτούμενες διεργασίες περιλαμβάνουν συνήθως τρία στάδια: (α) προετοιμασία του υποστρώματος, (β) διαχωρισμός των μακρομορίων (π.χ. ίνες, πηκτίνες, πρωτεΐνες) από τα μικρο-μόρια (π.χ. φαινόλες, σάκχαρα, ιόντα) και (γ) εκχύλιση-ταξινόμηση των μακρομορίων σε ποικίλα κλάσματα με τη χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων και εξευγενισμός αυτών. Το στάδιο της προετοιμασίας σχετίζεται με τη φύση του υποστρώματος. Οι φλούδες εσπεριδοειδών και οι σάρκες σταφυλιών χρειάζονται τεμαχισμό (Aravantinos-Zafiris et al., 1994), η πούλπα καρπών (π.χ. καρότο, τομάτα, πατάτα, μήλο) απαιτεί ομογενοποίηση (Bayod 2008; Bengtsson 2009), ο ελαιόκαρπος τεμαχισμό ή/και ξήρανση (Marsilio et al., 1996; Jiménez et al., 1997; Mafra et al., 2006b; Cardoso et al., 2008), ενώ τα απόβλητα ελαιουργείου συμπύκνωση (Tornberg & Galanakis, 2008) ή λυοφιλίωση (Vierhuis et al., 2001b). Ο διαχωρισμός μακρο- και μικρο-μορίων πραγματοποιείται είτε πλένοντας το υπόστρωμα με χλιαρό (Aravantinos-Zafiris et al., 1994) ή ζεστό νερό (Larrauri, 1999), είτε με την προσθήκη αιθανόλης και την κατακρήμνιση του αδιάλυτου υπολείμματος πλούσιου σε μακρομόρια (Heredia et al. 1996; Qi et al., 2000). Τέλος, ο διαχωρισμός των ινών σε κλάσματα πραγματοποιείται με τη χρήση οξέων, βάσεων ή/και χηλικών αντιδραστηρίων (Oreopoulou & Tzia, 2006).

Ανάλογα με τη διεργασία εκχύλισης, το κλάσμα των ινών έχει διαφορετική σύνθεση και συνακόλουθα διαφορετικές τεχνολογικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, η ανάκτηση ημικυτταρινών από τον ελαιόκαρπο ευνοείται σε αλκαλικό περιβάλλον. Όμως, η εκχύλιση με NaOH ή CDTA προκαλούν υδρόλυση των πρωτο-πηκτινών και διαλυτοποίηση των πηκτινών, μέσω της διάσπασης σε μικρότερα μακρομόρια, π.χ. από 400 σε 70 kDa (Araujo et al., 1994; Jiménez et al., 1995b; 1996; Coimbra et al., 1996; Mafra et al., 2006a). Εξάλλου, ο βαθμός διακλάδωσης των ανακτημένων πηκτινών και η αναλογία Ara:GalA αυξάνεται αυξανομένης της ισχύος του διαλύματος εκχύλισης (Huisman et al. 1996). Οι πηκτίνες έχουν πολύ καλές ιδιότητες ζελοποίησης (Ενότητα 2.2) και για αυτό το λόγο η ανάκτησή τους παρουσιάζει ξεχωριστό ενδιαφέρον.

Η απομόνωση των πηκτινών πραγματοποιείται συνήθως με εκχύλιση παρουσία ενός οξέος (HCl, HNO_3), διήθηση των στερεών και κατακρήμνιση των πηκτινών παρουσία αιθανόλης ή διάλυματος $AlCl_3$. Ο εξευγενισμός περιλαμβάνει την επεξεργασία του εκχυλίσματος με όξινα ή αλκαλικά αντιδραστήρια και ουδέτερη αλκοόλη. Στη συνέχεια, το προϊόν ξηραίνεται με ψεκασμό στους 50 ^{o}C. Η ανάκτηση ευνοείται από συνθήκες χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας (π.χ. 80 ^{o}C) ανάλογα με το υπόστρωμα (Aravantinos-Zafiris & Oreopoulou, 1992; Pagan et al., 1999). Οι Cardoso et al. (2003a) ανέκτησαν πηκτίνες από απόβλητα διφασικού ελαιουργείου και μελετήσαν τις ιδιότητες ζελοποίησης. Το ακατέργαστο εκχύλισμα ανακτήθηκε από το αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη και κατόπιν εξευγενίστηκε. Το υπόλειμμα αντιστοιχούσε στο 31% ξ. β.

αποβλήτων και περιείχε 47 g ίνες /100 g. Το ακατέργαστο εκχύλισμα ανακτήθηκε σε ποσοστό 3,7 g/100 g υπολείμματος και το εξευγενισμένο σε 51,2 g/100 g ακατέργαστου. Η ανακτηθείσα πηκτίνη ζελοποιήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GalA-Ca^{2+} σε σχέση με την εμπορική χαμηλής μεθυλίωσης πορτοκαλο-πηκτίνη. Εξάλλου, τα ζελέ χαρακτηρίστηκαν από χαμηλότερους ιξωδο-ελαστικούς συντελεστές για παρόμοιες συγκεντρώσεις (GalA-Ca^{2+}).

2.6. Μεταβολές πηκτινών κατά την επεξεργασία τους

Η επεξεργασία των πηκτινών και οι διεργασίες εκχύλισης-εξευγενισμού μεταβάλλουν τη σύνθεση και τη δομή αυτών με συνέπεια την αλλοίωση των χαρακτηριστικών τους και σε κάποιες περιπτώσεις τη βελτίωση των ιδιοτήτων ζελοποίησης. Οι αντιδράσεις των πηκτινών που πραγματοποιούνται είναι οι εξής: (α) αμινόλυση, (β) υδρόλυση των μεθυλεστέρων (από-εστεροποίηση), (γ) υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών (διάσπαση), (δ) αποκαρβοξύλιωση των ελεύθερων καρβοξυλομάδων και (ε) *β*-αποδόμηση. Η τελευταία πραγματοποιείται πολύ αργά ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ οι άλλες είναι πιο γρήγορες (Kratchanova et al., 2004).

Οι αντιδράσεις μπορεί να είναι ενζυμικές ή μη ενζυμικές και συνήθως επιταχύνονται κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων (Fraeye et al., 2007). Η ενζυμική διάσπαση των πηκτινών πραγματοποιείται από τη δράση πηκτινασών, όπως η πολυγαλακτουρονάση, η πηκτινο-λυάση και η ΠΜΕ (Stoforos et al.., 2002; Vu et al., 2006). Η από-εστεροποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χημικό τρόπο (π.χ. με οξύ, βάση ή αμμωνία), αλλά η αντίδραση εξελίσσεται τυχαία και μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση των πηκτινών. Η διατήρηση του υψηλού Μ. Β. των πηκτινών και η μείωση του Β. Μ. αυτών είναι σημαντικές παράμετροι για τη βελτίωση των ιδιοτήτων ζελοποίησης και για αυτό η ενζυμική από-εστεροποίηση είναι μια καλή εναλλακτική λύση (Hotchkiss et al., 2002).

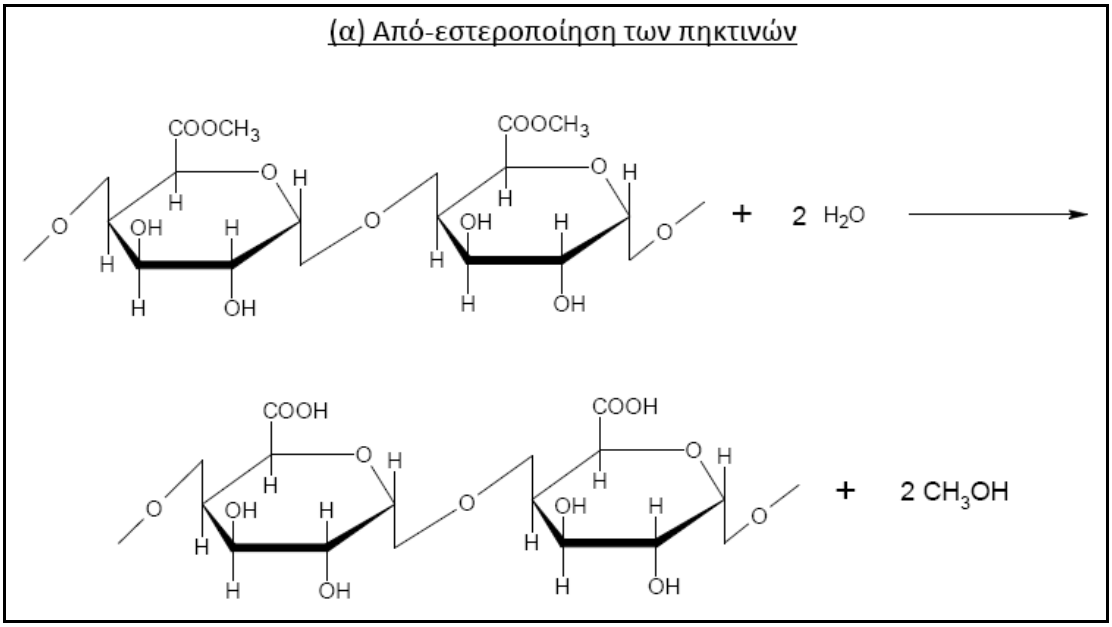
Εξάλλου, όταν η χημική από-εστεροποίηση πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον και υψηλές θερμοκρασίες, συνοδεύεται από *β*-αποδόμηση (Sila et al., 2006). Η τελευταία αντίδραση απαιτεί την μεθυλίωση του C-6, ώστε ο C-5 να δράσει σαν οξύ δίνοντας ένα H^+ στον C-4 και να διασπάσει τον α-1,4 δεσμό των μορίων GalA όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1β** (Kejbets & Pilnik, 1974). Η αύξηση της θερμοκρασίας και του pH ευνοούν τη *β*-αποδόμηση και την από-εστεροποίηση, αντίστοιχα (Renard & Thibault 1986). Αντίθετα, ο χαμηλός Β. Μ. των πηκτινών ευνοεί την υδρόλυση (διάσπαση) σε όξινο περιβάλλον (Krall & McFeeters 1998; Fraeye et al., 2007).

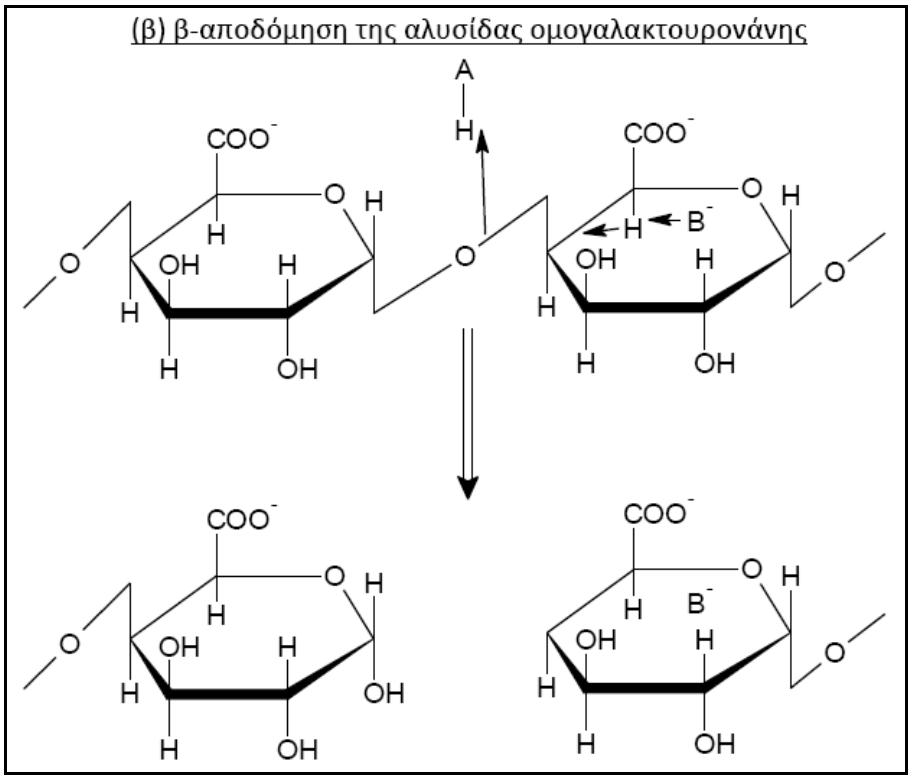
2.7. Πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ)

Η ΠΜΕ ή «πηκτινο-υδρολάση» (EC 3.1.1.11) που έχει βρεθεί σε διάφορα φυτά, μύκητες και βακτήρια, καταλύει την υδρόλυση των μεθυλεστερών του GalA (**Σχήμα 2.1α**) και μειώνει το Β. Μ. των πηκτινών (Rexova-Benkova & Markovic, 1976; Puri et al., 1982; Basak & Ramaswamy, 1996). Η δράση της ΠΜΕ εξαρτάται από τη φύση της. Έτσι, η ΠΜΕ των μυκήτων δρα ταυτόχρονα σε όλες τις αλυσίδες και η απο-μεθυλίωση εξελίσσεται τυχαία, ενώ τα αντίστοιχα ένζυμα των φυτών δρουν κατά μήκους μιας αλυσίδας, δημιουργώντας συνεχή τμήματα από-μεθυλιωμένων μορίων GalA που βελτιώνουν τις ιδιότητες ζελοποίησης της πηκτίνης (Jayani et al., 2005; Slavov et al., 2009). Η ΠΜΕ έχουν απομονωθεί από διάφορες φυτικές πηγές όπως ντομάτες (Delincee & Radola, 1970), μήλα (King et al., 1991), κεράσια (Alonso et al., 1995; 1997), μπανάνες (Nguyen et al., 2002), γκρέιπφρουτ (Cameron & Grohmann, 1995), καρότα, ροδάκινα (Tijskens et al., 1997; 1999) κ.ά. Για τον ελαιόκαρπο δεν υπάρχουν αναφορές, αλλά η ύπαρξη πηκτινών σε αυτόν συνοδεύεται θεωρητικά από πηκτινάσες. Οι φυτικές ΠΜΕ συνδέονται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις πάνω στα κυτταρικά τοιχώματα και η διαλυτοποίησή τους απαιτεί ισχυρά ιονικά διαλύματα (Giovane et al., 1993).

Η δράση της ΠΜΕ επηρεάζει τόσο τη δομή των πηκτινών όσο και την ποιότητα των τροφίμων. Οι πηκτίνες χαμηλής μεθυλίωσης σχηματίζουν σταυρωτά σύμπλοκα με τα ιόντα Ca^{2+} με αποτέλεσμα τη δημιουργία θολερότητας σε χυμούς και συμπυκνώματα (Laratta et al., 1995). Ο ίδιος μηχανισμός ευνοεί τη σταθεροποίηση της δομής των φρούτων κατόπιν προσθήκης ιόντων Ca^{2+}, με ή χωρίς την παρουσία εξωγενών ΠΜΕ (Loconti & Kertesz, 1941; Grant et al., 1973; Fraeye et al., 2010). Η δραστικότητα της ΠΜΕ εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, την παρουσία αναστολέων ή ιόντων και τη θερμοκρασία. Όλες οι φυτικές ΠΜΕ έχουν βέλτιστο pH δράσης μεταξύ 7 και 9, ενώ έχουν αξιοσημείωτη αντοχή στους χημικούς παράγοντες (π.χ. δι-ισοπροπυλ-φθορο-φωσφορικές ενώσεις) με εξαίρεση τις τανίνες.

Η ενεργοποίηση της ΠΜΕ από την παρουσία ιόντων σχετίζεται πιο πολύ με τις αλληλεπιδράσεις αυτών με το υπόστρωμα, παρά με το ίδιο το ένζυμο (Rexova-Benkova & Markovic, 1976; Alonso et al., 1997). Η θερμοκρασία παίζει το πιο σημαντικό ρόλο στη δράση της ΠΜΕ. Σύμφωνα με τη θεωρία των Bartolome & Hoff (1972), η επεξεργασία των υποστρωμάτων σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. 40-60) προκαλεί απώλεια της επιλεκτικής διαπερατότητας των μεμβρανών, διάχυση κατιόντων στα κυτταρικά τοιχώματα και αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} γύρω από το ένζυμο, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του. Από την άλλη, η υψηλή θερμοκρασία (π.χ. κατά την παστερίωση στους 90 ^{o}C για 1 min) μπορεί να απενεργοποιήσει την ΠΜΕ εξαιτίας της μετουσίωσής της (Basak & Ramaswamy, 1996). Οι Tijskens et al. (1997) αναφέρουν ότι η ΠΜΕ της πατάτας μπορεί να απενεργοποιηθεί πλήρως σε κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (60-90 ^{o}C). Η απενεργοποίηση της ΠΜΕ περιγράφεται με κινητική πρώτης τάξης σύμφωνα με τους Collet et al., (2005), ενώ άλλοι ερευνητές προτείνουν διαφορετικά μοντέλα κινητικής (Marshall et al., 1985; Chen & Wu, 1998).





Σχήμα 2.1: (α) Η από-εστεροποίηση και (β) η *β*-αποδόμηση των πηκτινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Φαινόλες

3.1. Περιγραφή

Στην οργανική χημεία ο όρος «**φαινόλες**» αναφέρεται σε μια κατηγορία χημικών ενώσεων που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (-OH). Η πιο απλή ένωση είναι η «φαινόλη» (C_6H_5OH). Οι ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον δύο –OH ονομάζονται «πολυφαινόλες». Πολλές φορές υπάρχει σύγχυση μεταξύ των δύο παραπάνω όρων, που προκύπτει από την ανάγκη έκφρασης των διαφορετικών ομάδων φαινολικών ενώσεων με ένα όρο. Για αυτό το λόγο στη βιβλιογραφία υπάρχουν και οι όροι πολυφαινόλες ή βιοφαινόλες (Boskou, 2006; Obied et al., 2005b). Οι περισσότερες φαινόλες έχουν τον ίδιο μεταβολικό προπομπό, την φαινυλαλανίνη, η οποία απο-αμινώνεται σε κινναμικό οξύ (Amarowicz et al., 2009). Αυτό το συστατικό εισέρχεται στη φαινυλο-προπανοειδή οδό και μπορεί να σχηματιστεί τις εξής κατηγορίες φυτικών φαινολών:

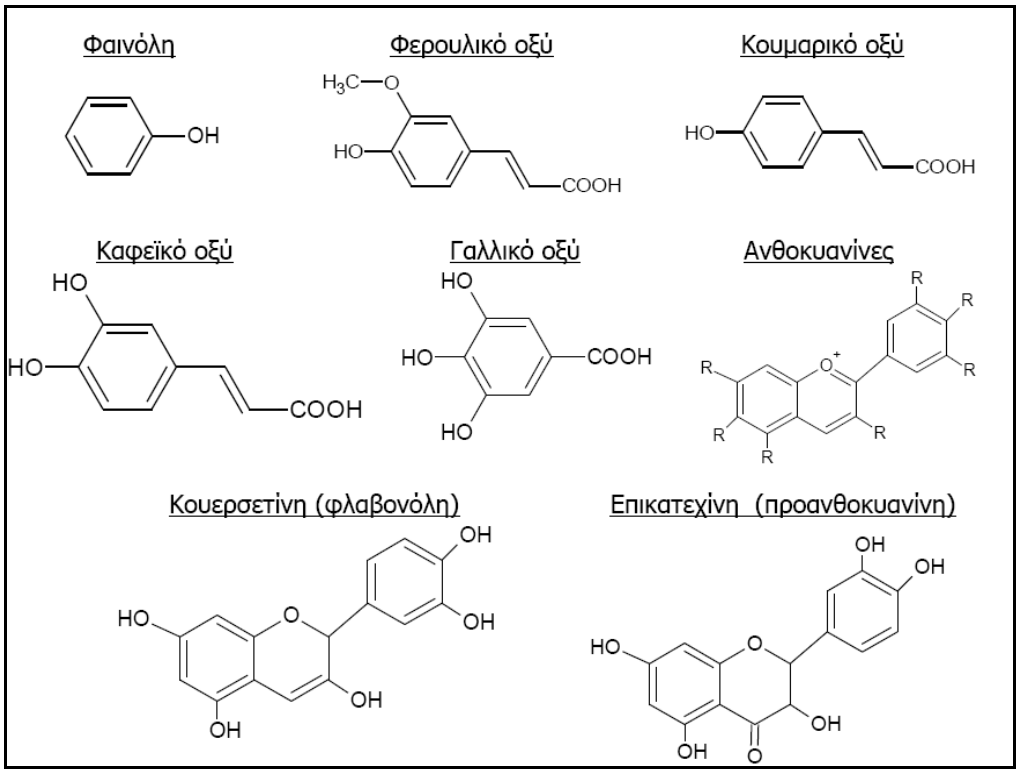
- Παράγωγα του υδροξυ –βενζοϊκου και –κινναμικού οξέος
- Υδροξυ-κουμαρίνες
- Φλαβονοειδή
- Ταννίνες
- Λιγνάνες

Στο **Σχήμα 3.1** παρουσιάζονται μερικά τυπικά παραδείγματα φαινολών. Τα υδροξυκινναμικά οξέα (C_6-C_3) βρίσκονται συνήθως εστεροποιημένα με υδατάνθρακες εστέρων και τα πιο κοινά παράγωγά τους είναι το p-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και χλωρογονικό οξύ. Το φερουλικό οξύ συνδέεται με εστερικούς δεσμούς στις ημικυτταρίνες (εδώδιμες ίνες). Τα υδροξυ-βενζοϊκά οξέα (C_6-C_3 και C_6-C_1) βρίσκονται κυρίως ως γλυκοζίτες και προέρχονται από τα υδροξυκινναμικά οξέα μέσω μιας οδού ανάλογης της *β*-οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Τα πιο γνωστά παράγωγά τους είναι το γαλλικό και κηκιδικό οξύ. Τα γλυκοζίδια του cis-o-κουμαρικού οξέος είναι ο πρόδρομος των υδροξυ-κουμαρινών (C_6-C_3). Τα φλαβονοειδή (C_6-C_3-C_6) προέρχονται από την συμπύκνωση ενεργοποιημένων μορίων υδροξυκινναμικού οξέος με τρία μόρια μηλικού

οξέος. Η μεταβολική οδός περιλαμβάνει την μετατροπή των φλαβονονών σε φλαβόνες και κατόπιν σε φλαβονόλες. Οι τελευταίες μετατρέπονται σε φλαβανοδιόλες και ανθοκυανιδίνες. Οι φλαβονόνες προσδίδουν πικρή γεύση, ενώ οι ανθοκυανιδίνες χαρακτηριστικό κόκκινο, ιώδες ή κυανό χρώμα στα τρόφιμα. Οι ταννίνες περιλαμβάνουν δύο κύριες υποκατηγορίες: (α) εστέρες με διάφορους υδροξυ-υποκαταστάτες (π.χ. εστέρες του γαλλικού και του εξα-υδροξυ-διφαινικού οξέος) και (β) προανθοκυανιδίνες ($(C_6\text{-}C_3\text{-}C_6)_n$). Οι ταννίνες έχουν μοριακό βάρος (Μ.Β.) από 500 έως 3,000, είναι γενικώς διαλυτές στο νερό και προσδίδουν στυφή γεύση στα τρόφιμα. Οι προανθοκυανιδίνες είναι οι άχρωμοι πρόδρομοι των ανθοκυανιδινών και είναι υδατο-διαλυτές μέχρι 7000 Μ.Β. (π.χ. 20 μονάδες φλαβονολών). Τέλος, οι λιγνάνες ($(C_6\text{-}C_3\text{-}C_3\text{-}C_6)_n$) προκύπτουν από τον πολυμερισμό διαφόρων φαινολών παρουσία H_2O_2 (Belitz et al., 1986).

3.2. Προέλευση

Οι φαινόλες βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και συγκεκριμένα στους φυτικούς ιστούς που τις βιο-συνθέτουν. Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν τις κύριες πηγές προέλευσης, ενώ έπονται τα φύλλα, δημητριακά, βότανα, καρυκεύματα, πίτουρα κ.ά. Οι φαινόλες από τις πρωτογενείς πηγές μεταφέρονται στα δευτερογενή προϊόντα (χυμούς, οίνους, τσάι, ροφήματα κλπ) και στα αντίστοιχα παραπροϊόντα. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.1**, ο ελαιόκαρπος και συνακόλουθα η επιτραπέζια ελιά, το ελαιόλαδο αλλά και τα απόβλητα ελαιουργείου αποτελούν σημαντικές πηγές προέλευσης φυτικών φαινολών.



Σχήμα 3.1: Τυπικά παραδείγματα φαινολών

Πίνακας 3.1. Περιεχόμενο και περιεκτικότητα φαινολών διαφόρων πηγών προέλευσης, των δευτερογενών προϊόντων και των αντίστοιχων παραπροϊόντων.

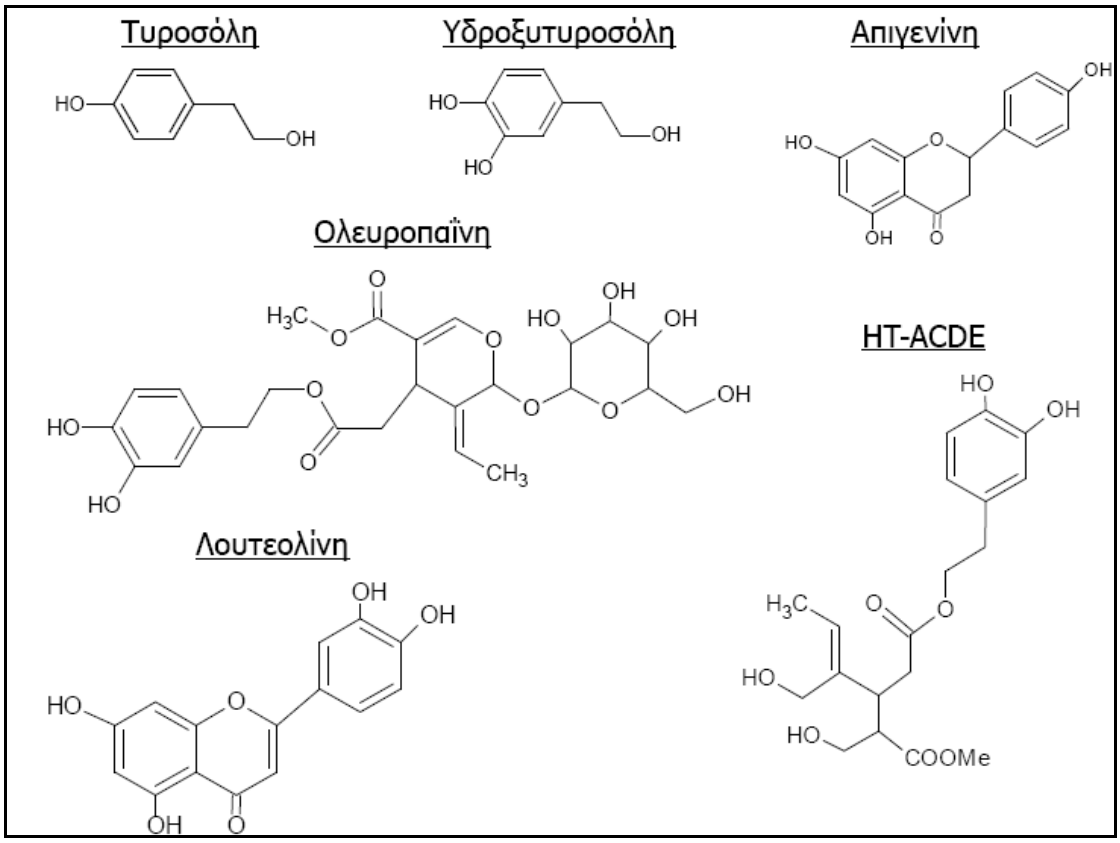
Πρώτη ύλη	Φαινόλες	Προέλευση	Περιεκτικότητα	Αναφορές
Πορτοκάλι	Φλαβανόνες, φλαβόνες, φαινολικά οξέα	Χυμός	0,1 g φλαβονόνες/L 0,2-0,6 g εσπεριδίνης/L	Benavente-Garcia et al. (1997); Boskou (2006); Beecher (2003); Manach et al. (2004)
		Υπόλειμμα φλούδας	1,8 g ολικών φαινολών/kg 2,4 g εσπεριδίνης/kg	Fernandez-Lopez et al. (2004); Braddock (1995); Manthey & Grohmann (1996)
Λεμόνι	Φλαβανόνες, φλαβόνες, φαινολικά οξέα	Χυμός	0,05-0,3 g φλαβονόνες/kg	Manach et al. (2004)
		Υπόλειμμα φλούδας	1,9 g εσπεριδίνης & εριοκιτρίνης /kg 13,3 g φλαβονοειδή/kg	Coll et al. (1998); Fernandez-Lopez et al. (2004)
Μήλο	Φλαβονόλες, φαινολικά οξέα	Καρπός	0,05-0,6 υδροξυκινναμικό οξύ/L 0,02-0,12 g φλαβονοειδή/L	Lu & Foo (2000); Manach et al. (2004); Hoffman-Ribani et al. (2009)
		Χυμός	0,7 g πολυφαινόλες/L	Oszmianski & Wojdyło (2007)
		Υπόλειμμα πούλπας	2,4 g/kg	Schieber et al. (2003)
Σταφύλι	Φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες	Καρπός	0,3-7,5 g ανθοκυανιδίνες/kg 0,015-0,04 g φλαβονόλες/kg	Manach et al. (2004)
		Υπόλειμμα πούλπας	13,8 g πολυφαινόλες/kg	Louli et al. (2004)
Πατάτα	Φαινολικά οξέα	Καρπός	0,1-0,2 g υδροξυκινναμικά οξέα/kg	Manach et al. (2004)
		Υπόλειμμα πούλπας	0,48 g ολικές φαινόλες/kg	Rodriguez de Sotillo et al. (1994); Singh & Rajini (2004)
Κρεμμύδι	Φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα	Καρπός Υπολείμματα φλούδας	0,35-1,2 g φλαβονοειδή/kg 0,26 φλαβονόλες/kg	Manach et al. (2004) Suh et al. (1999), Chu et al. (2000)
Ελαιόκαρπος	Φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, σερεκενοειδή, φλαβονοειδή	Επιτραπέζια ελιά	1,0-1,5 g ολικές φαινόλες/kg	Boskou et al. (2006)
		Ελαιόλαδο	0,05-1 g ολικές φαινόλες/kg 0,35 g πολικές φαινόλες/kg	Boskou (2008); Romani et al. (2007)
		Απόβλητα ελαιουργείου	13-40 g ολικές φαινόλες/kg	Paredes et al. (1999); Sierra et al. (2001)

3.3. Φαινόλες αποβλήτων ελαιουργείου

Οι φαινόλες των αποβλήτων ελαιουργείου μπορεί να υπάρχουν από τη φύση στο ελαιόκαρπο ή να δημιουργήθηκαν κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου (Obied et al., 2005b). Πιο συγκεκριμένα, ο ελαιόκαρπος περιέχει φαινολικά οξέα και αλκοόλες, σερεκενοειδή και φλαβονοειδή, ενώ μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 50 ενώσεις στα απόβλητα ελαιουργείου και 40 στο ελαιόλαδο (Obied et al., 2007a; Boskou, 2008). Τα φαινολικά οξέα των αποβλήτων περιλαμβάνουν τα *o*- και *p*-κουμαρικό, κινναμικό, καφεϊκό, φερουλικό, γαλλικό, σιναπικό, χλωρογονικό, πρωτοκατεχικό, συρινγκικό, βερατρικό, βανιλλικό και ολεανολικό οξύ (παραδείγματα στο **Σχήμα 3.1**) (Balice & Cera, 1984; Mulinacci et al., 2001; Fiorentino et al., 2003; D'Alessandro et al., 2005). Οι πιο χαρακτηριστικές φαινολικές αλκοόλες είναι η τυροσόλη και η υδροξυ-τυροσόλη (DellaGreca et al., 2004; Knupp et al., 1996).

Άλλες φαινόλες που έχουν βρεθεί στα απόβλητα είναι οι ολευρωπαΐνη, διμεθυλ-ολευρωπαΐνη, βερμπασκοσίδη, κατεχόλη, 4-μεθυλκατεχόλη, *p*-κρεσόλη και ρεσορκινόλη (Capasso et al., 1992b; Vinciguerra, et al., 1997; Japon-Lujan & de Castro, 2007). Τα απόβλητα περιέχουν επίσης μεγάλες ποσότητες σερεκενοειδών παραγώγων όπως η δι-αλδεΰδη 3,4-διυροξυ-φαινυλ-αιθανολ-ελενολικό οξέος που δεσμεύεται στην υδροξυ-τυρόσολη. Οι δύο τελευταίες προκύπτουν από την υδρόλυση της ολευρωπαΐνης και της διμεθυλ-ολευρωπαΐνης κατά την διαδικασία άλεσης του καρπού (Lo Scalzo & Scarpati, 1993; Servili et al., 1999). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν και άλλα δύο σερεκενοειδή παράγωγα: η ακυκλο-διυδροξυ-ελενολολα-υδροξυτυροσόλη (HT-ACDE) και η κομσελογοσίδη (Obied et al., 2007c; 2009). Τέλος, τα κυριότερα φλαβονοειδή που έχουν ανιχνευθεί είναι τα εξης: απιγενίνη, εσπεριδίνη, κυανιδινοφλαβόνη, ανθοκυανίνη, λουτεολίνη και κερσετίνη κ.ά. (Visioli et al., 1999; De Marco et al., 2006; Obied et al. 2005b; 2007b). Οι χημικοί τύποι αντιπροσωπευτικών φαινολικών αλκοολών, σερεκενοϊδών και φλαβονοειδών των αποβλήτων παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.2**.

Ο προσδιορισμός των «ολικών φαινολών» των αποβλήτων ελαιουργείου πραγματοποιείται συνήθως με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau (μείγμα Na_2MoO_4, Na_2WO_4, H_3PO_4) (Folin & Ciocalteau, 1927). Η μέθοδος βασίζεται στην ήπια αλκαλική υδρόλυση ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων που οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες-οξέα και δημιουργείται ένα σύμπλεγμα Mo-W χαρακτηριστικού κυανού χρώματος που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, κατόπιν ρύθμισης της αλκαλικότητας με Na_2CO_3 (Singleton & Rossi, 1965). Με την αντίδραση Folin-Ciocalteau γίνεται προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ των μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών. Η μέθοδος είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται ευρέως ως μια γενική εκτίμηση.



Σχήμα 3.2: Χημικοί τύποι μερικών φαινολών των αποβλήτων ελαιουργείου.

Το μειονέκτημα της είναι ότι δεν είναι τόσο εκλεκτική αφού θεωρητικώς κάθε αναγωγικό συστατικό (π.χ. ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες, καροτένια, ανάγοντα σάκχαρα) μπορεί να δημιουργήσει θετικό σφάλμα στον προσδιορισμό (Escarpa & González, 2001). Άλλες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορίζουν τις φαινόλες των οίνων και των αποβλήτων σε κλάσματα, π.χ. ο-διφαινόλες, παράγωγα του υδροξυ-κινναμικού οξέος, φλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες (Obied et al., 2005a; Mateos et al., 2001; Mazza et al., 1999). Η ανάλυση των συστατικών των φαινολών πραγματοποιείται κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους όπως HPLC (Servili et al., 1999; Visioli et al., 1999), GC (Ryan & Robarts, 1998; Ceccon et al., 2001), GC/MS (DellaGreca et al., 2004), LC/MS (Visioli et al., 2002; Caruso et al., 2000).

3.4. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Πέρα από τις οργανοληπτικές ιδιότητες (Ενότητα 3.1), το μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαινόλες απορρέει από τις αντιοξειδωτικές δράσεις και συνακόλουθα στις ευεργετικές επιπτώσεις τους στον άνθρωπο και την τεχνολογία τροφίμων (Γκέκας & Μπαλτά, 2005). Οι επιδράσεις στηρίζονται στην υπόθεση ότι οι φαινόλες προλαμβάνουν τις αρνητικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό (Boskou et al., 2008). Για παράδειγμα, οι φαινόλες του ελαιόκαρπου έχουν αποδεδειγμένη δράση έναντι φθορών του DNA μικροοργανισμών (Ziogas et al., 2010). Εξάλλου, οι επιστημονικές αποδείξεις για το ρόλο των φαινολών στην προτεινόμενη Μεσογειακή διατροφή ολοένα και

πληθαίνουν (Saura-Calixto & Goñi, 2006). Οι επιδράσεις των φαινολών εξαρτώνται από την ποσότητα κατανάλωσης και τη βιο-διαθεσιμότητά τους στον ανθρώπινο οργανισμό (Tapiero et al., 2002). Για παράδειγμα, το 48% των διατροφικών φαινολών απορροφάται στο λεπτό έντερο, το 42% αυτών στο παχύ έντερο και το 10 % παραμένει αχώνευτο (Manach et al., 2004; Saura-Calixto et al., 2007). Το τεχνολογικό ενδιαφέρον αφορά τη σταθεροποίηση εξευγενισμένων ελαίων έναντι της αυτοξείδωσής τους (Sheabar et al., 1988).

Πιο συγκεκριμένα, μία από τις πιο γνωστές αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολών των αποβλήτων ελαιουργείου είναι η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Η ικανότητα αυτή μελετάται με την αδρανοποίηση διαφόρων «ριζο-γενών» ενώσεων όπως π.χ. του αντιδραστηρίου $DPPH^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Lesage-Meesen et al., 2001; Suárez et al., 2009) ή του $ABTS^{+}$ (2,2΄-asinobis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic) diammonium salt) (De Marco et al., 2007) και του ανιόντος υπεροξειδίου (Visioli et al., 1999; Leger et al., 2000). Άλλες αντιοξειδωτικές δράσεις είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης του υποχλωριώδους οξέος (HClO) (Visioli et al., 2002; Firuzi et al., 2003) και η άμεση φασματοφωτομετρική μέθοδος μέτρησης της «συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (δύναμης)» που χρησιμοποιεί τις αντιοξειδωτικές ουσίες ως αναγωγικά σώματα (Ferric Reducing/Antioxidant Power- FRAP) (Benzie & Strain, 1996; McDonald et al., 2001; Jiménez-Alvarez et al., 2008). Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των φαινολών έχουν μελετηθεί και σε βιολογικά συστήματα (*in vivo*). Για παράδειγμα, οι φαινόλες μπορούν να παρεμποδίσουν την οξείδωση των ανθρωπίνων λιπο-πρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low density lipoproteins-LDL) που σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρωση (Nardini et al., 1995; Visioli et al., 1995; 1999; Meyer et al., 1998). Εξάλλου, οι φαινόλες μπορούν περιορίσουν την οξείδωση-καταστροφή του DNA (Deiana et al., 1999; Quiles et al., 2002). Οι πιο βιο-δραστικές φαινόλες είναι η υδροξυτυροσόλη, η ολευρωπαΐνη και η τυροσόλη (Obied et al., 2005a). Η αντιοξειδωτική δράση της πρώτης έχει αποδειχτεί στο πλάσμα και το συκώτι αρουραίων (Visioli et al., 2001; Casalino et al., 2002), ενώ η καρδιο-προστατευτική της δράση σε ανθρώπινα κύτταρα (Leger et al., 2000). Από την άλλη μεριά, η καρδιο-προστατευτική δράση της ολευροπαΐνης έχει αποδειχθεί με μελέτες στην καρδιά αρουραίων (Ruiz-Gutierrez et al., 1995; Manna et al., 2004).

Σε κάθε περίπτωση, το αντιοξειδωτικό σύστημα των οργανισμών είναι πολύ περίπλοκο, με τα αντιοξειδωτικά να έχουν διαφορετικούς στόχους, μεγέθη και αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Γκέκας & Μπαλτά, 2005). Για αυτό το λόγο, η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών μετράται με την «**ολική αντιοξειδωτική ικανότητα**», η οποία συντίθεται από τις επιμέρους δράσεις. Ο προσδιορισμός των επιμέρους δράσεων δεν γίνεται άμεσα, αλλά μέσω των επιπτώσεων του αντιοξειδωτικού κατά τη διάρκεια ελέγχου μιας οξειδωτικής διεργασίας (Antonolovich et al., 2002). Έτσι, η συνήθης μεθοδολογία περιλαμβάνει την ανάκτηση των φαινολών και κατόπιν τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με δύο ή περισσότερες μεθόδους (Jiménez-Alvarez et al., 2008).

3.5. Ανάκτηση φυσικών φαινολών

Για την ανάκτηση αντιοξειδωτικών ουσιών από φυσικές πηγές πραγματοποιείται συνήθως με εκχύλιση με έναν ή περισσότερους οργανικούς διαλύτες, ενώ η απόδοση και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εξαρτάται σημαντικά από την πολικότητά τους (Oreopoulou & Tzia, 2006). Για παράδειγμα, η αιθανόλη παίζει συναγωνιστικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση των φαινολών, όπως έχει αποδειχτεί από τις επιπτώσεις κατανάλωσης οίνου στην ανθρώπινη υγεία κατά την διάρκεια των γευμάτων και όχι ενδιάμεσα αυτών (Trevisan et al., 2001). Σε σχέση με την απόδοση της εκχύλισης, μη πολικοί διαλύτες όπως το εξάνιο και ο πετρελαϊκός αιθέρας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάκτηση φαινολικών τερπενίων, ενώ ο διαιθυλαιθέρας είναι πολύ αποτελεσματικός στην ανάκτηση χαμηλού Μ.Β. φαινολικών ενώσεων και οξέων (Boskou, 2006). Όμως και πολικοί διαλύτες όπως τα υδρο-αλκοολικά μίγματα μπορούν να εκχυλίσουν φαινόλες μεγαλύτερου Μ.Β. και γλυκοσίδια με αποτέλεσμα να αυξάνουν την απόδοση ανάκτησης ολικών φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, μαζί με τις φαινόλες συχνά συν-έκχυλίζονται και μη επιθυμητά συστατικά με συνέπεια να απαιτείται επιπλέον καθαρισμός για την απομόνωση των αντιοξειδωτικών (Oreopoulou & Tzia, 2006).

Πιο συγκεκριμένα για τις φαινόλες των αποβλήτων ελαιουργείου, μια μεθοδολογία βασίζεται στην αφαίρεση των λιπών με εξάνιο και στην εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και απόδοση 50 mg ολικών φαινολών/100 g αποβλήτων (De Leonardis et al., 2007). Η μέθοδος έχει προταθεί προγενέστερα από τους Visioli et al. (1999), οι οποίοι διαχώρισαν περαιτέρω τις φαινόλες με στήλη Sephadex. Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα από τους Suárez et al. (2009) χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω μεθοδολογία εκχύλισης και κατόπιν εκχυλίστηκε περαιτέρω το στερεό υπόλειμμα με υδρο-αιθανολικό διάλυμα (20:80) και υψηλή πίεση (επιταχυνόμενη εκχύλιση). Στη συνέχεια οι φαινόλες από τα δύο εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με HPLC. Εξάλλου, οργανικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη, η ακετόνη, η προπανόλη και το ακετονιτρίλιο έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση φαινολών πριν το διαχωρισμό με HPLC. Έτσι, τα υδρο-μεθανολικά μίγματα παρουσίασαν την μεγαλύτερη απόδοση (> 1 g/kg) για 6 φαινόλες: γλυκοζίδιο της υδροξυτυροσόλης, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βερμπακοσίδη και παράγωγο της ολευρωπαΐνης (Obied et al., 2005a). Άλλοι οργανικοί διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των φαινολών είναι η αιθανόλη (Amro et al., 2002), ο αιθυλαιθέρας (Lesage-Meessen, et al., 2001), η βουτανόλη (Capasso et al., 1992a, b) και ο βουτυλ-μεθυλαιθέρας (Bianco et al., 2003). Ανάμεσα σε όλους τους παραπάνω διαλύτες, τα υδρο-μεθανολικά και κατόπιν τα υδρο-αιθανολικά μίγματα σε διάφορες αναλογίες αποτελούν τις πιο δημοφιλείς επιλογές (Romero et al., 2002).

Η υδροθερμική επεξεργασία είναι μια άλλη μέθοδος που εφήρμοσαν οι Felizón et al. (2000) για την ανάκτηση της υδροξυτυροσόλης (με ατμό) σε απόβλητα «τριφασικού τύπου». Η συγκεκριμένη διεργασία απελευθέρωσε την υδροξυτυροσόλη από άλλες ενώσεις όπως η ολευρωπαΐνη και η βερμπακοσίδη. Εξάλλου, η συγκέντρωση της υδρόξυτυροσολης μπορεί να αυξηθεί κατόπιν όξινης υδρόλυσης σερεκενοειδών

παραγώγων (Capasso et al., 1994). Η υδροθερμική μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε και για απόβλητα «διφασικού τύπου» και η εκτιμώμενη απόδοση σε υδροξυτυροσόλη ήταν 4-5 kg/1000 kg αποβλήτων με υγρασία 70%. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάκτησης ήταν 200-220 ^{o}C θερμοκρασία ατμού και προσθήκη θειικού οξέος μέχρι 1,0-1,5%. Υψηλότερη συγκέντρωση οξέος προκάλεσε αποδόμηση της υδροξυτυροσόλης (Fernández-Bolaños et al. 2002). Η υδροθερμική επεξεργασία έχει χρησιμοποιηθεί και για την απομόνωση της 3,4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκόλης από την ίδια πηγή προέλευσης (Rodríguez et al., 2009). Τέλος, οι Agalias et al. (2007) ανέκτησαν φαινόλες και συγκεκριμένα υδροξυτυροσόλη σε τρία στάδια: (α) με διαδοχικές διηθήσεις των στερεών (μέχρι 25 μm), (β) με αποχρωστικές και αποσμητικές προσροφητικές ρητίνες και (γ) ανάκτηση φαινολών με HPLC.

Οι παραπάνω τεχνολογίες είναι αρκετά ελπιδοφόρες, αφού υπόσχονται την ανάκτηση φυσικών φαινολών που μπορούν να αντικαταστήσουν τη σύνθεση αυτών. Για παράδειγμα, ο αριθμός των συνθετικών αντιοξειδωτικών που επιτρέπονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις Η.Π.Α. είναι πολύ μικρός εξαιτίας των λεπτομερών τοξικολογικών μελετών που απαιτούνται για την έγκριση τους (Schmidt & Pokorný, 2005). Αντίθετα, τα κριτήρια διάθεσης των φυσικών αντιοξειδωτικών δεν είναι τόσο αυστηρά, παρόλο που στηρίζονται σε υποθετικούς όρους. Πιο συγκεκριμένα, οι επιστήμονες ισχυρίζονται ότι η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών από τρόφιμα που καταναλώνονται για χιλιάδες χρόνια είναι σχετικά ασφαλής. Ο αντίλογος είναι ότι τα φυσικά αντιοξειδωτικά περιέχουν συστατικά που συν-εκχυλίζονται και για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την ασφάλειά τους (Pokorný & Korczak, 2001). Εξάλλου, η μεταποίηση και η αποθήκευση των φαινολών προκαλεί την οξείδωση, τον πολυμερισμό τους και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων η ασφάλεια των οποίων είναι ασαφής. Από την άλλη, αν τα φυσικά αντιοξειδωτικά εξευγενιστούν για να χρησιμοποιηθούν ως καθαρά συστατικά, τότε απαιτούνται οι ίδιες εξεζητημένες τοξικολογικές μελέτες με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά (Lindley, 1998; Pokorný, 2006; 2007). Σε κάθε περίπτωση, η ανάκτηση φαινολών από τα απόβλητα ελαιουργείου και η εφαρμογή αυτών ως φυσικά αντιοξειδωτικά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως π.χ. το κόστος παραγωγής, τις ενδεχόμενες εφαρμογές των ανακτημένων προϊόντων, την ασφάλεια τους, το κόστος μεταπώλησης και την αποδοχή των καταναλωτών.

Η τεχνολογία ανάκτησης θα πρέπει να τηρεί τα εξής κριτήρια:

- να είναι οικονομική,
- να περιλαμβάνει λίγα στάδια μεταποίησης,
- να χρησιμοποιεί ήπιες φυσικοχημικές διεργασίες,
- να χρησιμοποιεί «πράσινη χημεία» και μη τοξικά αντιδραστήρια,
- να παράγει ένα προϊόν με συγκεκριμένες προδιαγραφές και εφαρμογές,
- και τέλος να εξασφαλίζεται η συντήρηση του τελικού προϊόντος.

3.6. Πολυφαινολοξειδάσες

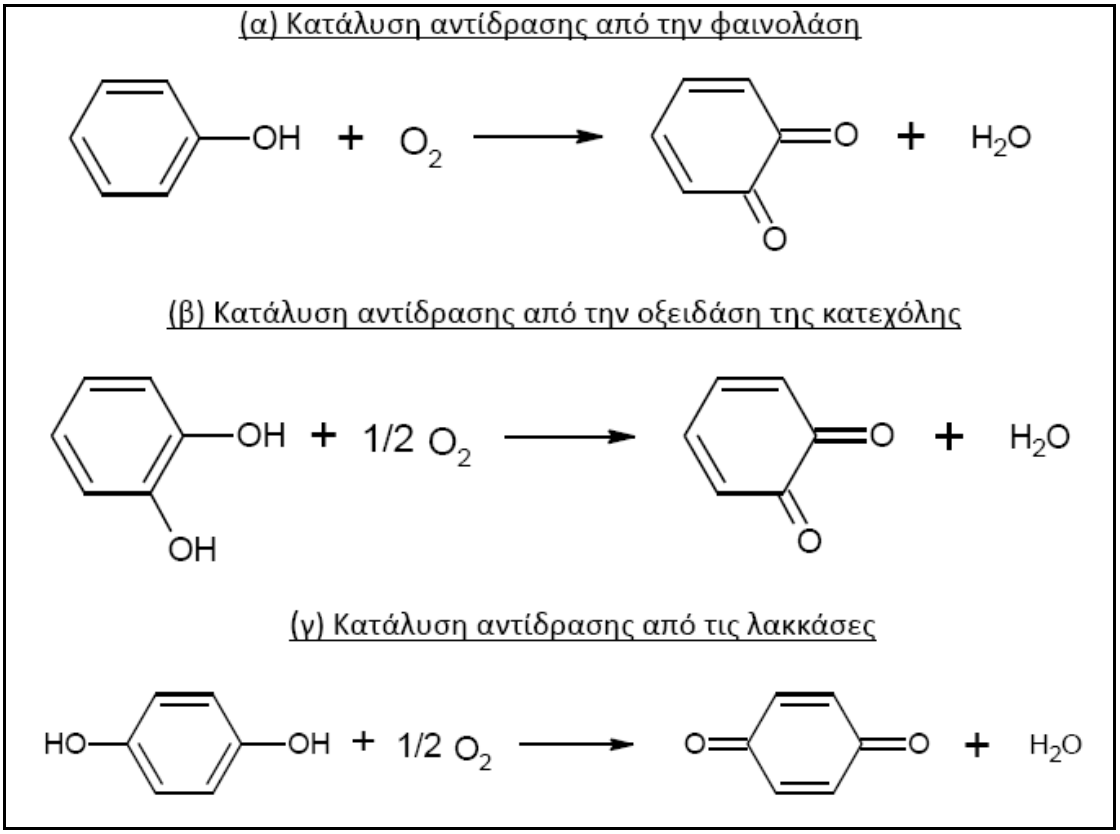
Οι πολυφαινολοξειδάσες (ΠΦΟς) περιλαμβάνουν κατά βάση δύο τύπους ενζύμων: (α) την ο-διφαινυλ-οξειδάση (οξειδάση της κατεχόλης, τυροσινάση, φαινολάση, πολυφαινολοξειδάση) (Ε.C. 1.14.18.1) και (β) τη *p*-διφαινολοξειδάση ή λακάση (Ε.C. 1.10.3.2). Και οι δύο τύποι ενζύμων είναι φαινολ-οξυγονο-οξειδοαναγωγάσες και καταλύουν διάφορα υποστρώματα ανάλογα με τις συνθήκες και τις μοριακές τους ιδιότητες (Burton, 1994; Yoruk & Marshall, 2003; Morozova et al., 2007). Οι ΠΦΟς είναι ένζυμα με χαλκό (Cu) και η αντίδραση οξείδωσης περιλαμβάνει μια αλλαγή του σθένους στο άτομο του Cu και αφαίρεση ηλεκτρονίων από το οξυγόνο (O_2). Οι κύριες αντιδράσεις των παραπάνω ενζύμων φαίνεται στο **Σχήμα 3.3**. Το άμεσο προϊόν της οξείδωσης των φαινολών είναι οι *ο*-κινόνες που στη συνέχεια μετατρέπονται με δευτερογενείς αντιδράσεις σε μελανίνες (Hearing & Himénez, 1987; Mayer & Harel, 1992; Widsten, & Kandelbauer, 2008).

Οι ΠΦΟς βρίσκονται σε αφθονία στους φυτικούς ιστούς και μικροοργανισμούς, ενώ συγκεκριμένα οι λακκάσες βρίσκονται μόνο σε κάποια στα φυτά (Mayer, 1987). Ο ελαιόκαρπος και τα απόβλητα ελαιουργείου περιέχουν ΠΦΟς (και λακκάσες) ως φυσικό επακόλουθο της μεγάλης συγκέντρωσης φαινολών (De Stefano & Sciancalepore, 1983; Sanjust et al., 1991). Έτσι, οι μέθοδοι ανάκτησης φαινολών από τα απόβλητα ελαιουργείου πρέπει να υπολογίζουν τη δράση των ΠΦΟς, η οποία ξεκινάει και εξελίσσεται από τη στιγμή συλλογής του ελαιόκαρπου (Bianco et al., 2003). Για παράδειγμα, ο ελαιόκαρπος αλλά και τα απόβλητα ελαιουργείου αλλάζουν χρώμα από σκούρο ιώδες σε καστανό εξαιτίας της οξείδωσης/πολυμερισμού των *ο*-διφαινόλων, διεργασίες που σχετίζονται άμεσα με την δράση των ΠΦΟ (Vasquez-Ronceco et al. 1974; Sciancalepore & Longone, 1984). Η διεργασία αυτή είναι ευρέως γνωστή ως «ενζυμική αμαύρωση» (Artes et al., 1998).

Όπως στην περίπτωση της ΠΜΕ, η δράση των ΠΦΟς εξαρτάται άμεσα από την ενεργοποίηση/απενεργοποίησή τους και η θερμική επεξεργασία αποτελεί τη πιο δημοφιλή μέθοδο ρύθμισης αυτής της βιοχημικής διεργασίας. Για παράδειγμα, η επεξεργασία σε μέτριες θερμοκρασίες (π.χ. μέχρι 50 ^{o}C) ενεργοποιεί τις ΠΦΟς σε διάφορα υποστρώματα όπως οι πατάτες (1 h στους 50 ^{o}C), οι αγκινάρες και οι μελιτζάνες (1 h στους 30 ^{o}C) (Yemenicioglou, 2002; Aydemir2004; Concellón et al., 2004). Αντίθετα, η θερμική επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. >75 ^{o}C) θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την απενεργοποίηση των ΠΦΟς και την αποφυγή της ενζυμικής αμαύρωσης (Golan-Goldhirsh et al., 1984; McEvily et al., 1992).

Ωστόσο, η επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να έχει άλλες αρνητικές συνέπειες για την ποιότητα του υποστρώματος (π.χ. φρούτα, χυμούς ή απόβλητα ελαιουργείου) όπως τη δημιουργία των αντιδράσεων Maillard (της λεγόμενης «μη-ενζυμικής αμαύρωσης») μεταξύ των αναγόντων σακχάρων και αζωτούχων ενώσεων (Martins et al., 2000; Gerrard 2006). Όλες οι παραπάνω παράμετροι θα πρέπει να εξετάζονται κατά τη διάρκεια ανάκτησης φαινολών αφού η δράση των ΠΦΟς μπορεί να

μειώσει την ποσότητα των φαινολών στα απόβλητα (Greco et al., 1999), ενώ η θερμική επεξεργασία μπορεί να επηρεάσει και άλλα συστατικά όπως οι πηκτίνες, οι πρωτεΐνες κλπ.



Σχήμα 3.3: Αντιδράσεις που καταλύονται από τις πολυφαινολοξειδάσες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

4.1. Περιγραφή

Ο όρος «φυσικοχημική διεργασία» χρησιμοποιείται ως ευρύτερος του όρου φυσική διεργασία, για να καλύψει τις διεργασίες «διαχωρισμού» στις οποίες λαμβάνουν χώρα και φαινόμενα χημικής φύσεως. Διαχωρισμοί ορίζονται οι διεργασίες κατά τις οποίες από ένα διάλυμα ή μίγμα λαμβάνονται δύο ή περισσότερα προϊόντα διαφορετικής σύστασης και φυσικών ιδιοτήτων (Γκέκας κ.ά., 2002).

Ένα τυπικό παράδειγμα φυσικοχημικής διεργασίας είναι η «εξάτμιση» ή αλλιώς η διεργασία μεταφοράς μάζας θερμότητας, μέσω της οποίας συμπυκνώνεται διάλυμα με ατμοποίηση της υγρής φάσεως (Καλφόγλου, 1979). Το προϊόν της εξάτμισης είναι συνήθως ένα συμπύκνωμα μεγάλου ιξώδους. Οι χημικές μεταβολές που επιτελούνται σε εν δυνάμει ευπαθή συστατικά (φαρμακευτικά προϊόντα και τρόφιμα) κατά τη διάρκεια της εξάτμισης, την κατατάσσουν από φυσική σε φυσικοχημική διεργασία.

Άλλα παραδείγματα είναι η προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, η εκλεκτική χημική προσρόφηση (π.χ. ιοντοεναλλαγή), η συσσωμάτωση με προσθήκη χημικών μέσων (κροκίδωση), η κατακρήμνιση, η δι-εξάτμιση, η εκχύλιση παρουσία οξέων ή βάσεων, η ωσμωτική αφυδάτωση και οι τεχνολογίες μεμβρανών (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001).

4.2. Κατακρήμνιση

Η κατακρήμνιση ή αλλιώς χημική καθίζηση είναι μια φυσικοχημική διεργασία που χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό μακρομορίων και μικρομορίων από ένα μέσο. Σκοπός της κατακρήμνισης είναι η μετατροπή διαλυμένων συστατικών σε αδιάλυτα και κατόπιν η καθίζηση και η απομάκρυνσή τους μέσω διήθησης (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001). Η διεργασία λαμβάνει χώρα παρουσία μιας προστιθέμενης ουσίας που μπορεί να είναι στερεό ή υγρό, π.χ. $AlCl_3$, $FeCl_3$, αλκοόλη, προπανόλη, ακετονιτρίλιο κλπ (Ihl et al., 1992; Ku et al., 2003; Bártová & Bárta, 2009). Κρίσιμη ιδιότητα για τη διεργασία της κατακρήμνισης είναι η διαλυτότητα των χημικών ενώσεων που περιέχονται στο μέσο. Το pH επηρεάζει άμεσα τη διαλυτότητα των συστατικών και εν τέλει την τελική

συγκέντρωση ενός διαλελυμένου συστατικού. Άλλος παράγοντας είναι η θερμοκρασία που επηρεάζει την ενέργεια ενεργοποιήσεως σχηματισμού σταθερών πυρήνων και κατακρήμνισης των (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001).

Η κατακρήμνιση μακρομορίων από υδατικό διάλυμα μπορεί να πραγματοποιηθεί με την βαθμιαία προσθήκη αλκοόλης επιτυγχάνοντας μέχρι πολύ υψηλή συγκέντρωση αυτής (π.χ. 85% κ.ό.). Σε αυτήν την περίπτωση, η καθίζηση εξελίσσεται εξαιτίας της αλλαγής του διαλύτη (π.χ. από νερό σε αιθανολο-υδατικό διάλυμα) και κατά συνέπεια της διαλυτότητας των μακρομορίων στο νέο υγρό μέσο.

Η αλκοολική κατακρήμνιση μακρομορίων έχει εφαρμοστεί ευρέως τα τελευταία 35 χρόνια, π.χ. στην απομόνωση πρωτεϊνών κατόπιν κατακρήμνισης του δεσοξυριβονουκλεϊκού (DNA) και ριβοζονουκλεϊνικού οξέος (RNA) (Bearden, 1974; Wilcockson, 1975), στην ανάκτηση πρωτεϊνών γάλακτος (Hewedi et al., 1985), στην απομόνωση πρωτεϊνών πλάσματος από το αίμα σφαγείων (Moure et al., 2003), στην κατακρήμνιση των ινών όπως κόμμι ξανθάνης (González et al., 1989), πηκτίνης (Qi et al., 2000), αραβινο-ξυλο-ολισακχαριτών (Swennen et al., 2005), λιγνίνης (Xu et al., 2007) και ημικυτταρινών (Peng et al., 2009).

Στην περίπτωση των ινών, η αλκοολική κατακρήμνιση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό αυτών από μικρότερα μόρια όπως τα ελεύθερα σάκχαρα που παραμένουν διαλυτά. Η παραπάνω διεργασία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό ινών και φαινολών, αφού οι φαινόλες είναι πολύ διαλυτές στις αλκοόλες. Εξάλλου, πολλές από τις φαινόλες που περιέχονται στα απόβλητα ελαιουργείου (π.χ πρωτοκατεχικό οξύ, καφεϊκό οξύ, τυροσόλη, υδροξυ-τυροσόλη και ολευρωπαΐνη) είναι θεωρητικώς πιο διαλυτές στην αιθανόλη σε σχέση με το νερό, όπως προβλέπεται από το μοντέλο Unifac και τον υπολογισμό των αντίστοιχων συντελεστών ενεργότητας σε υγρά διαλύματα (Τσάκωνα, 2010).

4.3. Εκχύλιση

Ο όρος «εκχύλιση» αναφέρεται στη διεργασία κατά την οποία ένα συστατικό στερεό ή υγρό, παραλαμβάνεται από ένα άλλο στερεό ή υγρό, χρησιμοποιώντας κατάλληλο διαλύτη (Καλφόγλου, 1979). Η εκχύλιση αποτελεί φυσική διεργασία, αλλά όπως και η εξάτμιση μπορεί να χαρακτηριστεί ως φυσικοχημική όταν περιλαμβάνει την ανάκτηση δομικά πολύπλοκων ενώσεων (π.χ. ινών), η σύσταση των οποίων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τους.

Τυπικά παραδείγματα διεργασιών εκχυλίσεως είναι η ανάκτηση σακχάρεως από σακχαρότευτλα και πυρηνέλαιου από τον ελαιοπυρήνα. Η μέθοδο της εκχύλισης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες εφαρμογές διαχωρισμών της βιομηχανίας τροφίμων, με κύρια την εκχύλιση στερεού- υγρού και δευτερευόντως την εκχύλιση υγρού- υγρού (Pinelo et al, 2006).

Στην εκχύλιση στερεού-υγρού, η συγκέντρωση κάθε συστατικού μέσα στο στερεό μίγμα αναπτύσσει μια ισορροπία με τη συγκέντρωση αυτού μέσα στο διαλύτη (υγρό). Η ισορροπία περιγράφεται από την εξίσωση:

$$m = y_e/x_e \qquad (4.1),$$

όπου m είναι η σταθερά κατανομής της ισορροπίας, y_e είναι το βάρος κάθε συστατικού στο εκχύλισμα, και x_e είναι το βάρος αυτού στην πηγή. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά κατανομής, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του συστατικού που παραλαμβάνεται στο διαλύτη. Ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του διαλύτη, του συστατικού και τη θερμοκρασία. Η εκχύλιση εξαρτάται επίσης από την ταχύτητα διάλυσης κάθε συστατικού μέχρι την ισορροπία (Schwartzberg & Chao, 1982; Gertenbach, 2001).

Η δρώσα δύναμη της εκχύλισης είναι η διαφορά συγκέντρωσης των συστατικών μεταξύ του στερεού και του διαλύτη. Η ταχύτητα της εκχύλισης μπορεί να μεταβληθεί αυξάνοντας το συντελεστή διάχυσης ή μειώνοντας το μέγεθος των κομματιών (Gao & Mazza, 1996). Η αύξηση της θερμοκρασίας και η μείωση του ιξώδους αυξάνουν σημαντικά το συντελεστή διάχυσης (Loncin & Merson, 1979). Ως επακόλουθο, η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την ταχύτερη εκχύλιση των συστατικών, αλλά θα πρέπει κατά τη θέρμανση να λαμβάνονται υπόψη και άλλοι παράγοντες όπως π.χ. η ενεργοποίηση ενζύμων, η αποδόμηση συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες κλπ.

Η εκχύλιση στερεού-υγρού αφορά την επεξεργασία της παρούσας διατριβής, αφού τα απόβλητα ελαιουργείου αποτελούνται από μίγμα στερεών-νερού και η διεργασία περιλαμβάνει την ανάκτηση ινών και φαινολών από τα συμπλέγματα αυτών που βρίσκονται στα αιωρούμενα κομμάτια ελαιόπαστας.

4.4. Διεργασίες μεμβρανών

Οι διεργασίες μεμβρανών περιλαμβάνουν διάφορες τεχνολογικές εφαρμογές (π.χ. μικροδιήθηση, υπερδιήθηση, νανοδιήθηση, αντίστροφη ώσμωση, διεξάτμιση) χρησιμοποιώντας ημιπερατές μεμβράνες προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός ή κλασματοποίηση συστατικών σε ένα διάλυμα. Για παράδειγμα, η ημιπερατή μεμβράνη διαπερνάται από ορισμένες ενώσεις με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (π.χ. το μέγεθος, η ταχύτητα διάχυσης, το ηλεκτρικό φορτίο), ενώ άλλες συγκρατούνται. Ο διαχωρισμός ανάμεσα στις δύο πλευρές πραγματοποιείται εξαιτίας μιας δρώσας δύναμης, όπου για τις παραπάνω διεργασίες είναι η βαθμίδα της πίεσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001; Mulder, 1996).

Η ημιπερατότητα της μεμβράνης σε συνδυασμό με τη δρώσα δύναμη καθορίζουν τον κύριο μηχανισμό του διαχωρισμού και κατά συνέπεια το είδος της πρακτικής εφαρμογής μιας δεδομένης διεργασίας. Τυπικά, η κρίσιμη ιδιότητα για τον επιτελούμενο διαχωρισμό είναι το ΜΒ ενός συστατικού. Το ελάχιστο ΜΒ του συστατικού που μας ενδιαφέρει να διαχωρίσουμε και που συγκρατείται κατά 90 % χαρακτηρίζει τη μεμβράνη

και είναι γνωστό σαν τιμή **μοριακού κατωφλίου** (molecular weight cut off). Η τιμή αυτή κυμαίνεται από 0,1 και 500 kDa (Γκέκας κ.ά., 2002).

Η μικροδιήθηση (100-500 kDa) εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μικροοργανισμών και αιωρούμενων στερεών από το νερό και τα διαλελυμένα συστατικά. Η υπερδιήθηση (2-100 kDa) χρησιμοποιείται κυρίως για τη συγκράτηση μακρομορίων (πρωτεΐνες, πηκτίνες) και τη διέλευση μικρομορίων (νερό, άλατα, σάκχαρα) (Γκέκας & Πρωιμάκη, 2001), ενώ στη νανοδιήθηση (<1 kDa) συγκρατούνται και μικρότερα μόρια όπως οι φαινόλες και κάποια άλατα. Τέλος, στην αντίστροφη ώσμωση (<0,2 kDa), το μόνο συστατικό που διαπερνά τη μεμβράνη είναι το νερό (Nilsson, 2007).

Σήμερα, οι διεργασίες μεμβρανών έχουν εδραιωθεί σε πολλούς παραγωγικούς τομείς, αφού ο διαχωρισμός πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση θερμότητας, αλλαγής φάσης ή χημικών παραγόντων (Cassano et al., 2007). Αυτά τα πλεονεκτήματα επιτρέπουν στις τεχνολογίες μεμβρανών (π.χ. η υπερδιήθηση ή νανοδιήθηση) να χρησιμοποιούνται επιτυχώς για περισσότερες από 3 δεκαετίες στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών για την επεξεργασία υποστρωμάτων όπως γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, χυμοί, μούστος, οίνος, μπύρα, γλυκαντικές ύλες, διαλύματα σακχάρων, πόσιμο νερό, αγροβιομηχανικά και πουλερικά απόβλητα (Cuperus & Nijhuis, 1993; Gekas et al., 1998; Balannec et al., 2002; Jiao et al., 2004; Braeken et al., 2004; Vourch et al., 2005; Lipnizki et al., 2006; Adamczak & Bednarski, 2008; Susanto et al., 2009; Avula et al., 2009; Mohammad et al., 2010).

Σε σχέση με τις εφαρμογές σε προϊόντα που προέρχονται από φρούτα, οι διεργασίες μεμβρανών στοχεύουν στο διαχωρισμό, τη συμπύκνωση ή την ανάκτηση συστατικών υψηλής αξίας, όπως οι πηκτίνες και οι φαινόλες. Ο εξευγενισμός των χυμών είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα καθώς ο στόχος είναι η συγκράτηση μακρομορίων υψηλού Μ.Β. (πηκτίνες ή πρωτεΐνες) στο συμπύκνωμα και η διέλευση μικρότερων διαλυτών (σακχαρόζη, οξέα και αρωματικά συστατικά) στο διήθημα ώστε εν τέλει να αυξηθεί η απόδοση του προϊόντος (Carvalho et al., 1998; 2008; Yazdanshenas et al., 2005; Sarkar et al., 2009). Η υπερδιήθηση έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τον εξευγενισμό ακατέργαστων υδατικών εκχυλισμάτων πηκτινών πριν την ανάκτηση με αιθανολική κατακρήμνιση (Yapo et al., 2007).

Από την άλλη μεριά, οι φρουτοχυμοί έχουν επεξεργαστεί με υπερδιήθηση με στόχο την παραγωγή προϊόντων πλούσιων σε φαινόλες (π.χ. φλαβονοειδή, υδροξυκινναμικά παράγωγα οξέων) με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Mangas et al., 1997; Gökmen, et al. 2003; Cassano et al. 2007; 2008). Πρόσφατα, η διεξάτμιση προτάθηκε για την ανάκτηση φαινολών από υδατικά (Hao et al., 2009). Εξάλλου, υδατικά εκχυλίσματα σάρκας σταφυλιών έχουν επεξεργαστεί με μεμβράνες νανοδιήθησης για τον ίδιο σκοπό (Díaz-Reinoso et al., 2009).

Οι διεργασίες της μικροδιήθησης, υπερδιήθησης, νανοδιήθησης και της αντίστροφης ώσμωσης έχουν εφαρμοστεί και στην επεξεργασία των αποβλήτων ελαιουργείων με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Pompei & Codovilli, 1974; Carrieri, 1978; Vigo et al., 1981, 1983a, b; Canepa et al., 1988; Borsani & Ferrando, 1996; Mameri et al., 2000). Κύριος στόχος των παραπάνω ερευνών είναι ο καθαρισμός των αποβλήτων με την συγκράτηση των στερεών και των οργανικών συστατικών.

Παρόλα αυτά, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την επιλεκτική κλασματοποίηση των πολύτιμων συστατικών των αποβλήτων (π.χ. των φαινολών) είναι λίγα (Turano et al. 2002). Εξάλλου, κοινά προβλήματα των μεμβρανών όπως η χαμηλή χωρητικότητα, η πόλωση συγκέντρωσης (concentration polarization) και η στερεή εναπόθεση (fouling) περιορίζουν τη χρήση τους σε αυτήν την εφαρμογή (Niaounakis and Halvadakis, 2004).

4.5. Αρχές Διαχωρισμού στη Διατριβή

Τα απόβλητα ελαιουργείου αποτελούν ένα μείγμα τριών φάσεων: νερού, ελαίου και στερεών. Οι ίνες αποτελούνται τόσο από υδατο-διαλυτά (π.χ. πηκτίνες) όσο και από μη διαλυτά συστατικά (π.χ. κυτταρίνη, λιγνίνη). Οι φαινόλες είναι κατά βάση διαλυτές στο νερό, αλλά κατανέμονται μαζί με τις ίνες τόσο στην υδατική όσο και στην στερεά φάση. Ο λόγος είναι ότι ένα ποσοστό των ινών βρίσκονται ενωμένες με τις φαινόλες στη στερεά φάση (Bravo et al., 1994).

Το πρώτο στάδιο διαχωρισμού στην παρούσα διατριβή περιλαμβάνει τη φυγοκέντριση των αποβλήτων και την απομάκρυνση του αιωρούμενου ελαίου. Στη συνέχεια, τα κατακρημνισμένα στερεά συστατικά διασπείρονται στην υδατική φάση. Το δεύτερο στάδιο διαχωρισμού περιλαμβάνει την απομάκρυνση μέρους του νερού και τη θερμική συμπύκνωση των συστατικών του μείγματος (ανάμεσα σε αυτά οι εδώδιμες ίνες και οι φαινόλες). Το συμπυκνωμένο μείγμα χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στο στάδιο της εκχύλισης και της κατακρήμνισης.

Συγκεκριμένα, η απομόνωση των ινών από τους καρπούς περιλαμβάνει συνήθως ένα αρχικό στάδιο κατακρήμνισης αυτών με αιθανόλη (85% κ.ό.). Στη συνέχεια, οι ίνες εκχυλίζονται παρουσία ενός οξέος και μιας βάσης (βλ. Ενότητα 2.5). Ακολουθώντας αυτήν την αρχή, η ανάκτηση εδώδιμων ινών και φαινολών από τα απόβλητα βασίστηκε στο διαχωρισμό αυτών σε δύο ρεύματα (προϊόντα) με την προσθήκη αιθανόλης (85%) και κατόπιν τη διήθηση του κατακρημνισμένου υπολείμματος. Οι φαινόλες είναι διαλυτές στην αιθανόλη και δεν αναμένεται να κατακρημνιστούν (βλ. Ενότητα 4.2).

Η εκχύλιση (τρίτο στάδιο) επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί πριν την κατακρήμνιση με αιθανόλη (τέταρτο στάδιο) ώστε να διαχωριστούν τα συμπλέγματα ινών και φαινολών. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη σε συνδυασμό με ένα οξύ. Τα δύο προϊόντα της κατακρήμνισης που είναι πλούσια σε εδώδιμες ίνες και φαινόλες, αντίστοιχα, διαχωρίσθηκαν περαιτέρω με τη χρήση τεχνολογίας μεμβρανών όπως υπερδιήθηση και νανοδιήθηση (πέμπτο στάδιο).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. Σχεδιασμός Πειραμάτων

Ακολουθώντας τα προαναφερθέντα στάδια διαχωρισμού, ο σχεδιασμός των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε κατά σειρά σε 4 διαδοχικές μελέτες (**Σχήμα 5.1**): (α) ανάκτηση εδώδιμων ινών, (β) ανάκτηση και συντήρηση φαινολών, (γ) εφαρμογή των ανακτημένων προϊόντων και (δ) διαχωρισμό των συστατικών των προϊόντων.

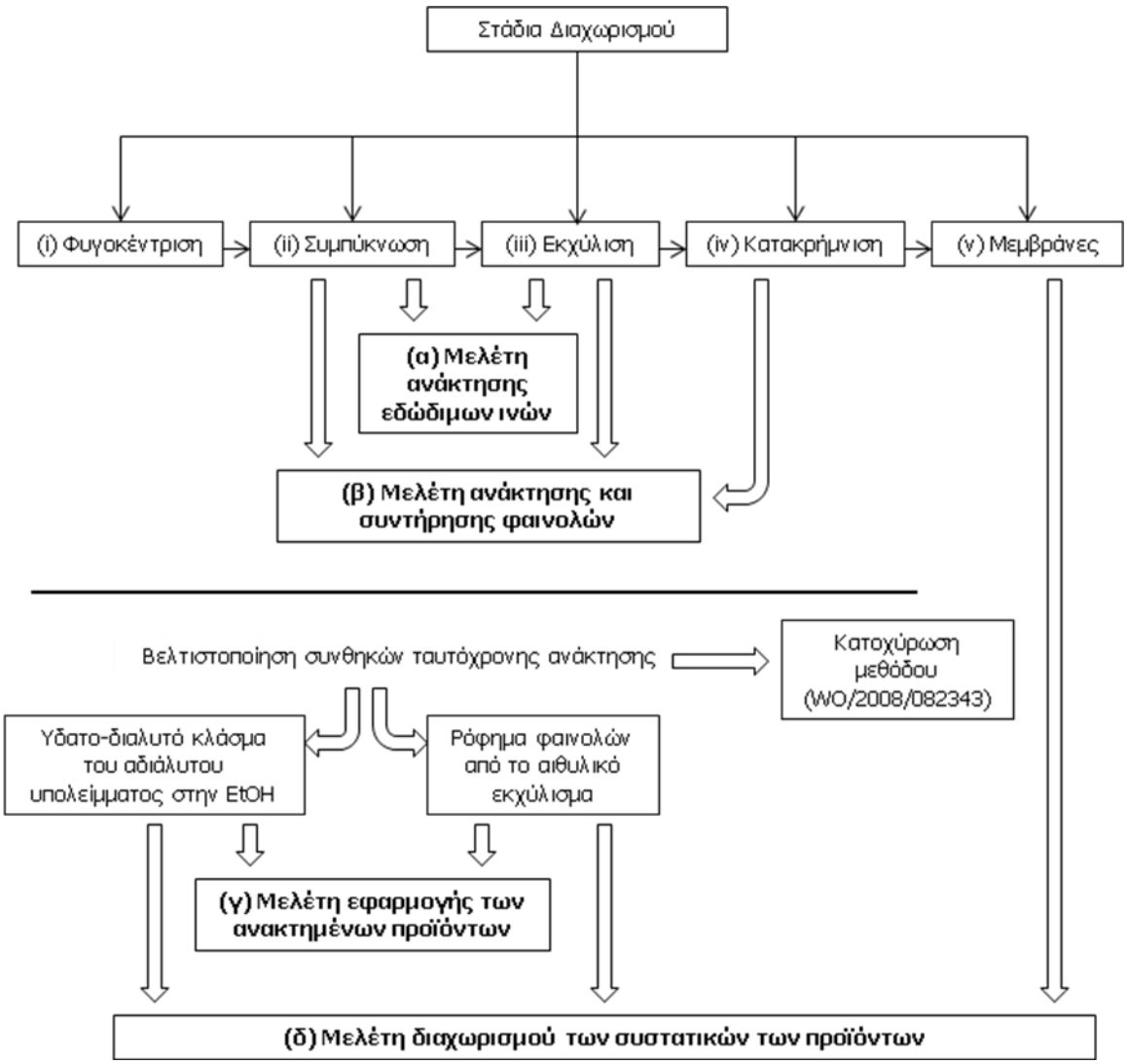
Στην πρώτη μελέτη διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις των σταδίων διαχωρισμού στην ανάκτηση εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου. Αρχικώς, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας συμπύκνωσης των αποβλήτων στις ρεολογικές ιδιότητες, καθώς επίσης και στην απόδοση ανάκτησης των περιεχόμενων πηκτινών (Ενότητα 5.3.1). Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας τη βέλτιστη θερμοκρασία συμπύκνωσης σε σχέση με τις παραπάνω παραμέτρους, μελετήθηκε το στάδιο εκχύλισης των ινών πριν την κατακρήμνιση αυτών. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε παρουσία αιθανόλης σε μικρές συγκεντρώσεις, με ή χωρίς την παρουσία οξέων (Ενότητα 5.3.2). Κατόπιν, εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες συμπύκνωσης και εκχύλισης, ανακτήθηκε το αδιάλυτο υπόλειμμα στην EtOH και διαχωρίστηκε το υδατοδιαλυτό κλάσμα αυτού με στόχο τη περαιτέρω μελέτη των ρεολογικών ιδιοτήτων και το μηχανισμό ζελοποίησής του.

Στη δεύτερη μελέτη διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις των σταδίων συμπύκνωσης, εκχύλισης και κατακρήμνισης στην ποσότητα (απόδοση) και την ποιότητα (αντιοξειδωτικές ιδιότητες) ανάκτησης φαινολών στο αιθανολικό εκχύλισμα (Ενότητα 5.4). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας συμπύκνωσης στη συντήρηση των ανακτημένων φαινολών μέσα στο αιθανολικό εκχύλισμα.

Στην τρίτη μελέτη προτάθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ταυτόχρονης ανάκτησης εδώδιμων ινών και φαινολών σύμφωνα με τα δεδομένα των προηγούμενων μελετών αλλά και την ενδεχόμενη βρώση των παραγόμενων προϊόντων. Τα προϊόντα ανακτήθηκαν κατόπιν προτεινόμενων αλλαγών στη μέθοδο και μελετήθηκαν διάφορες εφαρμογές αυτών ως πρόσθετα τροφίμων και ποτών (Ενότητα 5.5). Πιο συγκεκριμένα, το

υδατοδιαλυτό κλάσμα του αδιάλυτου υπολείμματος στην EtOH διερευνήθηκε ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα συγκόπτου κρέατος και μελετήθηκαν οι ιδιότητες μαγειρέματος αυτών (5.5.1). Το εκχύλισμα φαινολών μελετήθηκε για την παραγωγή ενός ροφήματος και εξετάσθηκε η συγκέντρωση φαινολών και οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες σε σύγκριση με άλλα παραδοσιακά ροφήματα (5.5.2).

Τέλος, στην τέταρτη μελέτη, διερευνήθηκε ο διαχωρισμός των συστατικών των παραπάνω προϊόντων (υδατοδιαλυτό κλάσμα του αδιάλυτου υπολείμματος στην EtOH και ρόφημα φαινολών) με τη χρήση μεμβρανών διαφορετικών ιδιοτήτων και προέλευσης. Η συγκεκριμένη μελέτη στοχεύει στον καθαρισμό των προϊόντων με τελικό σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων και της συντήρησης τους, αντίστοιχα (Ενότητα 5.6).



Σχήμα 5.1. Σχεδιασμός πειραμάτων και μελετών της διδακτορικής διατριβής.

5.2. Υλικά

Δείγμα αποβλήτων (100 kg συνολικά) συλλέχθηκαν από ελαιουργείο «τριφασικού τύπου» του Νομού Χανίων το Φεβρουάριο του 2005. Οι ελαιόκαρποι ήταν ώριμοι μαύροι και άνηκαν στο γένος *Olea europaea* L. Το τριφασικό συνεχές φυγοκεντρικό σύστημα περιελάμβανε τα εξής βήματα: σπάσιμο του ελαιόκαρπου, ανάμειξη της ελαιόπαστας και φυγοκέντριση αυτής κατόπιν προσθήκης νερού. Το συγκεκριμένο ελαιουργείου προσθέτει 10-20 L φρέσκου νερού για κάθε 100 kg ελαιόπαστας που επεξεργάζεται ώστε να διαχωρίσει το ελαιόλαδο από τον ελαιοπυρήνα και τα απόβλητα. Η θερμοκρασία σπασίματος και ανάμειξης του ελαιόκαρπου παρέμεινε κάτω από τους 30 ^{o}C, ενώ ο χρόνος παραμονής των αποβλήτων στη φυγόκεντρο ήταν 40 min. Το φρέσκο δείγμα συλλέχθηκε από την έξοδο του φυγοκεντρωτή, τοποθετήθηκε σε πλαστικά δοχεία και συντηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 ^{o}C) μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

Πέντε εμπορικές μεμβράνες (Alfa Laval, Nakskov, Denmark) χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαχωρισμού των συστατικών των προϊόντων ανάκτησης από τα απόβλητα ελαιουργείου (βλ. Ενότητα 5.6): τέσσερις μεμβράνες υπερδιήθησης (GR40PP, GR60PP, GR81PP και GR95PP) και μία νανοδιήθησης (NF99). Οι μεμβράνες GR40PP και GR60PP είναι φτιαγμένες από πολυσουλφόνη, ενώ οι GR81PP και GR95PP από πολυαιθεροσουλφόνη. Η μεμβράνη NF99 είναι φτιαγμένη από ένα πολυμερές φιλμ τριών επιστρώσεων, με ένα δραστικό επίπεδο από ημι-αρωματικό-αλιφατικό πολυαμίδιο (πολυπιπεραζίνη). Τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών δίνονται στον **Πίνακα 5.1**.

Άλλα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή για τη διερεύνηση των εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων (βλ. Ενότητα 5.5) ήταν: πράσινο τσάι (Twinings, TM, London), μαλοτήρα (*Sideritis Syriaca*), αέριο μέρος καλλιεργήσιμου φασκόμηλου (*Salvia pomifora*) και δίκταμου (*Origanum dictamnus*, L.) από παραγωγό του Νομού Χανίων, αλεύρι πατάτας (Lyckeby Stärkelsen Food & Fibre AB, Sweden), κανονική και άπαχη σπάλα μοσχαριού (Ugglarps AB, Sweden), παγωμένοι κύβοι καρότου (1 cm × 1 cm × 1 cm), φλούδες πατάτας και κρεμμυδιού (1 cm × 2 cm) (Magnihill AB, Sweden). Το κανονικό και άπαχο κρέας, η πατάτα, το κρεμμύδι και το καρότο πολτοποιήθηκαν σε μηχανή του κιμά μέσω τρυπών άλεσης 3-mm (AB Schauber & CO, RK 82, Sweden). Οι πολτοποιημένες ποσότητες κάθε συστατικού τοποθετήθηκαν αμέσως σε πλαστικά δοχεία και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την χρησιμοποίηση τους. Τα υλικά αυτά χαρακτηρίστηκαν από τους προμηθευτές και κατείχαν γνωστή συγκέντρωση νερού, πρωτεϊνών, ινών και αμύλου όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5.2**.

Τέλος, όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή ήταν αναλυτικού βαθμού.

Πίνακας 5.1. Χαρακτηριστικά των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή όπως δίνονται από τον κατασκευαστή αυτών και αντίστοιχες συνθήκες λειτουργίας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθαρισμού των προϊόντων.

Κωδικός μεμβράνης	Τύπος	Υλικό στήριξης και ενεργή επιφάνεια	Τυπικό MWCO[a] (Da)	Εύρος pH [b]	Εύρος θερμ.[b] (^oC)	Εύρος πίεσης[b] (bar)	Πιέσεις δοκιμών[c] (bar)	Πίεση εφαρμογής[d] (bar)
GR40PP	UF[e]	Πολυσουλφόνη	100.000	1-13	0-75	1-10	2,3,4,5	2
GR60PP	UF[e]	Πολυσουλφόνη	25.000	1-13	0-75	1-10	2,3,4,5	3
GR81PP	UF[e]	Πολυαιθεροσουλφόνη	10.000	1-13	0-75	1-10	3,4,5,6	5
GR95PP	UF[e]	Πολυαιθεροσουλφόνη	2.000	1-13	0-75	1-10	5,6,7,8	8
NF99	NF[f]	Πολυπιπεραζίνη	120[g]	2-10	0-50	1-55	4,8,12,16	12

[a] "MWCO" για "τιμή μοριακού κατωφλίου". [b] Προτεινόμενοι παράμετροι λειτουργίας. [c] Κατά τη διάρκεια προ-επεξεργασίας των μεμβρανών και βελτιστοποίησης της διεργασίας. [d] Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διαχωρισμού και των δύο υγρών τροφοδοσίας. [e] "UF" για "υπερδιήθηση". [f] "NF" για "νανοδιήθηση". [g] Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, το ποσοστό συγκράτησης διαλύματος 2000 mg/L $MgSO_4$ είναι ≥99%, χρησιμοποιώντας πίεση 9 bar και θερμοκρασία 25 ^oC.

Πίνακας 5.2. Χημική σύνθεση των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στα προϊόντα σύγκοπτου κρέατος, όπως δίνεται από τους προμηθευτές.

Συστατικό	Σύνθεση (g/100 g)				
	Νερό	Λίπος	Πρωτεΐνες	Ίνες	Άμυλο
Λιπαρή σπάλα μοσχαριού	54,3	28,0	15,9	–	–
Άπαχη σπάλα μοσχαριού	74,6	2,6	20,5	–	–
Αλεύρι πατάτας	16,0	–	–	1,4	80,6
Καρότο	90,4	–	–	2,4	0,9
Κρεμμύδι	94,0	–	–	1,2	–
Πατάτα	86,1	–	–	1,4	12.2

5.3. Μελέτη ανάκτησης εδώδιμων ινών

5.3.1. Πειράματα επίδρασης της θερμοκρασίας επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου στις λειτουργικές ιδιότητες των περιεχόμενων ινών

Θερμική επεξεργασία αποβλήτων ελαιουργείου. Δείγματα αποβλήτων (150 mL) τοποθετήθηκαν και κλείστηκαν σε γυάλινη φιάλη των 250 mL με πλαστικό πώμα. Κάθε φιάλη τοποθετήθηκε σε αναδυόμενο υδατόλουτρο και επωάστηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 50, 55, 60, 65, 70 και 80 ^{o}C). Δείγματα των 2 mL συλλέχθηκαν με αυτόματη πιπέτα από όλα τα μίγματα επώασης κατά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0, 30, 60, 120 και 180 min) και μεταφέρθηκαν σε μικρά πλαστικά δοχεία τα οποία τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο έτσι ώστε να σταματήσει τυχόν δράση της ΠΜΕ. Μετά την ολοκλήρωση της θερμικής επεξεργασίας, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα για τον προσδιορισμό της μεθανόλης σε αυτά (βλ. Ενότητα 5.7). Τα επωασμένα (για 180 min) απόβλητα ελαιουργείου επεξεργάστηκαν περαιτέρω για την ανάκτηση των αδιάλυτων υπολειμμάτων στην αιθανόλη. Για τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις.

Ανάκτηση των αδιάλυτων υπολειμμάτων στην αιθανόλη και διαχωρισμός αυτών σε κλάσματα. Δείγματα επωασμένων αποβλήτων ελαιουργείου (200 mL περίπου) αναμίχθηκαν με αιθανόλη αλκοολικού τίτλου 95° ώστε να προκύψει μίγμα τελικής συγκέντρωσης 85 mL EtOH/100 mL. Καθένα από τα μίγματα που προέκυψαν, αναδεύτηκε για 60 min στους 4 ^{o}C και κατόπιν διηθήθηκε μέσω γυάλινου φίλτρου G3. Το υπόλειμμα που έμεινε στο φίλτρο πλύθηκε δύο φορές με διάλυμα χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1 mL/mL, όγκος ίσος με 3 φορές το βάρος του υπολείμματος) για 30 min υπό συνεχή ανάδευση, ώστε να απομακρυνθεί το εναπομείναν έλαιο. Το υπόλειμμα πλύθηκε επιπλέον με ακετόνη και ξηράθηκε όλη τη νύχτα στους 40 ^{o}C σε φούρνο κενού και ονομάστηκε **AIR (alcohol insoluble residue- υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη)**. Δείγματα 2 g των AIR διασκορπίσθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού με μαγνητικό αναδευτήρα ολονύκτια στους 10 ^{o}C και τα προκύπτοντα μείγματα φυγοκεντρήθηκαν με 3000×g για 20 min στους 20 ^{o}C. Το στερεό υπόλειμμα διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο υγρό. Το υγρό διηθήθηκε υπό κενό με γυάλινο φίλτρο G3 ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη τυχόν στερεών. Το στερεό και το υγρό κλάσμα λυοφιλιώθηκαν και ζυγίστηκαν ξεχωριστά. Έτσι, προσδιορίσθηκε η ποσότητα των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών κλασμάτων των υπολειμμάτων. Το κλάσμα από το υπερκείμενο υγρό ονομάστηκε **υδατοδιαλυτό υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη (water soluble, alcohol insoluble residue - WSAIR)**. Το κλάσμα του στερεού που καταβυθίστηκε ονομάστηκε μη-υδατοδιάλυτο υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη (water insoluble, alcohol insoluble residue - WIAIR). Το ποσοστό διαλυτότητας του AIR ορίστηκε ως η αναλογία των βαρών του WSAIR και του WIAIR:

$$\textit{Διαλυτότητα (g/100 g)} = \frac{\text{Βάρος}_{WSAIR}}{\text{Βάρος}_{WSAIR} + \text{Βάρος}_{WIAIR}} \times 100\% \qquad (5.1)$$

Προετοιμασία των ζελέ και ρεολογικές ιδιότητες. Τα ζελέ προετοιμάστηκαν (σε δύο επαναλήψεις) με τη διαλυτοποίηση μιας ποσότητας δείγματος WSAIR σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 mL και κατόπιν το κάθε μείγμα τοποθετήθηκε απευθείας στο προθερμασμένο (20 ^{o}C) δοχείο του ρόμετρου. Για όλα τα ζελέ κρατήθηκε χρόνος ισορροπίας 120 min πριν τις ρεολογικές δοκιμές. Δύο διαφορετικές σειρές ζελέ προετοιμάστηκαν: (α) με την ίδια συγκέντρωση GalA (1,5 g/100 mL) και (β) με την ίδια συγκέντρωση WSAIR ανά όγκο ζελέ (25 g/100 mL). Για την προετοιμασία της πρώτης σειράς, ζυγίστηκαν 9,7, 6,9 και 8,2 g WSAIR προερχόμενα από θερμικά επεξεργασμένα απόβλητα στους 25, 60 και 80 ^{o}C, αντίστοιχα, και διαλυτοποιήθηκαν με νερό μέχρι όγκου 20 mL (48,5, 34,5 και 41 g/100 mL, αντίστοιχα). Για την προετοιμασία της δεύτερης σειράς, ζυγίστηκαν 5 g WSAIR προερχόμενα από θερμικά επεξεργασμένα απόβλητα στους 25, 60 και 80 ^{o}C, αντίστοιχα, και διαλυτοποιήθηκαν με νερό μέχρι όγκου 20 mL. Οι ρεολογικές δοκιμές των ζελέ πραγματοποιήθηκαν σε ένα ρόμετρο ελεγχόμενης έντασης (StressTech, Reologica, Sweden) χρησιμοποιώντας τη διάταξη βαρίδι-κούπας (διάμετρος κούπας 25 mm, κενό 1 mm). Η δοκιμή που πραγματοποιήθηκε ήταν κυκλικής ταλαντευόμενης έντασης με συχνότητα 1 Hz και 20 βήματα αυξανόμενης τάσης διάτμησης (shear stress) από 0 έως 50 Pa. Η δοκιμή έδωσε τις τιμές των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας των ζελέ (storage G' και loss modulus G'', αντίστοιχα). Οι G' και G'' είναι οι ιδιότητες των μειγμάτων που σχετίζονται με τα μοριακά συμβάντα ελαστικής και ιξώδους συμπεριφοράς, αντίστοιχα (Gunasekaran & Ak, 2000).

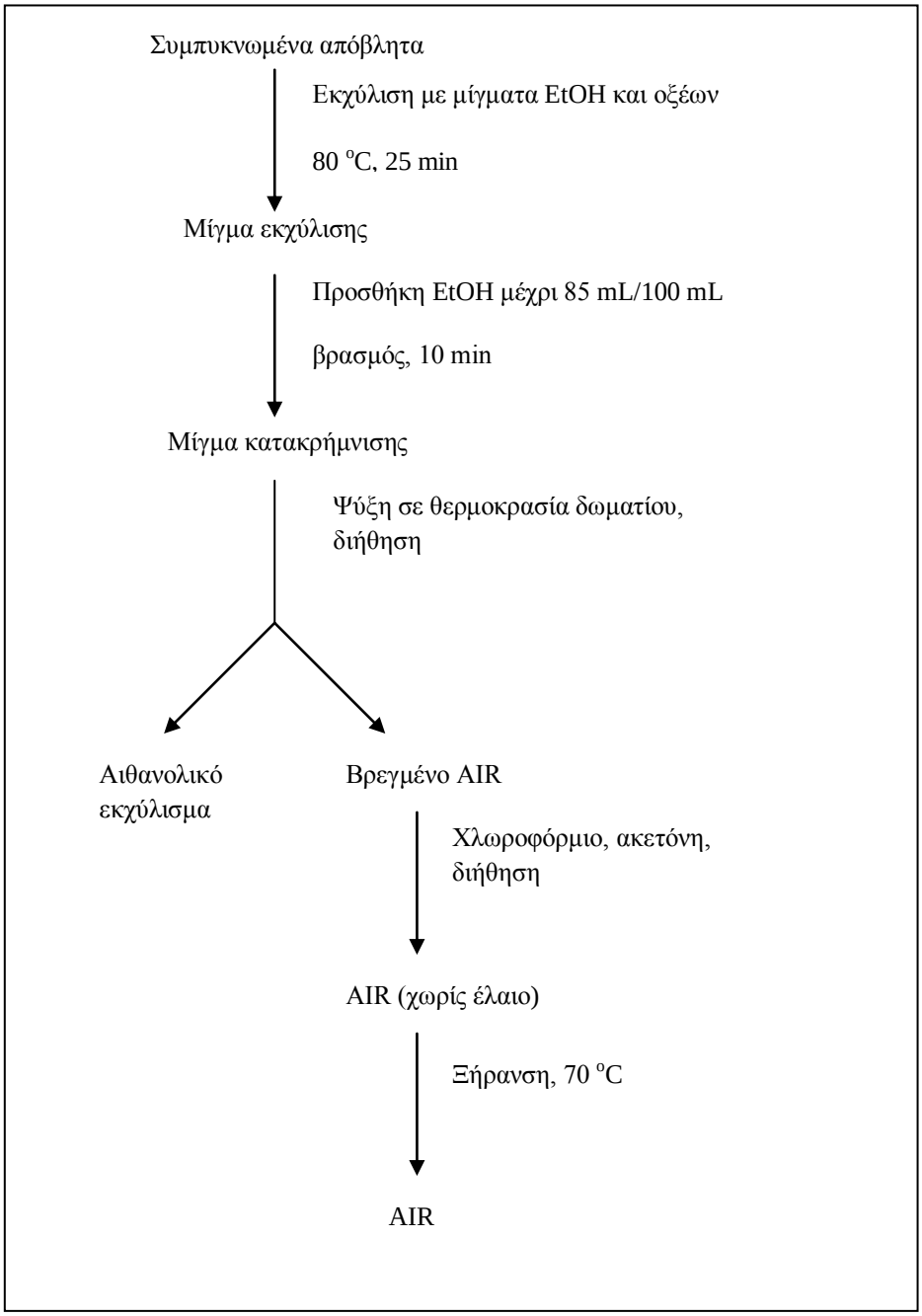
Διόγκωση των δειγμάτων AIR και χωρητικότητα συγκράτησης του νερού των δειγμάτων WIAIR. Ο προσδιορισμός της διόγκωσης των δειγμάτων AIR πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο όγκου κατακρημνισμένης κλίνης (Femenia et al. 1999). Δείγματα AIR (200 mg) υγράνθηκαν με περίσσεια απιονισμένου νερού (10 mL) και αζίδιο του νατρίου (1 mg/mL) ως βακτηριοκτόνο για 18 h σε ένα βαθμονομημένο κύλινδρο των 10 mL. Ο κατακρημνισμένος όγκος στερεού σημειώθηκε ως mL νερού/g AIR. Η ικανότητα συγκράτησης νερού (Water retention capacity-WRC) προσδιορίσθηκε κατόπιν φυγοκέντρισης του WIAIR (Femenia et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, 5 g δειγμάτων WIAIR υγράνθηκαν για 16 h σε 100 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (0.1 mol/L, pH=6.3) μαζί με αζίδιο του νατρίου, σε ένα προζυγισμένο σωλήνα πριν τη φυγοκέντριση αυτού στα 3000×g για 60 min (25 ^{o}C). Κατόπιν, η περίσσεια του υπερκείμενου υγρού απομακρύνθηκε και το στερεό υπόλειμμα αφέθηκε να στεγνώσει γυρνώντας ανάποδα τον σωλήνα για 15 min. Το βάρος του στερεού υπολείμματος καταγράφηκε και η ικανότητα συγκράτησης νερού ορίσθηκε ως g νερού/g WIAIR.

5.3.2. Πειράματα ανάκτησης και ζελοποίησης εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου

Προ-επεξεργασία αποβλήτων. Δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου 1 L (δύο επαναλήψεις) φυγοκεντρήθηκαν στα 3000×g (20 ^{o}C) για 30 min και κατόπιν το υπερκείμενο έλαιο απομακρύνθηκε μηχανικά (διά αποκορυφώσεως). Το υλικό που παρέμεινε, αναδεύτηκε επαρκώς σε αναδευτήρα Vortex και κατόπιν συμπυκνώθηκε (3,5 φορές) με περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπό παροχή αέρα στους 80 ^{o}C για 2 h.

Πειράματα εκχύλισης των κυτταρικών τοιχωμάτων των αποβλήτων ελαιουργείου. Τα συμπυκνωμένα και μερικώς απο-λιπασθέντα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε αυτά μια κατάλληλη ποσότητα αντιδραστηρίων ώστε να προκύψουν διαφορετικοί συνδυασμοί στο μίγμα εκχύλισης (**Σχήμα 5.2**): 3, 5, 7, 10, 15, 20 mL EtOH/100 mL μίγματος, 5 mL EtOH με 1 g κιτρικού οξέος/100 mL, και 5 mL EtOH με 1 mL πυκνού νιτρικού οξέος/100 mL. Η διαδικασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε ποτήρι ζέσεως για 25 min χρησιμοποιώντας μηχανική ανάδευση. Τα ποτήρια ζέσεως τοποθετήθηκαν σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80 ^{o}C. Στη συνέχεια το μίγμα εκχύλισης αναδεύτηκε με EtOH αλκοολικού τίτλου 95° μέχρι τελικής συγκέντρωσης 85 mL/100 mL και το προκύπτον μίγμα κατακρήμνισης θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 10 min, ώστε να διαχωριστούν τα μακρομόρια (κατακρημνισμένο υπόλειμμα) από τα μικρομόρια. Η απαιτούμενη ποσότητα EtOH και στα δύο βήματα υπολογίστηκε από το ισοζύγιο μάζας της περιεχόμενης άνυδρης EtOH στα προκύπτοντα μίγματα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μια «τυφλή» διεργασία χωρίς την προσθήκη διαλύματος εκχύλισης (κατευθείαν κατακρήμνιση). Το μίγμα κατακρήμνισης αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, διηθήθηκε μέσω φίλτρου G3 και το υπόλειμμα ξεπλύθηκε και ξηράθηκε όπως προηγουμένως. Ομοίως, τα AIR που προέκυψαν, διαχωρίστηκαν σε υδατοδιαλυτά και μη-υδατοδιαλυτά κλάσματα (βλ. Ενότητα 5.3.1).

Προετοιμασία των ζελέ και ρεολογικές ιδιότητες. Τα ζελέ προετοιμάστηκαν σε δύο επαναλήψεις για καθεμιά από τις δύο σειρές: ζελέ (α) με διαφορετικές συγκεντρώσεις GalA και (β) με την ίδια συγκέντρωση GalA και διαφορετικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος στο διάλυμα ζελοποίησης. Στην πρώτη περίπτωση, διαφορετικές συγκεντρώσεις (12,5, 37,5, 50, 55 and 62,5 g) AIR (που ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας 5 mL EtOH και 1 g κιτρικού οξέος/100 mL στο μίγμα εκχύλισης) διεσπάρησαν ολονύκτια (στους 10 ^{o}C) σε 300 mL απιονισμένου νερού με μαγνητικό αναδευτήρα. Το προκύπτον μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 20 min (3000×g, 20 ^{o}C) ώστε να διαχωριστεί το υδατοδιαλυτό από το μη-υδατοδιαλυτό κλάσμα. Το υπερκείμενο υδατοδιαλυτό κλάσμα (~270 mL) διαχωρίστηκε από το στερεό και συμπυκνώθηκε μέχρι τα 25 mL υπό μαγνητική ανάδευση και θέρμανση αυτού (80 ^{o}C) σε δοχείο για 2 h. Οι ρεολογικές δοκιμές έγιναν όπως παραπάνω (βλ. Ενότητα 5.3.1). Η συγκέντρωση των πηκτινών εκφράστηκε ως g GalA/100 mL ζελέ. Το δείγμα (25 mL) τοποθετήθηκε στην προθερμασμένη κούπα (80 ^{o}C) του ρεόμετρου και η θερμοκρασία αυτού μειώθηκε απότομα στους 20 ^{o}C. Ο χρόνος ισορροπίας ήταν 120 min.



Σχήμα 5.2. Διεργασία ανάκτησης του αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος (AIR) από τα απόβλητα ελαιουργείου.

Στη δεύτερη περίπτωση, 30 g AIR (που ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας 5 mL EtOH και 1 g κιτρικού οξέος/100 mL στο μίγμα εκχύλισης) διεσπάρησαν σε 300 mL απιονισμένου νερού και διαχωρίστηκαν στο υδατοδιαλυτό και μη υδατοδιαλυτό κλάσμα (βλ. Ενότητα 5.3.1). Το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε μέχρι τα 150 mL, χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστήρα (model Laborota 4011, Heidolph, Germany) στους 60 ^{o}C και παροχή αέρα. Το συμπυκνωμένο διάλυμα μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και κατόπιν προστέθηκε κιτρικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 ή 2 g/100 mL) ώστε να προκύψουν διαφορετικά ζελέ. Στη συνέχεια τα μείγματα συμπυκνώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 20 mL με μαγνητικό αναδευτήρα για 1 h στους 80 ^{o}C. Τα ζελέ που προέκυψαν, αφέθηκαν να κρυώσουν στο ψυγείο (5 ^{o}C) για 48 h (και όχι στο ρεόμετρο). Τα προκύπτοντα ζελέ κόπηκαν στο κατάλληλο μέγεθος (διάμετρος 30 mm και ύψος 2 mm) και οι ρεολογικές τους ιδιότητες προσδιορίσθηκαν με την ίδια συσκευή και μεθοδολογία όπως προηγουμένως, αλλά διαφορετική γεωμετρία (παράλληλης πλάκας). Οι δοκιμές έδωσαν τις τιμές των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας των ζελέ (storage G' και loss modulus G'', αντίστοιχα).

5.4. Μελέτη ανάκτησης και συντήρησης φαινολών

Σχεδιασμός μελέτης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές σειρές για τη μελέτη των εξής παραμέτρων: (α) χρόνος εκχύλισης φαινολών στο στάδιο της κατακρήμνισης (βλ. Ενότητα 4.5), (β) συγκέντρωση αιθανόλης στο στάδιο της εκχύλισης (αντίστοιχα πειράματα της Ενότητας 5.3.2 για την εκχύλιση ινών) και (γ) θερμοκρασίας προ-επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου (αντίστοιχα πειράματα της Ενότητας 5.3.1). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την θερμική προ-επεξεργασία των αποβλήτων αποθηκεύτηκαν και ελέγχονταν για μια χρονική περίοδο 6, 12 και 18 εβδομάδων. Η διεργασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε στους 25 ^{o}C (αντί για υψηλότερες θερμοκρασίες) ώστε να αποφευχθούν ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εκτίμηση των δεδομένων. Στην πρώτη και τη δεύτερη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκε 60 min χρόνος εκχύλισης (αντί για μικρότερος) ώστε να εξασφαλισθεί η ύπαρξη ισορροπίας στο μείγμα. Τέλος, τα εκχυλίσματα της τρίτης σειράς πειραμάτων επιλέχθηκαν για τη μελέτη αποθήκευσης ώστε να διερευνηθεί η επίδραση θερμικά προκαλούμενων αντιδράσεων στη συντήρηση των φαινολών μέσα στο αιθανολικό μέσο. Όλα τα πειράματα και οι αντίστοιχοι αναλυτικοί προσδιορισμοί της μελέτης πραγματοποιήθηκαν σε 3 επαναλήψεις.

Πειράματα ανάκτησης και συντήρησης. Στη πρώτη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση φαινολών χωρίς κάποια προ-επεξεργασία των αποβλήτων. Δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου (15 mL) διεσπάρησαν σε απόλυτη EtOH μέχρι τελικής συγκέντρωσης αυτής στα 85 mL/100 mL. Τα αιωρήματα που προέκυψαν, τοποθετήθηκαν σε γυάλινες φιάλες των 250 mL, κλείστηκαν με πλαστικό καπάκι και τέθηκαν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o}C). Τα μίγματα με διαφορετικούς χρόνους ανάδευσης (1, 30, 60 και 120 min) διηθηθήκαν μέσω γυάλινου φίλτρου ώστε να απομακρυνθούν οι κατακρημνισμένες εδώδιμες ίνες. Τα

αιθανολικά εκχυλίσματα (85 mL/100 mL) ανακτήθηκαν σε ποσότητα 95 mL και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους 4 ^{o}C. Η συγκέντρωση φαινολών και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων προσδιορίσθηκαν μέσα σε 24 h (βλ. Ενότητα 5.7).

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η προσθήκη EtOH σε διάφορες συγκεντρώσεις σε ένα στάδιο προ-επεξεργασίας (εκχύλιση). Δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου (15 mL) τοποθετήθηκαν σε γυάλινες φιάλες των 250 mL. Κατόπιν, προστέθηκε απόλυτη EtOH για να προκύψουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτής (0, 5, 10 και 20 mL/100 mL). Οι φιάλες κλείστηκαν με πλαστικό καπάκι και αναμείχθηκαν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση για 30 min και θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o}C). Στη συνέχεια, προστέθηκε συμπληρωματικά απόλυτη EtOH στα αιωρήματα μέχρι τελικής συγκέντρωσης αυτής στα 85 mL/100 mL. Τα προκύπτοντα εναιωρήματα αναμείχθηκαν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση για 60 min και θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o}C), διηθήθηκαν και ανακτήθηκαν όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Η συγκέντρωση φαινολών και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων προσδιορίσθηκαν μέσα σε 24 h (βλ. Ενότητα 5.7).

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η θερμοκρασία προ-επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου. Η προ-επεξεργασία πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη αιθανόλης. Δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου (15 mL) προστέθηκαν σε γυάλινες φιάλες των 250 mL, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο υδατόλουτρο και επωάστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 50, 60 και 80 ^{o}C) για 3 h. Κατόπιν, τα μπουκάλια ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα διεσπάρησαν σε απόλυτη EtOH μέχρι τελικής συγκέντρωσης αυτής στα 85 mL/100 mL. Τα προκύπτοντα εναιωρήματα αναμείχθηκαν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση για 60 min και θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o}C), διηθήθηκαν και ανακτήθηκαν όπως παραπάνω. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν τοποθετήθηκαν σε σκούρες φιάλες και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους 4 ^{o}C. Η συγκέντρωση φαινολών και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων προσδιορίσθηκαν για τέσσερις διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης (0, 6, 12 και 18 εβδομάδες).

5.5. Διερεύνηση εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων

5.5.1. Αιωρήματα εδώδιμων ινών ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (κεφτέδες)

Ανάκτηση του υλικού εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου. Μετά από τα παραπάνω πειράματα, το υλικό επιλέχθηκε να ανακτηθεί από τα απόβλητα ελαιουργείου επιφέροντας στη διαδικασία που περιγράφεται στην Ενότητα 5.3.2 τις παρακάτω αλλαγές: (α) η συμπύκνωση των αποβλήτων και η εκχύλιση των ινών πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C αντί για τους 80 ^{o}C, (β) η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τον συνδυασμό EtOH (5 mL/100 mL) και κιτρικού οξέος (1 g/100 mL), η κατακρήμνιση του AIR έγινε στους 4 ^{o}C (για 1 h) αντί θερμοκρασίας βρασμού (για 10

min), (δ) το AIR πλύθηκε δύο φορές με EtOH (95 mL/100 mL) αντί για χλωροφόρμιο και ακετόνη, και (ε) το AIR ξηράνθηκε στους 40 ^{o}C αντί για τους 70 ^{o}C. Δείγματα 2 g AIR (σε 3 επαναλήψεις) διεσπάρησαν σε 100 g απιονισμένο νερό με μαγνητικό αναδευτήρα ολονύκτια στους 10 ^{o}C και τα προκύπτοντα μείγματα φυγοκεντρήθηκαν με 3000×g για 20 min στους 20 ^{o}C. Τρεις στοιβάδες προέκυψαν από τη φυγοκέντριση: το στερεό υπόλειμμα, το υπερκείμενο υγρό και το επιπλέον έλαιο. Το έλαιο απομακρύνθηκε μηχανικά και το υγρό διαχωρίσθηκε από το στερεό. Η ποσότητα των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών φραγμάτων (WSAIR και WIAIR, αντίστοιχα) του AIR ανακτήθηκε όπως προηγουμένως (βλ. Ενότητα 5.3.1).

Προετοιμασία των ζελέ και ρεολογικές ιδιότητες. Τα ζελέ προετοιμάστηκαν με τη διαλυτοποίηση διαφορετικών ποσοτήτων δειγμάτων WSAIR (3, 4, 5, 6 και 7 g) σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 15 ml και κατόπιν την τοποθέτηση αυτών στο προθερμασμένο δοχείο (20 ^{o}C) του ροόμετρου. Ο χρόνος ισορροπίας ήταν 2 h και οι ρεολογικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν όπως προηγουμένως (βλ. Ενότητα 5.3.1) με την γεωμετρία βαρίδι-κούπας. Οι δοκιμές έδωσαν τις τιμές των συντελεστών αποθήκευσης και απώλειας των ζελέ (storage G' και loss modulus G'', αντίστοιχα).

Προετοιμασία και μαγείρεμα των προϊόντων σύγκοπτου κρέατος. Διαφορετικοί τύποι κεφτέδων προετοιμάστηκαν με διαφορετικούς συνδυασμούς κρέατος (κανονικού ή άπαχου), παρουσία ή απουσία αμύλου, αλλά και με ίνες από τα απόβλητα ελαιουργείου ή καρότου όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5.3**. Πιο συγκεκριμένα, ένα δείγμα ελέγχου προετοιμάστηκε με την προσθήκη αλεύρου πατάτας με κανονικό (λιπαρό) κρέας (συνταγή 1). Τρία δείγματα προετοιμάστηκαν το ένα χωρίς πρόσθετα και τα άλλα δύο με την προσθήκη αλεύρου πατάτας ή καρότου σε άπαχο κρέας (συνταγές 2-4). Τέσσερα άλλα δείγματα κεφτέδων προετοιμάστηκαν με την προσθήκη ινών (AIR ή WSAIR, με ή χωρίς ίνες καρότου) σε άπαχο κρέας (συνταγές 5-8) και συγκρίθηκαν με τα τέσσερα παραπάνω δείγματα (συνταγές 1-4). Το άμυλο χρησιμοποιείται στο σύγκοπτο κρέας ως παράγοντας σταθεροποίησης της υφής (Fernández-Martín et al., 2000) και στη διατριβή χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή του αμύλου πατάτας ως παράγοντας συγκράτησης νερού.

Τα συστατικά των κεφτέδων αναμείχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες μέσα σε αναμεικτήρα (blender) για 5 min. Τα δείγματα των AIR και WSAIR διεσπάρησαν σε νερό, πριν την ανάμειξη αυτών στο μπλέντερ. Η ολική μάζα κάθε παρτίδας ήταν μεταξύ 500 και 600 g για όλα τα δείγματα που ελέχθησαν. Στη συνέχεια, μετά την προετοιμασία κάθε παρτίδας ακολούθησε ο σχηματισμός 30 κεφτέδων των ~15 g και διαμέτρου 3 cm. Οι κεφτέδες που προέκυψαν διατηρήθηκαν στο ψυγείο (5 ^{o}C) για 30 min.

Το μαγείρεμα των κεφτέδων πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους: (α) σε τηγάνι και (β) σε φριτέζα. Στην πρώτη περίπτωση, 15 κεφτέδες (σε 2 επαναλήψεις) τοποθετήθηκαν σε ένα πιάτο και ζυγίστηκαν. Ένα τηγάνι τοποθετήθηκε στην εστία θέρμανσης (210 ^{o}C) για 10 min ώστε να φτάσει τη θερμοκρασία μαγειρέματος: 175 ^{o}C. Κατόπιν, οι 15 κεφτέδες τοποθετήθηκαν στο τηγάνι και περιοδικά στριφογυρίστηκαν κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος για 15 min (στο σύνολο), φτάνοντας την εσωτερική θερμοκρασία των 75 °C. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ηλιέλαιο σε θερμοκρασία 160 ^{o}C. Πιο συγκεκριμένα, 15 κεφτέδες (σε 2 επαναλήψεις) ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε τηγανόχαρτο μέσα σε ένα μεταλλικό ορθογωνικό κλουβί (20×12×5 cm). Στη συνέχεια το κλουβί τοποθετήθηκε μέσα στο ελαιόλουτρο και οι κεφτέδες μαγειρεύτηκαν για 3 min φτάνοντας την ίδια θερμοκρασία μαγειρέματος με το μαγείρεμα στο τηγάνι. Στη συνέχεια οι κεφτέδες τοποθετήθηκαν σε χαρτί για τουλάχιστον μια ώρα ώστε να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και να απομακρυνθεί το έλαιο από την εξωτερική επιφάνεια.

Πίνακας 5.3. Συνταγές για την προετοιμασία των κεφτέδων.

Συστατικό	Μονάδα	Αριθμός συνταγής							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Λιπαρή σπάλα μοσχαριού	g	275	–	–	–	–	–	–	–
Άπαχη σπάλα μοσχαριού	g	–	275	275	275	275	275	275	275
Κρεμμύδι	g	65	65	65	65	65	65	65	65
Πατάτα	g	50	50	50	50	50	50	50	50
Αλάτι	g	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
Λευκό πιπέρι	g	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Νερό	mL	100	147,5	155	115	155	127,5	155	128,5
Αλεύρι πατάτας	g	50	50	–	–	–	–	–	–
Καρότο	g	–	–	–	45	–	30	–	30
AIR[a]	g	–	–	–	–	15	15	–	–
WSAIR[b]	g	–	–	–	–	–	–	40	25
Ολικό βάρος παρτίδας	g	548,5	596	553,5	558,5	568,5	571	593,5	582

[a] "AIR" για υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη, ανακτώμενο από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[b] "WSAIR" για υδατοδιαλυτό υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη, ανακτώμενο από τα απόβλητα ελαιουργείου.

5.5.2. Εκχυλίσματα φαινολών για την παραγωγή ροφήματος πλούσιο σε φαινόλες

Πειράματα συμπύκνωσης εκχυλίσματος φαινολών. Το αιθανολικό (85 mL EtOH/100 mL) εκχύλισμα φαινολών, όπως ανακτήθηκε από τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 5.5.1, συμπυκνώθηκε σε διάφορες αναλογίες (1:1, 1:2, 1:4, 1:5 και 1:10 κ.ό.), με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (model Laborota 4011, Heidolph, Germany) στους 60 ^{o}C. Το αρχικό δείγμα, το συμπύκνωμα και το απόσταγμα κάθε διεργασίας ανακτήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης φαινολών και EtOH.

Προετοιμασία ροφήματος φαινολών. Το αιθανολικό (85 mL/100 mL) εκχύλισμα φαινολών, όπως ανακτήθηκε από τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 5.5.1, συμπυκνώθηκε 5 φορές (κατ'όγκο) σε περιστροφικό εξατμιστήρα (model Laborota 4011, Heidolph, Germany) στους 60 ^{o}C και στη συνέχεια διαλύθηκε σε νερό ώστε να προκύψει ρόφημα φαινολών με συγκέντρωση EtOH μέχρι 2,0 mL/100 mL (90 mL του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος διαλύθηκαν στα 3 L διαλύματος). Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ώστε να αυξηθεί η αναλογία συγκεντρώσεων ολικών φαινολών προς αιθανόλη μέσα στο ρόφημα. Το προκύπτον ρόφημα παρουσίασε θόλωμα λόγω της από-διαλυτοποίησης μικρο-σωματιδίων λιπών από την EtOH στο νερό και για αυτό το λόγο διηθήθηκε διαδοχικά με τρία φίλτρα μικροδιήθησης (10 mm, 0,45 μm και 0,2 μm).

Πειράματα σύγκρισης ροφήματος φαινολών με άλλα ροφήματα. Η συγκέντρωση διαφόρων φαινολικών συστατικών του ροφήματος (ολικές φαινόλες με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau, ο-διφαινόλες στα 370 nm, ολικές φαινόλες στα 280 nm, παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος στα 320 nm, φλαβονόλες στα 360 nm και ανθοκυανιδίνες στα 520 nm), αλλά και η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών (βλ. Ενότητα 5.7), μελετήθηκε έναντι άλλων γνωστών ροφημάτων φαινολών, π.χ. πράσινο τσάι, τσάι του βουνού (μαλοτήρα), φασκόμηλο και δίκταμος. Το πράσινο και μαύρο τσάι χρησιμοποιήθηκαν σε σκόνη. Τα φυτικά υλικά της μαλοτήρας, τα φύλλα του αέριου μέρους του φασκόμηλου και του δίκταμου τεμαχίστηκαν σε διαστάσεις μικρότερες των 5 mm, πριν τη ξήρανσή τους στους 102 ^{o}C για 3 h. Μετά τη ξήρανση, τα τεμαχισμένα κομμάτια φύλλων αφέθηκαν να κρυώσουν για 1 h σε ξηραντήριο. Η παρασκευή των αντίστοιχων ροφημάτων πραγματοποιήθηκε με βρασμό των τεμαχισμένων φύλλων και της σκόνης του μαύρου και πράσινου τσαγιού σε αναλογία 1,5 g στα 240 mL και κατόπιν διήθηση αυτών υπό κενό με απλό διηθητικό χαρτί.

5.6. Μελέτη διαχωρισμού των συστατικών των προϊόντων

Προετοιμασία των υγρών τροφοδοσίας. Τα απόβλητα ελαιουργείου επεξεργάστηκαν όπως προηγουμένως (βλ. Ενότητα 5.5.1.) για την ανάκτηση δύο διαφορετικών υλικών: (α) του WSAIR πλούσιου σε πηκτίνες και (β) του αιθανολικού εκχυλίσματος (85 mL/100 mL) πλούσιου σε φαινόλες. Το WSAIR διατηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 ^{o}C) και το αιθανολικό εκχύλισμα στο σκοτάδι στους 4 ^{o}C. Το πρώτο υγρό

τροφοδοσίας (A) προετοιμάστηκε κατόπιν διαλυτοποίησης του WSAIR σε απιονισμένο νερό (6 g σε 3 L) και ονομάστηκε «**διάλυμα πηκτινών**». Το δεύτερο υγρό τροφοδοσίας (B) προετοιμάστηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα για την παραγωγή του «**ροφήματος φαινολών**» (βλ. Ενότητα 5.5).

Πειραματική διάταξη και έλεγχος λειτουργίας. Τα πειράματα μεμβρανών πραγματοποιήθηκαν σε μια συσκευή πλακών και πλαισίων (DSS Labstak M20, Alfa Laval Nakskov, Denmark) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.3**. Η μονάδα είναι ένα σύστημα διήθησης μεμβρανών εγκάρσιας ροής, όπου τα φίλτρα μεμβρανών και οι πλάκες στήριξης αυτών, συμπιέζονται σε κάθετη διάταξη με μια υδραυλική χειροκίνητη αντλία (model P392, Enerpac, USA) στα 320 bar. Η επιφάνεια των μεμβρανών ήταν ίση με 0.036 m^2 (2 φύλλα μεμβρανών των 0.018 m^2) και ο όγκος του υγρού τροφοδοσίας ίσος με 3 L. Τα υγρά τροφοδοσίας ανακυκλώνονταν κάθετα στις συμπιεσμένες μεμβράνες με μια βοηθητική βιομηχανική αντλία (hydra-cell industrial pump, model G13XDSGHHEMA, Wanner Engineering Inc, USA) εξοπλισμένη με ένα κινητήρα (Varmeca-10, model 013XDSGHHEMA, Leroy Somer, USA). Η ροή ανακύκλωσης ήταν σταθερή και ίση με 38 $mL \cdot s^{-1}$. Η θερμοκρασία εισόδου και εξόδου διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 25±0.5 ^oC. Η δια-μεμβρανική πίεση (transmembrane pressure-TMP) του υγρού τροφοδοσίας ρυθμιζόταν στο κατάλληλο επίπεδο με μια βαλβίδα συγκράτησης και τη βοήθεια μανομέτρων της συσκευής. Η πυκνότητα ροής ($L/h \cdot m^2$) μετρήθηκε βαρομετρικά χρησιμοποιώντας αναλυτικό ζυγό (XT120A, Precisa Instruments Ltd, Switzerland).

Προ-επεξεργασία μεμβρανών. Κάθε μεμβράνη συμπιέστηκε στη συσκευή Labstak M20 και προ-επεξεργάστηκε με απιονισμένο νερό ως υλικό τροφοδοσίας (5 L) ώστε να περιοριστεί η συμπίεση της μεμβράνης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Στις μεμβράνες GR40PP και GR60PP ασκήθηκε πίεση των 2, 3, 4 και 5 bar σε δύο συνεχόμενους κύκλους (διάρκειας 15 min για κάθε πίεση) χρησιμοποιώντας φρέσκο απιονισμένο νερό σε καθένα από αυτούς. Το διήθημα απομακρυνόταν συνεχώς και φρέσκο απιονισμένο νερό προστίθετο ώστε να διατηρείται ο όγκος της τροφοδοσίας στα 4-5 L. Στις μεμβράνες GR81PP και GR95PP ασκήθηκε πίεση των 3, 4, 5, 6 και 5, 6, 7, 8 bar, αντίστοιχα, με την ίδια διαδικασία. Στη μεμβράνη NF99 ασκήθηκε αντίστοιχα πίεση στα 4, 8, 12 και 16 bar. Εξάλλου, με αυτή τη διαδικασία απομακρύνεται η γλυκερίνη που χρησιμοποιείται στις μεμβράνες ως συντηρητικό (Nilsson et al., 2006).

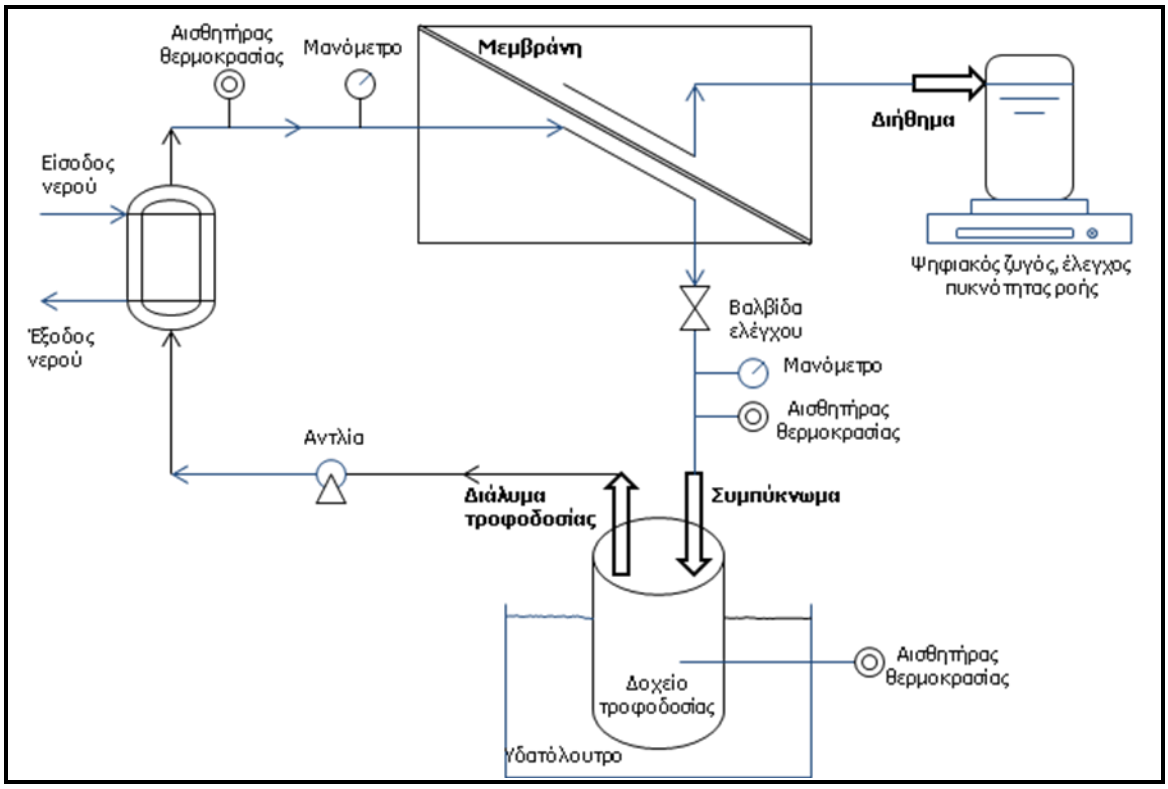
Βελτιστοποίηση διεργασίας. Οι προ-επεξεργασμένες μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση της διεργασίας με υγρά τροφοδοσίας το διάλυμα πηκτινών και ρόφημα φαινολών. Πιο συγκεκριμένα, στις μεμβράνες ασκήθηκε πίεση (σε 3 επαναλήψεις) με τη μεθοδολογία της προηγούμενης παραγράφου. Μια καινούρια (προ-επεξεργασμένη) μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε για κάθε συνδυασμό τύπου μεμβράνης και υλικού τροφοδοσίας. Η πυκνότητα ροής καταμετρήθηκε σε όλα τα πειράματα και τις διαφορετικές πιέσεις, ενώ 10 mL δείγματος διηθήματος σε κάθε πίεση συλλέχθηκε για ανάλυση. Στη συνέχεια, προσδιορίσθηκαν οι συντελεστές συγκράτησης πηκτινών και ολικών φαινολών (βλ. Ενότητα 5.7, μέθοδος Folin-Ciocalteau) για το

διάλυμα πηκτινών και το ρόφημα φαινολών, αντίστοιχα. Η βέλτιστη TMP για κάθε υγρό τροφοδοσίας επιλέχθηκε με πρώτο παράγοντα αξιολόγησης τον υψηλότερο βαθμό συγκράτησης πηκτινών και φαινολών, αντίστοιχα, και δεύτερο παράγοντα την μεγαλύτερη πυκνότητα ροής. Η πυκνότητα ροής μεγάλωνε αυξανομένης της TMP για όλες τις μεμβράνες και τα υγρά τροφοδοσίας που δοκιμάστηκαν. Εν τέλει, η βέλτιστη TMP (**Πίνακας 5.1**) ήταν ίδια και για τα δύο υγρά τροφοδοσίας για κάθε μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό συνέβη γιατί ο συντελεστής συγκράτησης τόσο των πηκτινών όσο και των φαινολών μειωνόταν από ένα σημείο πίεσης και πάνω για όλες τις μεμβράνες (2, 3, 5, 8 και 12 bar για τις GR40PP, GR60PP, GR81PP, GR95PP και NF99, αντίστοιχα).

Πειράματα διαχωρισμού των συστατικών. Προ-επεξεργασμένες μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν (σε 3 επαναλήψεις) για κάθε πείραμα υγρού τροφοδοσίας-μεμβράνης. Τρία λίτρα υγρού τροφοδοσίας (διάλυμα πηκτινών ή ρόφημα φαινολών) επεξεργάστηκαν στη συσκευή μεμβρανών με τη βέλτιστη TMP, μέχρι την ανάκτηση 1,5 L διηθήματος και 1,5 L συμπυκνώματος. Η πυκνότητα ροής προσδιορίσθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος και η σχετική ροή (relative flux- RF) των υγρών τροφοδοσίας υπολογίστηκε σε ποσοστό (%) σύμφωνα με την εξίσωση: $RF = (J_v/J_{w0}) \cdot 100$ (%), όπου J_v είναι η πυκνότητα ροής σε σταθερή κατάσταση και J_{w0} είναι η ροή του απιονισμένου νερού. Τα δείγματα των ρευμάτων τροφοδοσίας και διηθήματος αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 ^oC) μέχρι την ανάλυση αυτών. Το υγρό τροφοδοσίας αντικαταστάθηκε με απιονισμένο νερό μετά την ολοκλήρωση κάθε πειράματος διαχωρισμού και επεξεργάστηκε για 60 min στην ίδια TMP ώστε να καθαριστεί η μεμβράνη. Η πυκνότητα ροής προσδιορίσθηκε ξανά με φρέσκο απιονισμένο νερό στη τροφοδοσία και υπολογίσθηκε η ανάκτηση ροής (flux recovery–FR) σε ποσοστό (%) σύμφωνα με την εξίσωση: $FR = (J_{wf}/J_{w0}) \cdot 100$ (%), όπου J_{w0} και J_{wf} είναι η πυκνότητα ροής του νερού πριν και μετά το πείραμα διαχωρισμού, αντίστοιχα (Gekas et al., 1993).

Τα δείγματα από την επεξεργασία του διαλύματος πηκτινών αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό του pH, της αγωγιμότητας, της συγκέντρωσης K^+, Na^+, ολικών φαινολών και πηκτινών. Η ολική συγκέντρωση σακχάρων δεν προσδιορίσθηκε για αυτήν την τροφοδοσία καθώς αναμενόταν να περιέχει μόνο ίχνη αυτών. Εξάλλου, το αρχικό υλικό (WSAIR) για την παραγωγή του υλικού τροφοδοσίας απομονώθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου κατόπιν κατακρήμνισης με EtOH που απομακρύνει τα μόρια μικρότερου MB π.χ. ελεύθερα σάκχαρα (Qi et al., 2000). Άλλες παράμετροι όπως οι διαφορετικές φαινολικές τάξεις και η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν προσδιορίσθηκαν καθώς ο κύριος σκοπός ήταν ο καθαρισμός των πηκτινών από τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων που επηρεάζουν αρνητικά τις ιδιότητες ζελοποίησής τους (Galanakis et al., 2010a).

Τα δείγματα από την επεξεργασία του ροφήματος φαινολών αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό του pH, της αγωγιμότητας, της συγκέντρωσης K^+, Na^+, EtOH και ολικών σακχάρων. Επίσης, το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων προσδιορίσθηκε με διάφορες μεθόδους (ολικές φαινόλες με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau, ο-διφαινόλες στα 370 nm, ολικές φαινόλες στα 280 nm, παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος στα 320 nm και φλαβονόλες στα 360 nm), ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων προσδιορίσθηκε με δύο διαφορετικές δραστικότητες (βλ. Ενότητα 5.7.4). Η συγκέντρωση πηκτινών του ροφήματος φαινολών δεν προσδιορίσθηκε καθώς οι πολυσακχαρίτες απομακρύνονται κατά την κατακρήμνιση του AIR. Οι συντελεστές συγκράτησης ($R_{\%}$) για κάθε παράμετρο υπολογίστηκαν από την εξίσωση: $R_{\%} = 100\cdot(A_{feed}-A_{perm})/A_{feed}$, όπου $R_{\%}$ είναι ο συντελεστής απόρριψης κάθε παράμετρου, ενώ οι A_{feed} και A_{perm} είναι οι τιμές κάθε παραμέτρου στην τροφοδοσία και το διήθημα, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.3. Αναπαράσταση της διεργασίας μεμβρανών που εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό των συστατικών των προϊόντων.

5.7. Αναλύσεις

5.7.1. Νερό, έλαιο και στερεά

Προσδιορισμός υγρασίας, ελαίου και στερεών αποβλήτων ελαιουργείου. Τα δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου (σε 3 επαναλήψεις) τοποθετήθηκαν για ξήρανση σε φούρνο (στους 80 ^{o}C) μέχρι σταθερού βάρους. Η περιεκτικότητα υγρασίας υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση. Η περιεκτικότητα ελαίου μετρήθηκε σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2568 (Commission Regulation, 1991) για τον προσδιορισμό σε ελαιοπυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, τα ξηραμένα υπολείμματα των αποβλήτων εκχυλίστηκαν διαδοχικά σε δύο βήματα σε συσκευή Soxhlet: με *n*-εξάνιο (2 φορές το βάρος των φρέσκων αποβλήτων) για 4 h (κάθε βήμα). Το μίγμα εκχύλισης συλλέχθηκε μέσα σε προ-ζυγισμένη φιάλη και το εξάνιο εξατμίστηκε αρχικώς με περιστροφικό ξηραντήρα (στους 40 ^{o}C) και κατόπιν με ξήρανση σε φούρνο (στους 40 ^{o}C). Το εναπομείναν έλαιο ζυγίστηκε και η περιεκτικότητα ελαίου εκφράστηκε σε ξηρή βάση. Η περιεκτικότητα ολικών στερεών προσδιορίσθηκε αφαιρώντας το βάρος της υγρασίας και του ελαίου από το αρχικό βάρος των αποβλήτων.

Απώλειες νερού, ελαίου και ολικές κατά το μαγείρεμα των προϊόντων σύγκοπτου κρέατος. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητα του νερού και του λίπους του AIR, των ωμών και τηγανισμένων κεφτέδων πραγματοποιήθηκε με αλλαγές στη μέθοδο που παρουσιάστηκε από τους Oroszvári et al. (2005a), προσαρμοσμένη στην περίπτωση. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του νερού, δείγματα των 5-15g (σε 3 επαναλήψεις) απλώθηκαν σε γυάλινα δισκία Petri και ζυγίστηκαν πριν και μετά την ξήρανση αυτών στους 105 ^{o}C για 16 h. Μετά τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του νερού, τα ξηρά υπολείμματα σπάστηκαν με μια σπάτουλα παρουσία χλωροφορμίου για 5 min ακριβώς. Στη συνέχεια, το μείγμα διηθήθηκε μέσω γυάλινου φίλτρου επλύθηκε με χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση του ελαίου. Το γυάλινο φίλτρο που περιείχε το υπόλειμμα (χωρίς το έλαιο) αφέθηκε για ξήρανση στους 105 ^{o}C για μία ώρα. Η περιεκτικότητα ελαίου των κεφτέδων υπολογίστηκε αφαιρώντας το βάρος του άνευ ελαίου υπολείμματος από το ξηρό υπόλειμμα (με το έλαιο). Ο υπολογισμός των απωλειών νερού, ελαίου αλλά και ολικών απωλειών έγινε ως εξής: Το βάρος κάθε δείγματος κεφτέ προσδιορίσθηκε στους 20 ^{o}C, πριν και μετά το τηγάνισμά του. Οι ολικές απώλειες υπολογίσθηκαν ως ποσοστό του αυθεντικού βάρους του κεφτέ (Εξίσωση (5.2)).

$$\mathrm{TL} = \frac{W_b - W_a}{W_b} \times 100 \quad (5.2)$$

όπου TL είναι οι ολικές απώλειες (total loss) (%), W_b το βάρος πριν (g), W_a το βάρος μετά το τηγάνισμα (g). Οι απώλειες νερού και ελαίου (τιμές *a* και *b*) υπολογίστηκαν σε ποσοστό του βάρους του ωμού δείγματος κεφτέ (5.3) και (5.4)).

$$W_f = \frac{Wi - a}{100 - a - b} \times 100 \quad (5.3) \qquad F_f = \frac{Fi - b}{100 - a - b} \times 100 \quad (5.4)$$

όπου W_f είναι η περιεκτικότητα νερού επί ξηρής βάσης ελεύθερης ελαίου μετά το τηγάνισμα (%), W_i είναι η περιεκτικότητα του νερού στο ωμό δείγμα κεφτέ (%), F_f το περιεχόμενο λίπος επί ξηρής βάσης ελεύθερης ελαίου μετά το τηγάνισμα (%), F_i είναι η περιεκτικότητα του ελαίου στο ωμό δείγμα κεφτέ (%), *a* είναι η απώλεια νερού (%) και *b* είναι η απώλεια ελαίου (%).

5.7.2. Προσδιορισμός ανόργανων συστατικών

Προσδιορισμός τέφρας. Η περιεκτικότητα τέφρας των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών AIR κλασμάτων προσδιορίσθηκε (σε 2 επαναλήψεις) με ολονύκτια ξήρανση σε φούρνο κενού στους 70 ^oC και σε κλίβανο στους 550 ^oC για 4 h.

Προσδιορισμός ιόντων Cl^-. Η συγκέντρωση των ιόντων Cl^- των κλασμάτων AIR προσδιορίσθηκε ογκομετρικά (σε 3 επαναλήψεις), χρησιμοποιώντας διάλυμα $AgNO_3$ παρουσία ιόντων χρωμίου για δείκτη (μέθοδος Mohr). Συγκεκριμένα, δείγματα 0.15-0.20 g πρόσφατα ξηραμένου NaCl ζυγίστηκαν ακριβώς και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Κατόπιν, προστέθηκαν 50 mL απιονισμένου νερού και 2 mL δείκτη (διάλυμα 2 g K_2CrO_4/100 mL) και τα μίγματα τιτλοδοτήθηκαν με διάλυμα $AgNO_3$ (17 g/L) υπό ισχυρή ανάδευση, μέχρι την αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο-καφέ. Η ακριβής συγκέντρωση του $AgNO_3$ υπολογίστηκε από το βάρος του NaCl και του καταναλωθέντος όγκου του διαλύματος. Δείγματα AIR των 2.5 g ζυγίστηκαν επακριβώς, διαλυτοποιήθηκαν σε 250 mL νερού και κατόπιν 25 mL του προκύπτοντος διαλύματος ογκομετρήθηκαν όπως παραπάνω για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου που εκφράσθηκε σε mg/L.

Προσδιορισμός κατιόντων K^+, Na^+ και Ca^{2+}. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης K^+ και Na^+ στα κλάσματα AIR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC Flame Photometric Method 956.01 (AOAC, 1990a). Συγκεκριμένα, αλεσμένα και καλά ομογενοποιημένα δείγματα (σε 3 επαναλήψεις) επεξεργάστηκαν με διάλυμα εκχύλισης (νερό για το K^+ και 0,24 meq/L οξαλικού αμμωνίου για το Na^+) για 15 min. Τα μίγματα εκχύλισης διηθήθηκαν και διαλύθηκαν κατάλληλα πριν τον προσδιορισμό τους έναντι πρότυπων διαλυμάτων σε φλωγο-φωτόμετρο (Carning, 410). Η συγκέντρωση Ca^{2+} προσδιορίσθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC AAS Method 975.03 (AOAC, 1990b). Με τον ίδιο τρόπο, αλεσμένα και καλά ομογενοποιημένα δείγματα (σε 3 επαναλήψεις) επεξεργάστηκαν σε κλίβανο για 2 h στους 500 °C. Κατόπιν, προστέθηκαν νερό και HNO_3 στην εναπομείνασα τέφρα και η περίσσεια του διαλύματος εξατμίστηκε σε εστία των 100–120 °C, πριν την επιπλέον επεξεργασία αυτών στον κλίβανο για 1 h. Τα υπολείμματα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 1 g Lanthanum /100 mL. Τα προκύπτοντα διαλύματα μετρήθηκαν έναντι πρότυπων διαλυμάτων Ca^{2+} με φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (Varian, SpectraAA-640) στα 589 nm.

5.7.3. Αλκοόλες

Προσδιορισμός αιθανόλης. Η συγκέντρωση σε EtOH των εκχυλισμάτων, συμπυκνωμάτων και ροφήματος φαινολών προσδιορίσθηκε κατόπιν απόσταξης των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας πρότυπα Gay-Lussac αλκοολόμετρα (Dujardin-Salleron Instruments, France). Η συγκέντρωση της EtOH εκφράστηκε σε αλκοολικούς βαθμούς (mL EtOH /100 mL δείγματος). Τα δείγματα (250 mL) αποστάχθηκαν με τη συσκευή Alcodest (JP Selecta, Spain).

Προσδιορισμός μεθανόλης. Η αύξηση της συγκέντρωσης μεθανόλης μέσα στα απόβλητα ελαιουργείου προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Diaz et al. (2007) με μικρές αλλαγές για την περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, deίγματα των 100 μL αραιωμένων δειγμάτων αποβλήτων (1:25 σε απιονισμένο νερό) τοποθετήθηκαν μαζί με 180 μL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος (100 mmol/L, pH = 6.5) σε πλαστικούς σωλήνες των 2 mL με καπάκι. Στη συνέχεια, 20 μL διαλύματος αλκοολικής οξειδάσης (0.01 unit/μL σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος) και 100 μL απιονισμένου νερού προστέθηκαν στο σωλήνα μέχρι συνολικού όγκου 400 μL. Οι σωλήνες αναμείχθηκαν και κατόπιν επωάστηκαν για 10 min στους 30 ^{o}C. Ακολούθως, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 400 μL διαλύματος Purpald (Sigma Aldrich, US, 5 mg/mL σε 0.5 meq/L NaOH, προπαρασκευασμένο μέσα σε μία ώρα) και τα δείγματα κλείστηκαν με καπάκι πριν την ανάδευσή τους σε vortex για 1 min ακριβώς ώστε να διασφαλιστεί η οξυγόνωση αυτών. Κατόπιν, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν μέσα σε υδατόλουτρο (στους 30 ^{o}C) για 45 min. Μετά την επώαση, τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και προστέθηκε σε αυτά 1.2 mL απιονισμένου νερού ώστε να δώσει τελικό όγκο διαλύματος 2.0 mL. Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος προσδιορίσθηκε μέσω της απορρόφησης αυτού στα 550 nm, έναντι τυφλού διαλύματος (παρασκευάζεται όπως παραπάνω με απιονισμένο νερό αντί για δείγμα) και πρότυπης καμπύλης μεθανόλης (πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων μεταξύ 0 και 200 μmol/100 mL). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500.

5.7.4. Φαινόλες και αντιοξειδωτική ικανότητα

Προσδιορισμός ολικών φαινολών. Η συγκέντρωση ολικών φαινολών προσδιορίσθηκε φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau (Atanassova et al, 2003). Κάθε δείγμα κατόπιν κατάλληλης αραίωσης, αναμείχθηκε για 3 min με 0,25 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau. Μετά την ανάμειξη, προστίθεται 1 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (35 g/100 mL) και το τελικό διάλυμα αφέθηκε στο σκοτάδι για 1 h. Κατόπιν, μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος στα 725 nm (με φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-mini-1240) έναντι διαλύματος αναφοράς (προετοιμάζεται όπως παραπάνω με απιονισμένο νερό αντί για δείγμα). Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος σε μεθανόλη/νερό (0-50 mg/L). Τα πρότυπα διαλύματα προετοιμάστηκαν κατόπιν κατάλληλης αραίωσης μητρικού διαλύματος σε νερό. Το μητρικό διάλυμα παρασκευάστηκε ως εξής: 1 g καφεϊκού οξέος διαλύεται σε 100 mL μεθανόλης και 1 mL

του προκύπτοντος διαλύματος διαλύεται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Οι ολικές φαινόλες εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (mg/L).

Προσδιορισμός των *o*-διφαινολών. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή της μεθόδου που περιγράφεται από τους Mateos et al. (2001). Ένα mL αραιωμένου εκχυλίσματος (αραίωση 1:5 σε υδροαλκοολικό διάλυμα 50 mL EtOH/100 mL) αναμείχθηκε ισχυρά εντός ογκομετρικής φιάλης των 10 mL με 1 mL διαλύματος διυδροξυ-μολυβδαινικού νατρίου (διάλυμα 5 g αυτού σε 100 mL υδροαλκοολικού διαλύματος 50 mL EtOH/100 mL). Η ογκομετρική φιάλη συμπλυρώθηκε μέχρι τα 10 mL με υδροαλκοολικό διάλυμα 50 mL EtOH/100 mL. Το διάλυμα αφέθηκε για 15 min και εν συνεχεία μετρήθηκε η απορρόφηση στα 370 nm έναντι διαλύματος αναφοράς που παρασκεύασθηκε ως άνω, χωρίς την προσθήκη του αραιομένου εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη παρασκευάσθηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα καφεϊκού οξέως (0-200 mg/L σε υδροαλκοολικό διάλυμα 50 mL EtOH/100 mL). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέως (mg/L).

Κλασματοποίηση φαινολών. Η κλασματοποίηση πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο που αναφέρεται από τους Obied et al. (2005a). Συγκεκριμένα, 1 mL κατάλληλα αραιωμένου αιθανολικού εκχυλίσματος (1:10 σε νερό) αναμείχθηκε με 1 mL διαλύματος HCl-EtOH (0.1 mL HCl/100 mL διαλύματος 95 mL EtOH/100 mL) μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ο όγκος αυτής συμπληρώθηκε μέχρι τα 10 mL με διάλυμα 2 mL HCl/100 mL νερού. Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε απευθείας μετά την ανάμειξη στα 280, 320, 360 και 520 nm για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών, παραγώγων υδροξυ-κινναμικών οξέων, φλαβονολών και ανθοκυανιδινών, αντίστοιχα, έναντι διαλύματος αναφοράς που παρασκευάσθηκε ως άνω χωρίς την προσθήκη του αραιωμένου αιθανολικού εκχυλίσματος. Οι πρότυπες καμπύλες των παραπάνω προσδιορισμών κατασκυάσθηκαν χρησιμοποιώντας διαλύματα γαλλικού οξέος (0-200 mg/L), καφεϊκού οξέος (0-100 mg/L), κερσετίνης (0-150 mg/L) και κυανιδινικού χλωρίου (0-100 mg/L), αντίστοιχα, σε διάλυμα 10 mL EtOH/100 mL νερό.

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φαινολών πραγματοποιήθηκε με τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό δύο *in vitro* δράσεων: (α) την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών του $DPP^{\bullet}$ (Kulisic et al., 2004) και (β) την ικανότητα αναγωγής του σύμπλοκου ιόντος Fe^{3+} με το αντιδραστήριο φαινανθρολίνης (Szydłowska-Czerniak et al., 2008).

Η αντιοξειδωτική δράση στην περίπτωση του αντιδραστηρίου DPPH καθορίζεται από την εξής αντίδραση:

$$\text{AH(αντιοξειδωτικό)} + \text{DPPH} \rightarrow \text{A}^{\bullet} + \text{DPPH}_2$$

Στη μέθοδο που εφαρμόστηκε, 100 μL διαφόρων αραιώσεων κάθε εκχυλίσματος (1:5, 1:10, 1:20, 1:30 και 1:40) αναμείχθηκαν ισχυρώς με 1.5 mL μεθανολικού διαλύματος αντιδραστηρίου DPPH (32 mg/L) σε πλαστικούς σωλήνες των 2 mL. Η απορρόφηση των σχηματιζόμενων διαλυμάτων προσδιορίσθηκε μετά από 1 h στα 517 nm έναντι μεθανόλης στην κυψελίδα αναφοράς. Το τυφλό διάλυμα του αντιδραστηρίου $DPPH^{\bullet}$ χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικού χρησιμοποιήθηκε για δείγμα ελέγχου.

Το ποσοστό αναγωγής του αντιδραστηρίου $DPPH^{\bullet}$ από τα εκχυλίσματα υπολογίσθηκε σύμφωνα με την εξίσωση: % αδρανοποίησης = $((A_{C(0)}-A_{A(t)})/A_{C(0)}) \times 100$, όπου $A_{C(0)}$ είναι η απορρόφηση του δείγματος ελέγχου για t = 0 min και $A_{A(t)}$ είναι η απορρόφηση του αντιοξειδωτικού διαλύματος για t = 1 h. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές Αντιοξειδωτικής Δραστικότητας (ΑΔ) σε mg $DPPH^{\bullet}$/g αντιοξειδωτικου: ΑΔ = $1/EC_{50}$, όπου EC_{50} είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος για την αναγωγή κατά 50% του αντιδραστηρίου $DPPH^{\bullet}$.

Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση στην περίπτωση του αντιδραστηρίου φαινανθρολίνης περιγράφεται με την αντίδραση:

$$Fe^{3+}\text{-Y} + \text{Αντιοξειδωτικό} \rightarrow Fe^{2+}\text{-Y} + \text{Οξειδωμένο Αντιοξειδωτικό}$$

όπου το «Y» είναι το χρωμογόνο υπόστρωμα εκλεκτικό στο Fe^{2+} και συγκεκριμένα το αντιδραστήριο φαινανθρολίνης (Szydłowska-Czerniak et al., 2008). Στη μέθοδο που εφαρμόστηκε, 1 mL διαλύματος $FeCl_3$ (0,2 g/100 mL σε απόλυτη EtOH) και 0.5 mL διαλύματος 1,10-φαινανθρολίνης (0,5 g/100 mL EtOH) αναμείχθηκαν μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Μετά την ανάμειξη προστέθηκαν 0,6 mL αραιωμένου εκχυλίσματος (1:10 σε απόλυτη EtOH) και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 10 mL με απόλυτη EtOH. Το διάλυμα που προέκυψε αναμείχθηκε αφέθηκε στο σκοτάδι για 20 min και η απορρόφηση προσδιορίσθηκε στα 510 nm. Το διάλυμα αναφοράς παρασκευάστηκε με ανάμειξη διαλύματος $FeCl_3$ με αντιδραστήριο φαινανθρολίνης και συμπλήρωση του όγκου μέχρι 10 mL με απόλυτη αιθανόλη. Η πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0-0,8 mmol/L) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα $FeSO_4$ (mmol $FeSO_4$/L).

5.7.5. Εδώδιμες ίνες και σχετικοί παράμετροι

Ανάλυση εδώδιμων ινών. Οι ίνες των κλασμάτων AIR αναλύθηκαν ως προς την περιεκτικότητα υπολείμματα ουδέτερων σακχάρων, GalA και λιγνίνης Klason, όπως περιγράφεται στη μέθοδο AOAC Uppsala Gas Chromatography-Colorimetric-Gravimetric Method 994.13 (Theander et al., 1995). Σύμφωνα με τη μέθοδο, το άμυλο απομακρύνθηκε από το αλεσμένο δείγμα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (0,1 mol/L, pH=5) χρησιμοποιώντας θερμο-ανθεκτική *α*-αμυλάση και αμυλογλυκοζιδάση. Τα διαλυτά πολυμερή κατακρημνίστηκαν με προσθήκη 80 mL EtOH/100 mL. Οι κατακρημνισμένοι και αδιάλυτοι πολυσακχαρίτες υδρολύθηκαν (για 60 min στους 30 ^{o}C) με διάλυμα H_2SO_4 (12 mol/L). Το υπόλειμμα ξηράνθηκε σε κλίβανο ώστε να

προσδιορισθεί η περιεκτικότητα σε λιγνίνη Klason, ενώ το όξινο υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ουδέτερων σακχάρων και GalA. Τα ουδέτερα σάκχαρα προσδιορίσθηκαν με αέρια χρωματογραφία ως οξικές αλδιόλες, ενώ το GalA στο όξινο υδρόλυμα προσδιορίσθηκε φωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Scott (1979). Οι ολικές ίνες ορίστηκαν ως το άθροισμα των ουδέτερων σακχάρων και του GalA (χωρίς τη λιγνίνη Klason).

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο (Agilent Technologies, model 6890N) εξοπλισμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και τριχοειδή στήλη (model: DB-225, 30 m × 0,25 mm id, 0,25 μm πάχος φιλμ). Τα διαλύματα υδρόλυσης επεξεργάστηκαν περαιτέρω με υδρόλυση (για 40 min στους 70 ºC) με H_2SO_4 (18 mol/L) παρουσία διαλύματος H_3BO_3/NaCl (2.0 g NaCl και 2.0 g H_3BO_3 διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένο νερό).

Η απορρόφηση των μιγμάτων που προέκυψαν μετρήθηκε στα 400 και 450 nm έναντι τυφλού διαλύματος κατόπιν της προσθήκης διαλύματος διμεθυλ-φαινόλης (100 mg/100 mL οξικού οξέος). Η απορρόφηση στα 400 nm αφαιρέθηκε από τα 450 nm ώστε να γίνει διόρθωση του προσδιορισμού παρεμβαλλόμενων εξοζών. Πρότυπα διαλύματα GalA (0-320 mg GalA/100 mL νερού) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, ενώ η φασματοφωτομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500 Spectrophotometer. Όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε 2 επαναλήψεις.

Προσδιορισμός βαθμού μεθυλίωσης (ΒΜ) των πηκτινών. Δείγματα 50 mg (σε 2 επαναλήψεις) διεσπάρησαν σε νερό (20 mL) και αναδεύτηκαν για 10 min. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση των περιεχόμενων πολυσακχαριτών με τη μεθόδο που περιγράφεται από τους Waldron & Selvendran (1990), κατόπιν αλλαγών στις μονάδες όγκου. Οι πολυσακχαρίτες υδρολύθηκαν με 8 mL διαλύματος NaOH (2 mol/L) για 1 h στους 20 °C υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Το εναιώρημα του δείγματος εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 8 mL διαλύματος HCl (2 mol/L) και το προκύπτον διάλυμα διηθήθηκε μέσω χάρτινου φίλτρου Whatman (2 mm).

Ο προσδιορισμός της μεθανόλης στο διάλυμα που προέκυψε πραγματοποιήθηκε όπως στην Ενότητα 5.7.3 και συσχετίστηκε με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε GalA. Ο ΒΜ εκφράστηκε σε mol μεθανόλης/100 mol GalA. Η ποσότητα της εστεροποιημένης μεθανόλης στα δείγματα AIR και WSAIR υπολογίστηκε από την περιεχόμενη μεθανόλη και εκφράστηκε ως μmol εστεροποιημένης μεθανόλης/ g αποβλήτων ελαιουργείου.

Η ποσότητα της μεθανόλης που απελευθερώθηκε από το υλικό WSAIR και αντιστοιχεί στη μείωση του ΒΜ που παρατηρήθηκε μετά την θερμική επεξεργασία των αποβλήτων, υπολογίστηκε ως εξής :

$$\text{Μείωση ΒΜ} = (\text{ΒΜ στους 25 }^{o}\text{C}) - (\text{ΒΜ σε κάθε θερμοκρασία}) \quad (5.5)$$

Απελευθερωμένη Μεθανόλη από το WSAIR = (μείωση ΒΜ)·(συγκέντρωση GalA) (5.6)

Η εστεροποιημένη και απελευθερωμένη μεθανόλη εκφράστηκε σε μmol μεθανόλης/g φρέσκου βάρους αποβλήτων ελαιουργείου.

Προσδιορισμός *β*-αποδόμησης των πηκτινών. Η έκταση της *β*-αποδόμησης των πηκτινών ελέγχθηκε μετρώντας την απορρόφηση των 4,5-ακόρεστων γαλακτουρονιδίων στα 235 nm σε αραιωμένα δείγματα WSAIR (σε 3 επαναλήψεις). Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των 4,5-ακόρεστων γαλακτουρονιδίων από την UV απορρόφηση, χρησιμοποιήθηκε ένας μέσος μοριακός συντελεστής απορρόφησης ίσος με 5500 $mol^{-1}\cdot L\cdot cm^{-1}$ (Kravtchenko et al., 1993). Η συγκέντρωση των 4,5-ακόρεστων γαλακτουρονιδίων εκφράστηκε σε mol/mol GalA. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500.

5.7.6. Φυσικοχημικοί και άλλοι παράμετροι

Προσδιορισμός pH και αγωγιμότητας. Πραγματοποιήθηκαν με ψηφιακό pH-μετρο (WTW, GmbH Company) και αγωγιμόμετρο (K720, Consort, Belgium) αντίστοιχα. Οι τιμές της αγωγιμότητας εκφράστηκαν σε μS/cm.

Προσδιορισμός χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου. Ο προσδιορισμός COD πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αναγωγή του διχρωμικού καλίου από οξειδωμένες οργανικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, ένα αραιωμένο δείγμα αποβλήτων ελαιουργείου αναμείχθηκε με διάλυμα διχρωμικού καλίου (που περιέχεται σε εμπορικό kit της Hanna Instruments) και ακολούθησε χώνευση του μίγματος για 120 min στους 150 ^{o}C μέσα σε ειδικό χωνευτήριο (model C9800). Οι συγκεντρώσεις COD προσδιορίσθηκαν φασματοφωτομετρικά και συγκρίθηκαν με λευκό προσδιορισμό χρησιμοποιώντας φωτόμετρο (Hanna Instruments Bench Photometer C214).

Προσδιορισμός ολικών σακχάρων. Τα ολικά σάκχαρα προσδιορίσθηκαν με προσαρμογή της μεθόδου που προτάθηκε από τους Dubois et al. (1956). Πιο συγκεκριμένα, 1 mL αραιωμένου δείγματος (σε 3 επαναλήψεις) αναμείχθηκε ισχυρά με 1 mL διαλύματος φαινόλης (5 g/100 mL) μέσα σε γυάλινο σωλήνα. Μετά την ανάμειξη προστέθηκαν 5 mL πυκνού H_2SO_4 και ο σωλήνας αναμείχθηκε ισχυρά σε vortex. Μετά από 10 min, ο σωλήνας αναδεύτηκε ξανά και αφέθηκε να κρυώσει σε υδατόλουτρο (20-25 ^{o}C). Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε μετά από 5 min στα 490 nm, έναντι τυφλού διαλύματος που παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία, αλλά με απιονισμένο νερό αντί για δείγμα. Η πρότυπη καμπύλη ελήφθη ομοίως, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα Glc (5-40 mg/L).

5.7.7. Στατιστική ανάλυση

Από τις διάφορες επαναλήψεις κάθε παραμέτρου υπολογίστηκε η «μέση τιμή ± τυπική απόκλιση». Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το «students t-test» και συγκρίσεις ανά ζεύγη στο πρόγραμμα Excel (Windows XP 2007). Οι «στατιστικές διαφορές» μεταξύ των δειγμάτων υπολογίσθηκαν με αποδεκτό επίπεδο πιθανότητας 5% ($P \leq 0,05$) για όλες τις συγκρίσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

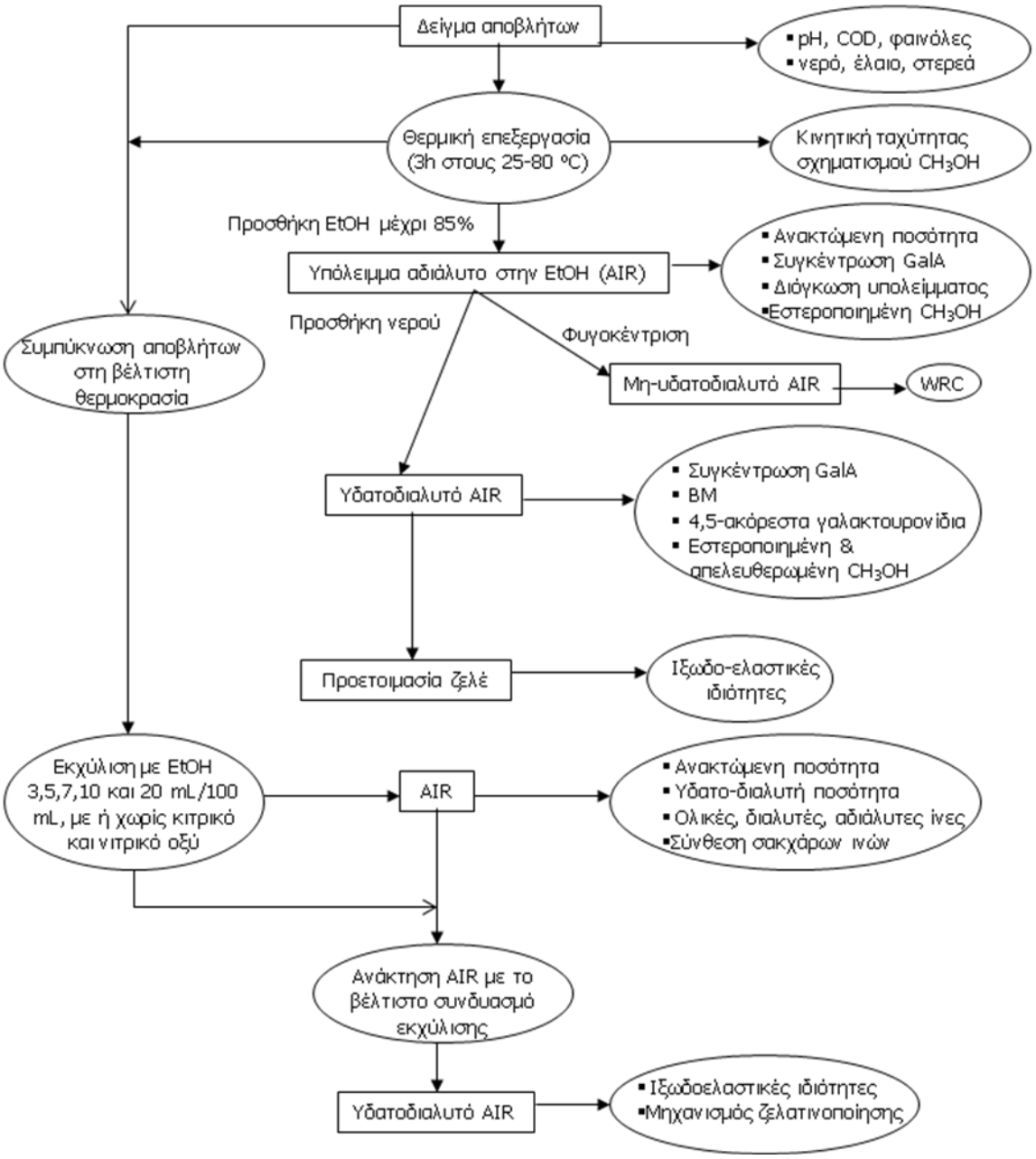
ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΙΝΩΝ

6.1. Περιγραφή μελέτης

Κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των φυτικών ιστών, τα κυτταρικά τοιχώματα υφίστανται αλλαγές στη δομή και στις ιδιότητες τους. Η αξιολόγηση των υφιστάμενων αλλαγών πραγματοποιείται με την εξέταση των χαρακτηριστικών θέρμανσης και ενυδάτωσης των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλά και των αντίστοιχων ρεολογικών ιδιοτήτων τους (Kunzek et al., 1999).

Ο ελαιόκαρπος περιέχει σημαντικές ποσότητες ινών με αξιόλογες ιδιότητες π.χ. ικανότητα συγκράτησης νερού και ανταλλαγής κατιόντων (Jiménez et al., 2000). Οι Cardoso et al. (2003a, b) απομονώσανε ακατέργαστες πηκτίνες από τα απόβλητα διφασικών ελαιουργείων και βρήκαν ότι οι ιδιότητες ζελοποίησής τους είναι συγκρίσιμες με αυτές εμπορικών πηκτινών πορτοκαλιών χαμηλής μεθυλίωσης. Έτσι, τα απόβλητα προτάθηκαν ως νέα πηγή υλικού ζελοποίησης. Εξάλλου, άλλοι ερευνητές πρότειναν την απομόνωση ινών από τον ελαιόκαρπο (Huisman et al., 1996) και τα απόβλητα τριφασικών ελαιουργείων (Vierhuis et al., 2003) χρησιμοποιώντας ζεστή EtOH για κατακρήμνιση και κατόπιν επεξεργασία με βάσεις, οξέα κλπ. Ωστόσο, οι προτεινόμενες διεργασίες αποτελούνται από διαδοχικά στάδια καθαρισμού των ινών με αποτέλεσμα να είναι οικονομικά ασύμφορες.

Ο στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας απλής μεθόδου ανάκτησης ενός ακατέργαστου υλικού πλούσιου σε πηκτίνες από τα απόβλητα τριφασικών ελαιουργείων. Στο **Σχήμα 6.1** παρουσιάζεται ένα διάγραμμα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Το πρώτο στάδιο σχετίζεται με τη θερμική επεξεργασία και τη συμπύκνωση των αποβλήτων. Σε αυτό το στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ, στην κινητική από-εστεροποίησης των πηκτινών και συνακόλουθα στις λειτουργικές και ρεολογικές ιδιότητες αυτών. Παράλληλα, στόχος είναι η κατανόηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την αποεστεροποίηση, τη διαλυτοποίηση και την αποδόμηση των πηκτινών μέσα στα απόβλητα ελαιουργείου.



Σχήμα 6.1. Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης ανάκτησης εδώδιμων ινών από τα απόβλητα ελαιουργείου.

Το επόμενο στάδιο είναι η μελέτη της εκχύλισης των ινών από τα συμπυκνωμένα απόβλητα ελαιουργείου. Γι'αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μίγματα εκχύλισης και κατόπιν ανακτήθηκε το AIR σε κάθε περίπτωση. Τα ανακτώμενα υλικά χαρακτηρίστηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε ίνες. Ο βέλτιστος συνδυασμός εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση ενός υλικού πλούσιου σε πηκτίνες. Τέλος, το υδατοδιαλυτό κλάσμα αυτού μελετήθηκε ως προς τις ιδιότητες και το μηχανισμό ζελοποίησής του.

6.2. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ

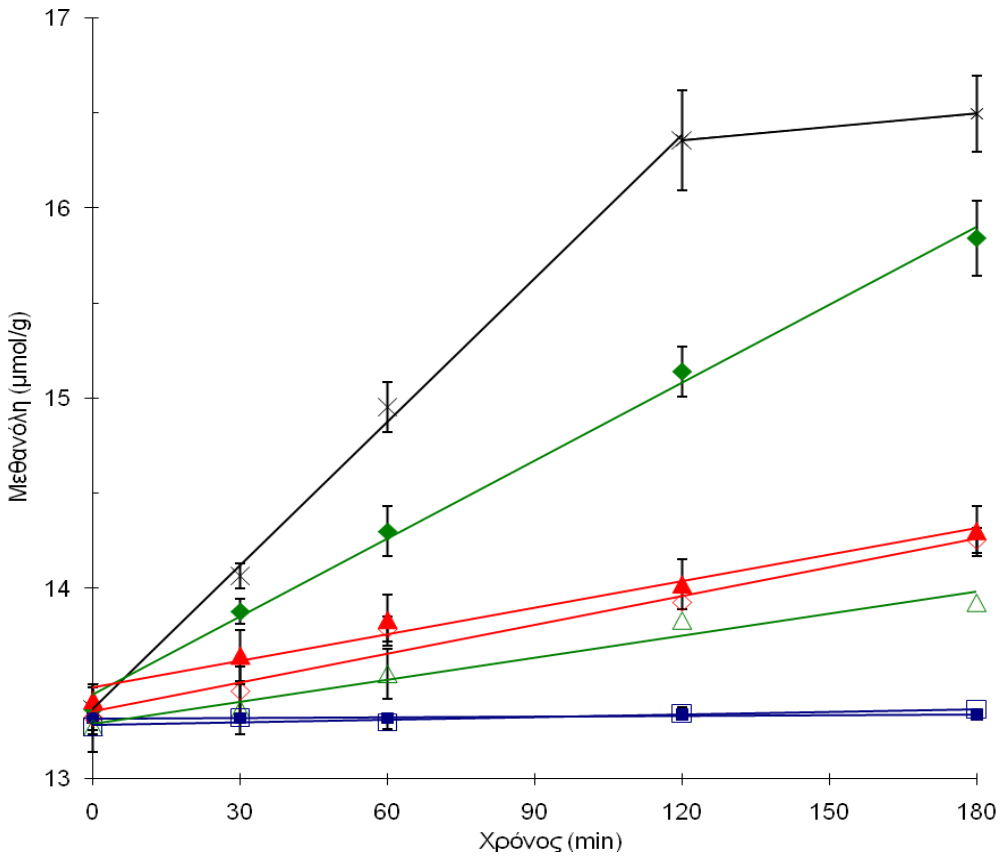
Η ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ ελέγχθηκε παρακολουθώντας την παραγωγή της μεθανόλης κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των αποβλήτων. Η έκλυση μεθανόλης στα απόβλητα δεν αποτελεί απόδειξη για την από-εστεροποίηση των πηκτινών, ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν υπάρχει κάποια άλλη γνωστή αντίδραση στους φυτικούς ιστούς (Anthon et al., 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της ΠΜΕ σε άθικτους ιστούς (Bartolome et al., 1972) και πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό της θερμικής ενεργοποίησής της στα πράσινα φασόλια και τις ντομάτες (Anthon et al., 2006).

Στο **Σχήμα 6.2** παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης μεθανόλης στα απόβλητα ελαιουργείου κατόπιν θερμικής επεξεργασίας αυτών για 3 h σε διάφορες θερμοκρασίες (50-80 ^{o}C). Ένα δείγμα ελέγχου επεξεργάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o}C). Η θέρμανση των αποβλήτων μεταξύ των 50 και 60 ^{o}C είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεθανόλης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου υποδεικνύοντας ενδεχόμενη από-εστεροποίηση των πηκτινών. Τα δεδομένα που προέκυψαν στους 25, 50, 55, 65, 70 και 80 ^{o}C μετά από 3 h και στους 60 ^{o}C μετά από 2 h επεξεργασία, προσαρμόστηκαν σε 7 ευθείες. Η ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης (όπως προκύπτει από την κλίση των ευθειών) αυξάνεται αυξανομένης της θερμοκρασίας μεταξύ των 25 και 60 ^{o}C (βλ. **Πίνακας 6.1**), ενώ για τις θερμοκρασίες μεταξύ 50 και 60 ^{o}C η δραστικότητα της ΠΜΕ αυξήθηκε 5 φορές. Η θέρμανση των αποβλήτων μεταξύ 60 και 80 ^{o}C προκάλεσε μείωση στην απελευθέρωση της μεθανόλης. Εξάλλου, η ταχύτητα σχηματισμού της μεθανόλης στους 65 ^{o}C δεν ήταν στατιστικά διαφορετική σε σχέση με την ταχύτητα στους 50 ^{o}C.

Πίνακας 6.1. Ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης κατά τη θερμική επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου.

Θερμοκρασία θέρμανσης	Ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης (*k*)	R^2
^{o}C	μmol·min/g	
25	$0,1 \pm 0,1^{\alpha}$	0,83
50	$5,0 \pm 0,3^{\beta,\gamma}$	0,98
55	$14,7 \pm 0,5^{\delta}$	>0,99
60	$27,4 \pm 0,7^{\varepsilon}$	>0,99
65	$5,4 \pm 0,3^{\beta}$	0,96
70	$4,2 \pm 0,8^{\gamma}$	0,96
80	$0,5 \pm 0,1^{\zeta}$	0,84

[*] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2). Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($p \leq 0,05$).



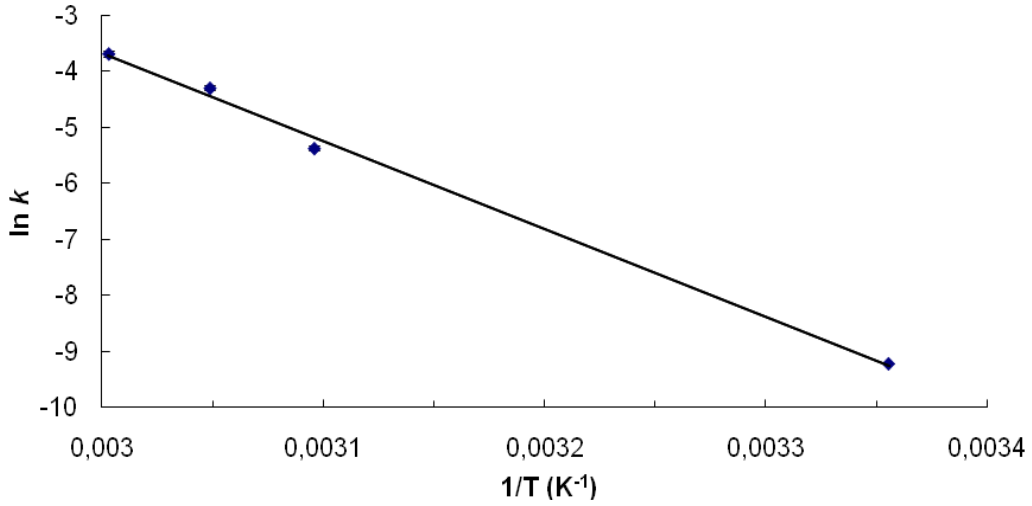
Σχήμα 6.2. Σχηματισμός μεθανόλης σε συνάρτηση με το χρόνο για διαφορικές θερμοκρασίες επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου: 25 (■), 50 (▲), 55 (◆), 60 (×), 65 (◇), 70 (△) και 80 ^{o}C (□). Παρουσιάζονται οι τιμές μέσου ± τυπική απόκλιση (δύο επαναλήψεις).

Η ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης στους 25 και 80 ^{o}C ήταν αμελητέα και παρόμοιου μεγέθους, υποδεικνύοντας μια δυναμική από-ενεργοποίηση του ενζύμου στους 80 ^{o}C. Εξάλλου, η χαμηλή τιμή του συντελεστή R^2 (0,83) που παρατηρήθηκε τόσο στους 25, όσο και στους 80 ^{o}C, οφείλεται στην αμελητέα απελευθέρωση μεθανόλης σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η θερμική ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ είναι πιθανή στα απόβλητα ελαιουργείου, παρά την υψηλή συγκέντρωση φαινολών, οι οποίες όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία δρουν ως αναστολείς έναντι εξωγενών πηκτινολυτικών ενζύμων από τον *Aspergillus niger* (Vierhuis et al., 2001). Μια πιθανή εξήγηση σχετίζεται με το γεγονός ότι τα ενδογενή ένζυμα του ελαιόκαρπου είναι πιο ανθεκτικά στις φαινόλες έναντι των εξωγενών παρασκευασμάτων ενζύμων.

Από την άλλη πλευρά, η μέγιστη δράση του ενδογενούς ενζύμου παρατηρήθηκε κατόπιν παρατεταμένης θερμικής επεξεργασία των αποβλήτων (120 min at 60 ^{o}C), γεγονός που υποδεικνύει ενδεχόμενη επιβράδυνση της βιοχημικής διεργασίας. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα (120 min) η ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης μειώθηκε σημαντικά, πιθανώς εξαιτίας κάποιας χρονικά εξαρτώμενης από-ενεργοποίησης του ενζύμου. Για παράδειγμα, οι Tijskens et al. (1997) αναφέρουν ότι η ΠΜΕ στην πατάτα

μπορεί να μετουσιωθεί εντελώς σε οποιαδήποτε θερμοκρασία μετά από αρκετό χρόνο. Αντίθετα, η ΠΜΕ στα ροδάκινα αναφέρεται ότι είναι πιο θερμοανθεκτική (Tijskens et al., 1999). Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται από τα πειράματα της διατριβής, η από-ενεργοποίηση του ενζύμου στα απόβλητα ελαιουργείου φαίνεται ότι πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 70-80 ^{o}C). Εξάλλου, οι παραπάνω θερμοκρασίες συμβαδίζουν με αντίστοιχες θερμοκρασίες για την ενεργοποίηση και την από-ενεργοποίηση της ΠΜΕ σε άλλους φυτικούς ιστούς. Για παράδειγμα, 60 min θερμικής επεξεργασίας στους 60 ^{o}C είναι αρκετά για την ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ στα φασόλια και τις ντομάτες (Anthon et al., 2006), ενώ η από-ενεργοποίηση της ΠΜΕ μπανάνας και μήλου συμβαίνει στους 70 και 75 ^{o}C, αντίστοιχα (Nguyen et al., 2002; Macdonald & Evans, 1996).

Η ενεργοποίηση των διαφόρων ενζύμων από τη θερμοκρασία περιγράφεται συνήθως από την εξίσωση Arrhenius (Nguyen et al., 2002). Στο **Σχήμα 6.3** παρουσιάζεται η ευθεία Arrhenius (R^2 ίσο με 0,997) που κατασκευάστηκε για τις ταχύτητες σχηματισμού μεθανόλης στις θερμοκρασίες μεταξύ 25 και 60 ^{o}C. Από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της ΠΜΕ που βρέθηκε ίση με 130 kJ/mol. Προηγούμενες μελέτες από-μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν στα πράσινα φασόλια, στις ντομάτες, στα μπιζέλια και τα καρότα, και αναφέρουν ενέργεια ενεργοποίησης ίση με 97, 112, 130 και 130 kJ/mol, αντίστοιχα (Anthon et al., 2006). Οι παραπάνω ενέργειες ενεργοποίησης μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους παρά τη διαφορετική φύση των υποστρωμάτων, αφού η αναλογία στερεών προς νερό σε αυτά είναι παρόμοια και ίση με 1:9. Όπως φαίνεται, η ενέργεια ενεργοποίησης στα απόβλητα ελαιουργείου είναι παρόμοια με αυτή στα μπιζέλια και τα καρότα, αλλά μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε στα πράσινα φασόλια και τις ντομάτες (34 και 16%, αντίστοιχα).



Σχήμα 6.3. Καμπύλη Arrhenius για την ταχύτητα σχηματισμού μεθανόλης από τα απόβλητα ελαιουργείου στους 25-60 ^{o}C. Παρουσιάζονται οι τιμές μέσο ± τυπική απόκλιση (δύο επαναλήψεις). "*k*" για "σταθερά ταχύτητας σχηματισμού" και "*T*" για "απόλυτη θερμοκρασία".

6.3. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στη διαλυτοποίηση, αποδόμηση και ανάκτηση πηκτινών

Στον **Πίνακα 6.2** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των υλικών AIR και συγκεκριμένα η απόδοση ανάκτησης, η διαλυτότητα τους στο νερό, η συγκέντρωση GalA, ο αντίστοιχος ΒΜ των πηκτινών και την ποσότητα της εστεροποιημένης μεθανόλης στις αλυσίδες GalA των πηκτινών. Η απόδοση ανάκτησης AIR αλλά και η αντίστοιχη συγκέντρωση GalA δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την επεξεργασία σε διάφορες θερμοκρασίες. Η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για το ΒΜ των περιεχόμενων πηκτινών.

Από την άλλη, η διαλυτότητα των υλικών AIR αυξήθηκε από 40,2 σε 55,1 g/100 g ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης θερμοκρασίας από 25 σε 80 ^{o}C. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η θερμοκρασία επεξεργασίας δεν επηρέασε σημαντικά την απόδοση των ανακτημένων πολυσακχαριτών. Μια παρόμοια παρατήρηση αναφέρεται από τους Sila et al. (2006) που δείξανε ότι η θερμική προ-επεξεργασία (40 και 60 ^{o}C) των καρότων πριν την απομόνωση του AIR δεν επηρέασε την ποσότητα του ανακτημένου GalA ανά βάρος υπολείμματος. Εξάλλου, οι πηκτίνες αποτελούν ένα μικρό μέρος (~5 g/100 g) του AIR που ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου. Τα υπόλοιπα συστατικά του υπολείμματος αναμένονται να είναι κατιόντα, ανιόντα, λιγνίνη, πρωτεΐνες, λίπη και έλαια, οργανικά οξέα και αμινοξέα (Galanakis et al., 2010a). Για παράδειγμα, το υπόλειμμα AIR που ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου, με παρόμοια μέθοδο, περιείχε ~33 g τέφρα και 25 g λιγνίνη Klason/100 g AIR (Galanakis et al., 2010c).

Επιπλέον, ο ΒΜ των πηκτινών του υπολείμματος AIR (π.χ. τόσο οι υδατοδιαλυτές, όσο και οι μη υδατοδιαλυτές πηκτίνες) δεν συμβαδίζει με το σχηματισμό μεθανόλης που προκύπτει από την ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2**. Αυτή η διαφορά στα αποτελέσματα μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι η αλλαγή του ΒΜ αφορά μόνο τις υδατοδιαλυτές πηκτίνες, αφού η ΠΜΕ αναμένεται να είναι δραστική κατά βάση σε υδατικό περιβάλλον. Για παράδειγμα, η ενέργεια ενεργοποίησης της ΠΜΕ στα πράσινα φασόλια και τις ντομάτες βρέθηκε 3 φορές μικρότερη, χρησιμοποιώντας μια υδατοδιαλυτή μορφή του ενζύμου (Anthon et al., 2006). Τα υδατοδιαλυτά κλάσματα των AIR χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω για τη διευκρίνηση αυτής της υπόθεσης.

Στον **Πίνακα 6.3** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των WSAIR σε σχέση με τη συγκέντρωση GalA, τον ΒΜ των περιεχόμενων πηκτινών, τη συγκέντρωση των ακόρεστων γαλακτουρονιδίων ανά βάρους GalA (εξαιτίας της *β*-αποδόμησης), την ποσότητα της εστεροποιημένης μεθανόλης στα μόρια των πηκτινών, αλλά και της απελευθερωμένης μεθανόλης από αυτά. Ο ΒΜ των υδατοδιαλυτών πηκτινών μειώθηκε από 78 σε 59 mol μεθανόλη/100 mol GalA, αυξάνοντας τη θερμοκρασία επεξεργασίας από 25 σε 60 ^{o}C.

Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων AIR που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου κατόπιν επεξεργασίας για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2).

Θερμοκρασία	AIR[a]	Διαλυτότητα	GalA[b]	BM[c]	Εστεροποιημένη μεθανόλη
^{o}C	(g/100 g)[d]	(g/100 g)[e]	(g/100 g)[e]	(mol/100 mol)[f]	(μmol/g)[g]
25	2,7 ± 0,1[*]	40,2 ± 0,3	4,9 ± 0,2[*]	83 ± 1[*]	5,7 ± 0,1[*]
50	2,8 ± 0,1[*]	43,3 ± 0,4	5,0 ± 0,1[*]	85 ± 1[*]	6,1 ± 0,2
55	2,7 ± 0,1[*]	44,6 ± 0,2	4,9 ± 0,1[*]	82 ± 2[*]	5,6 ± 0,1[*]
60	2,7 ± 0,1[*]	45,9 ± 0,4	4,8 ± 0,1[*]	83 ± 2[*]	5,5 ± 0,1[*]
65	2,8 ± 0,1[*]	47,5 ± 0,3	5,0 ± 0,1[*]	81 ± 2[*]	5,8 ± 0,1[*]
70	2,8 ± 0,1[*]	50,4 ± 0,2	4,8 ± 0,2[*]	82 ± 3[*]	5,7 ± 0,1[*]
80	2,7 ± 0,1[*]	55,1 ± 0,3	4,8 ± 0,1[*]	85 ± 3[*]	5,7 ± 0,2[*]

[a] "AIR" για "αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη". [b] "GalA" για "γαλακτουρονικό οξύ". [c] "BM" για "βαθμός μεθυλίωσης". [d] g γαλακτουρονικού οξέος ανά 100 g φρέσκων αποβλήτων ελαιουργείου. [e] g γαλακτουρονικού οξέος ανά 100 g αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη. [f] mol μεθανόλης ανά 100 mol γαλακτουρονικού οξέος. [g]μmol εστεροποιημένης μεθανόλης που περιέχονται στο αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη ανά g αποβλήτων ελαιουργείου. [*] Οι τιμές κάθε στήλης με αστέρι δεν είναι στατιστικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p \leq 0,05$).

Πίνακας 6.3. Χαρακτηριστικά των υδατοδιαλυτών, αδιάλυτων στην αιθανόλη υπολειμμάτων που ανακτήθηκαν από δείγματα αποβλήτων ελαιουργείου και επεξεργάστηκαν για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2).

Θερμοκρασία	GalA[a]	GalA[a]	BM[b]	Εστεροποιημένη μεθανόλη	Απελευθερωμένη μεθανόλη	4,5-ακόρεστα γαλακτουρονίδια
^{o}C	(g/100 g)[c]	(g/100 g)[d]	(mol/100 mol)[e]	(μmol/g)[f]	(μmol/g)[g]	mol / mol GalA[a]
25	6,2 ± 0,2[i]	50,9 ± 0,4[i]	78 ± 2[i]	2,7 ± 0,1[i]	—	0,22 ± 0,02[i]
50	7,6 ± 0,2[j]	65,8 ± 0,2[j]	73 ± 1[j]	3,5 ± 0,2[j]	0,2 ± 0,1[i]	δ.π.[h]
55	8,2 ± 0,1[k]	74,6 ± 0,3[k]	62 ± 1[k]	3,2 ± 0,1[j]	0,8 ± 0,2[j]	δ.π.[h]
60	8,7 ± 0,2[l]	83,2 ± 0,4[l]	59 ± 1[l]	3,3 ± 0,2[j]	1,1 ± 0,2[k]	0,24 ± 0,01[i]
65	7,8 ± 0,1[j]	74,1 ± 0,2[k]	64 ± 2[k]	3,4 ± 0,1[j]	0,7 ± 0,2[j]	δ.π.[h]
70	7,6 ± 0,1[j]	79,8 ± 0,3[m]	65 ± 3[k]	3,6 ± 0,1[j]	0,7 ± 0,1[j]	δ.π.[h]
80	7,3 ± 0,1[m]	83,8 ± 0,4[l]	71 ± 2[j]	4,0 ± 0,1[k]	0,4 ± 0,1[l]	0,25 ± 0,02[i]

[a] "GalA" για "γαλακτουρονικό οξύ". [b] "BM" για "βαθμό μεθυλίωσης". [c] g γαλακτουρονικό οξύ ανά 100 g υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος. [d] g γαλακτουρονικό οξύ ανά 100 g γαλακτουρονικού οξέος που περιέχονται σε ολόκληρο το αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη. [e] mol μεθανόλης ανά 100 mol γαλακτουρονικού οξέος. [f] μmol εστεροποιημένης μεθανόλης που περιέχεται στο υδατοδιαλυτό, αδιάλυτο στην αιθανόλη υπόλειμμα ανά g αποβλήτων ελαιουργείου. [g] μmol απελευθερωμένης μεθανόλης από το υδατοδιαλυτό, αδιάλυτο στην αιθανόλη υπόλειμμα ανά g αποβλήτων ελαιουργείου. [h] δεν προσδιορίσθηκαν. [i-m] Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($p \leq 0,05$).

Η θέρμανση των αποβλήτων σε μεγαλύτερη θερμοκρασία (από 60 σε 80 ^{o}C), επαύξησε τον BM από 59 σε 71 mol μεθανόλης/100 mol GalA. Ο BM των υδατοδιαλυτών πηκτινών συμβαδίζει με τα *in situ* πειράματα απελευθέρωσης μεθανόλης, αφού ο μικρότερος BM και η υψηλότερη ποσότητα απελευθερωμένης μεθανόλης συμπίπτουν με την μεγαλύτερη δραστικότητα της ΠΜΕ στους 60 ^{o}C. Παρόλα αυτά, η ποσότητα της απελευθερωμένης μεθανόλης (1,1 μmol/g) από τα δείγματα WSAIR, στους 60 ^{o}C δεν συμπίπτει με την αύξηση της συγκέντρωσης μεθανόλης στα απόβλητα για την ίδια θερμοκρασία (**Σχήμα 6.2**, από 13,3 σε 16,4 μmol/g). Η παρατηρούμενη διαφορά μπορεί να οφείλεται σε ενδεχόμενο μη-ενζυμικό σχηματισμό της μεθανόλης ή στη χαμηλή ευαισθησία της φασματοφωτομετρικής μεθόδου προσδιορισμού.

Η θερμική επεξεργασία φαίνεται να επηρεάζει την διαλυτοποίηση των πηκτινών. Συγκεκριμένα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία από 25 σε 60 ^{o}C, αυξήθηκε η συγκέντρωση GalA στο υπόλειμμα WSAIR κατά 40% (από 6,2 σε 8,7 g/100 g). Επιπλέον, το GalA που διαλυτοποιήθηκε από το υπόλειμμα AIR αυξήθηκε κατά 64% (από 50,9 σε 83,2 g/ 100 g GalA που περιέχονται στο AIR, αντίστοιχα). Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας επεξεργασίας (από 60 σε 80 ^{o}C) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης GalA κατά 16%. Ωστόσο, το ποσοστό GalA που ανακτήθηκε από το AIR δεν ήταν στατιστικά διαφορετικό συγκρίνοντας τα δεδομένα που προήλθαν στους 60 και 80 ^{o}C.

Η μείωση της περιεκτικότητας σε GalA για υψηλές θερμοκρασίες (60-80 ^{o}C) θα μπορούσε να ερμηνευτεί από την αυξημένη διαλυτότητα άλλων συστατικών του AIR σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, ένα υλικό που ανακτήθηκε από τα ίδια απόβλητα ελαιουργείων με παρόμοια μέθοδο περιέχει 46 g τέφρας και 10 g K^{+}/100 g WSAIR (Galanakis et al., 2010c). Έτσι, η αυξημένη διαλυτοποίηση άλλων συστατικών όπως κατιόντα θα μπορούσε να μειώσει το ποσοστό βάρους του GalA στο κλάσμα WSAIR. Από την άλλη, αυτή η υπόθεση δεν μπορεί να εξηγήσει την αύξηση που προέκυψε στη συγκέντρωση GalA για χαμηλότερες θερμοκρασίες: η διαλυτότητα του AIR αυξήθηκε από 40,0 σε 45,9 g/100 g, αυξανομένης της θερμοκρασίας επεξεργασίας από 25 στους 60 ^{o}C (**Πίνακας 6.2**). Η ποσότητα των ακόρεστων γαλακτουρονιδίων δεν επηρεάστηκε στατιστικά από την θερμική επεξεργασία στους 60 ή 80 ^{o}C (**Πίνακας 6.3**), υποδεικνύοντας απουσία *β*-αποδόμησης των πηκτινών. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το όξινο περιβάλλον των δειγμάτων WSAIR (pH~5) και τις σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες επεξεργασίας, π.χ. η *β*-αποδόμηση επιταχύνεται άνω των 85 ^{o}C (Diaz et al., 2007).

Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες. Οι Femenia et al. (1999) πρότειναν ότι η θερμική επεξεργασία του κουνουπιδιού οδηγεί σε ενζυμική από-εστεροποίηση και αυξημενή ανάκτηση πολυσακχαριτών, ενώ το βράσιμο του υποστρώματος μπορεί επίσης να αυξήσει την ανάκτηση μέσω της αποδόμησης των εστεροποιημένων πηκτινών. Από την άλλη, ο μειωμένος ΒΜ επιβραδύνει τη διαλυτοποίηση των πηκτινών, εξαιτίας της συμπλοκοποίησης τους με το ενδογενές Ca^{2+} και τη συνακόλουθη ζελοποίησή τους (Sajjanantakul et al., 1993). Επιπλέον, μια άλλη μελέτη στα καρότα έδειξε ότι η εκχύλιση υδατο-διαλυτών πηκτινών μειώθηκε μειωμένου του ΒΜ, ενώ αυτή των αλκαλο-διαλυτών πηκτινών αυξήθηκε (Sila et al., 2006). Γενικώς, η διαλυτοποίηση των πηκτινών συνοδεύεται μερικώς με τη διάσπαση των πηκτινών. Εξάλλου, η δομή των πηκτινών υψηλού ΒΜ αλλοιώνεται εύκολα σε υψηλές θερμοκρασίες (Morris et al., 2002). Οι πηκτίνες των δειγμάτων AIR κατέχουν υψηλό ΒΜ (82-86 mol μεθανόλης/100 mol GalA) και έτσι αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για τη διεργασία αποδόμησης. Ωστόσο, η *β*-αποδόμηση δεν προχώρησε στις θερμοκρασίες που εξετάστηκε (60 ή 80 ^{o}C).

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ένας άλλος μηχανισμός αποδόμησης συντέλεσε στη διαλυτοποίηση των πηκτινών. Όπως είναι ευρέως γνωστό, η από-εστεροποίηση μειώνει την ευαισθησία των πηκτινών για *β*-αποδόμηση και αυξάνει την πιθανότητα όξινης υδρόλυσης αυτών (Fraeye et al., 2007). Η απο-εστεροποίηση μπορεί επίσης να προκαλέσει απώλειες του ΜΒ των πλευρικών αλυσίδων των πηκτινών (Morris et al, 2002). Αυτοί οι μηχανισμοί θα μπορούσαν να επικρατήσουν στο περιβάλλον των αποβλήτων και έτσι να συντελέσουν στη διαλυτοποίηση των πηκτινών από τους 25 στους 60 °C. Αυτό το συμπέρασμα είναι σημαντικό να επισημανθεί, αφού το ΜΒ των πηκτινών επηρεάζει τόσο το ιξώδες όσο και τις ιδιότητες ζελοποίησης του υλικού (Kar & Arslan, 1999).

6.4. Επίδραση της θερμοκρασίας επεξεργασίας στις ιδιότητες ενυδάτωσης και ζελοποίησης του ανακτημένου υλικού

Οι ιδιότητες ενυδάτωσης των ινών που περιέχονται σε ένα υλικό σχετίζονται με την ικανότητα αυτού να διατηρεί νερό μέσα στη δομή του (Figuerola et al., 2005). Στον **Πίνακα 6.4** παρουσιάζεται η διόγκωση όλου του AIR (π.χ. τόσο του WSAIR, όσο και του WIAIR) που εκφράστηκε ως mL νερού ανά g AIR και η WRC των δειγμάτων WSAIR όπως εκφράστηκαν σε g νερού ανά g WIAIR για τα υλικά που ανακτήθηκαν κατόπιν επεξεργασίας στους 25, 60 και 80 ^{o}C. Οι υψηλότερες τιμές και για τις δύο παραμέτρους σημειώθηκαν για τα υλικά που επεξεργάστηκαν στους 25 ^{o}C και οι χαμηλότερες στους 60 ^{o}C. Πιο συγκεκριμένα, η διόγκωση και η WRC μειώθηκαν αυξανομένης της διαλυτοποίησης πηκτινών στο νερό, η οποία πήρε τη βέλτιστη τιμή στους 60 °C. Εξάλλου, παρασκευάσματα ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση χυμού μήλου αύξησαν τη διόγκωση αλλά μείωσαν τη WRC, πιθανότατα εξαιτίας κάποιας απώλειας στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Kosmala et al., 2010).

Πίνακας 6.4. Ικανότητα συγκράτησης νερού του υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος και διόγκωση των αδιάλυτων υπολειμμάτων στην αιθανόλη, όπως ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου που επεξεργάστηκαν για 180 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2).

Θερμοκρασία	Χωρητικότητα συγκράτησης νερού (WRC)	Διόγκωση
^{o}C	g/g WIAIR[a]	mL/g AIR[b]
25	4,9 ± 0,1[c]	6,3 ± 0,1[c]
60	4,2 ± 0,1[d]	5,6 ± 0,1[d]
80	4,5 ± 0,1[e]	6,0 ± 0,1[e]

[a] "WIAIR" για "υδατοδιαλυτό, αδιάλυτο στην αιθανόλη υπόλειμμα". [b] "AIR" για "αδιάλυτο υπόλειμμα στην αιθανόλη". [c-e] Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p \leq 0,05$).

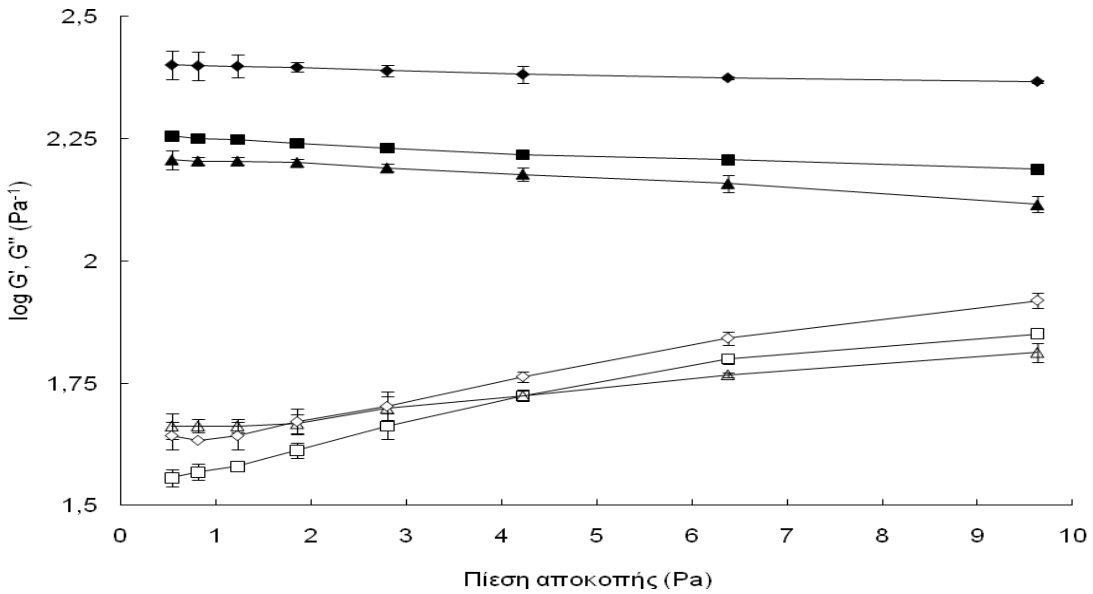
Παρόλα αυτά, οι αυξημένες τιμές της WRC μπορεί να σχετίζονται με τις αυξημένες ποσότητες των αδιάλυτων ινών στα υπό εξέταση υλικά (Femenia et al., 1997). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ποσότητα των αδιάλυτων ινών είναι μικρότερη στους 60°C και έτσι παρατηρείται και η χαμηλότερη τιμή WRC, καθώς οι υδατοδιαλυτές πηκτίνες έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε αυτή τη θερμοκρασία (**Πίνακας 6.3**) και το άθροισμα των υδατοδιαλυτών και μη-υδατοδιαλυτών πηκτινών είναι περίπου το ίδιο σε όλες τις θερμοκρασίες (**Πίνακας 6.2**). Από την άλλη, η διόγκωση αντιπροσωπεύει την ικανότητα και των δύο κλασμάτων του AIR να συγκρατούν το νερό. Επομένως, η χαμηλότερη τιμή διόγκωσης που παρατηρήθηκε για το υλικό που επεξεργάστηκε στους 60 ^{o}C, θα μπορούσε να είναι μια ένδειξη ενδεχόμενης απώλειας στις ιδιότητες ζελοποίησης των υδατοδιαλυτών πηκτινών. Εξάλλου, οι ιδιότητες ενυδάτωσης των ινών είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη ρεολογική συμπεριφορά εναιωρημάτων αποδίδοντας υψηλή αντοχή στην πίεση, υψηλό ιξώδες και ελαστικότητα (Kunzek et al., 1999). Για αυτό το σκοπό, ανακτήθηκε το υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR και μελετήθηκαν περαιτέρω οι ιδιότητες ζελοποίησής του.

Στο **Σχήμα 6.4** φαίνονται οι συντελεστές «αποθήκευσης» και «απώλειας» (G' και G'', αντίστοιχα) των ζελέ που προετοιμάστηκαν από τα δείγματα WSAIR (με την ίδια συγκέντρωση GalA: 1,5 g/100 g), συναρτήσει της τάσης διάτμησης. Τα ζελέ είχαν διαφορετική περιεκτικότητα υλικού WSAIR (34,5, 41 και 48,5 g/100 mL) και διαφορετικό ΒΜ πηκτινών (59, 71 και 78 mol μεθανόλης/100 mol GalA) για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 60, 80 και 25 ^{o}C, αντίστοιχα. Το pH για όλα τα ζελέ ήταν όξινο (pH = 5,0 ± 0,1). Το μέγεθος των συντελεστών αποθήκευσης αυξήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά θερμικής επεξεργασίας: 80 > 25 > 60 ^{o}C. Οι τιμές των συντελεστών απώλειας έδειξαν την ίδια τάση για τις τιμές των πιέσεων αποκοπής μεταξύ 6 και 10 Pa, αλλά τείνουν να συμπίπτουν στις χαμηλότερες πιέσεις. Επιπλέον, οι εφαπτόμενες απωλειών (loss tangent, $\tan\delta = G''/G'$) τείνουν να συμπίπτουν σε χαμηλότερες πιέσεις. Η εφαπτομένη απωλειών είναι μια δυναμική ιδιότητα που καταγράφει τις σχετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιξωδών και ελαστικών συστατικών και μπορεί να θεωρηθεί ως ένα καλό κριτήριο για ανίχνευση του σημείου ζελοποίησης όταν η συχνότητα ταλάντευσης είναι χαμηλή (Gunasekaran et al., 2000). Η εφαπτομένη απωλειών των δοκιμασμένων ζελέ αυξήθηκε με την ίδια σειρά.

Οι πηκτίνες που επεξεργάστηκαν στους 60 ^{o}C δημιούργησαν ζελέ με μικρότερη ελαστικότητα και δύναμη σε σχέση με τα άλλα υλικά, παρά την ενεργοποίηση της ΠΜΕ σε αυτή τη θερμοκρασία. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αντίθετο με τη δράση άλλων φυτικών ΠΜΕ, π.χ. η ΠΜΕ πορτοκαλιών προκαλεί μέτρια μείωση του ΒΜ, αλλά γρήγορη αύξηση του «βαθμού κάλυψης» (degree of blockiness) με αποτέλεσμα την πολύ γρήγορη δημιουργία δυνατών ζελέ (Slavov et al., 2009). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παραπάνω υπόθεση για την μερική αποδόμηση των ελαιο-πηκτινών στους 60 ^{o}C φαίνεται να είναι σωστή. Εξάλλου, όσο πιο ψηλό είναι το ΜΒ των πηκτινών, τόσο πιο

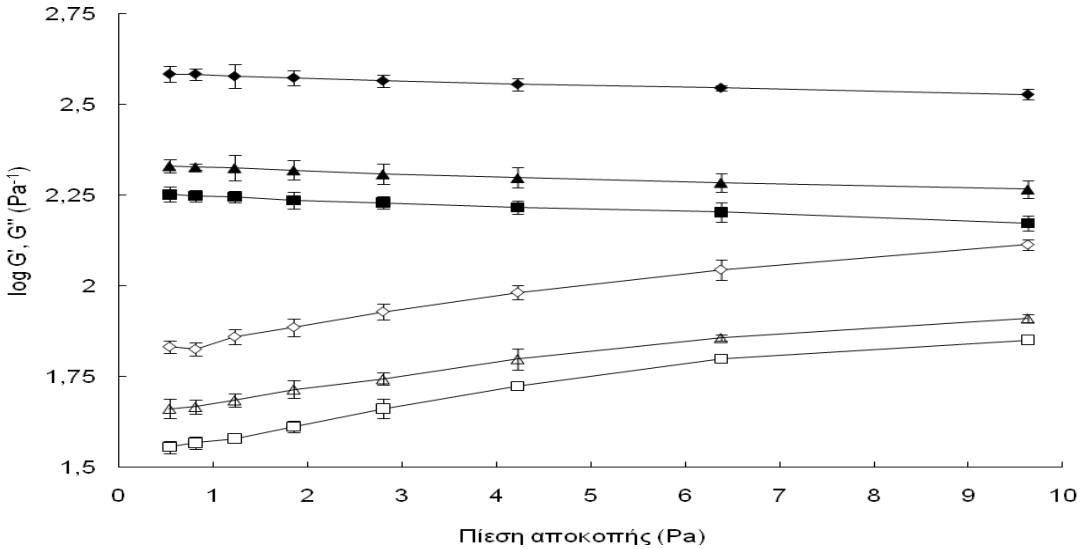
υψηλό είναι το ιξώδες των ζελέ και έτσι οι ιδιότητες ζελοποίησης είναι καλύτερες (Kar et al., 1999).

Από την άλλη, οι πηκτίνες που επεξεργάστηκαν στους 80 ^{o}C, έδειξαν καλύτερη ζελοποίηση σε σχέση με αυτές που επεξεργάστηκαν στους 25 ^{o}C. Αυτή η διαφορά μπορεί να σχετίζεται με το χαμηλότερο ΒΜ (71 και 78 mol μεθανόλης/100 mol GalA, αντίστοιχα) ή άλλους παράγοντες όπως τη διαφορετική δομή των πηκτινών και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα συστατικών WSAIR (41 και 48,5 g/100 mL, αντίστοιχα). Εξάλλου, τα δύο δείγματα δεν αναμένεται να έχουν διασπαστεί εκτενώς, όπως στην περίπτωση των 60 ^{o}C. Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας αποδεικνύουν ότι η βέλτιστη επεξεργασία για την ανάκτηση πηκτινών με καλύτερες ιδιότητες ζελοποίησης από τα απόβλητα ελαιουργείου είναι αυτή των 180 min στους 80 ^{o}C. Τα υλικά WSAIR μπορούν να δημιουργήσουν ζελέ παρά τον υψηλό ΒΜ και την απουσία προστιθέμενων σακχάρων ή οξέος. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε αντίθεση με τις ιδιότητες ζελοποίησης των πηκτινών υψηλής μεθυλίωσης άλλων πηγών. Για παράδειγμα, υψηλά μεθυλιωμένες πηκτίνες που ανακτήθηκαν με ένζυμα από πορτοκάλια και ραδίκια ζελοποιήθηκαν παρουσία σακχαρόζης και όξινου pH (Zykwinska et al. 2009). Από την άλλη, οι υψηλά μεθυλιωμένες πηκτίνες (π.χ 70 mol μεθανόλη/100 mol GalA) μπορούν να ζελοποιηθούν ακόμα και απουσία σακχάρων, αν υπάρχει ο κατάλληλος «βαθμός κάλυψης», όπως πρόσφατα αποδείχτηκε από τους Slavov et al., (2009).



Σχήμα 6.4. Log *G'* (Pa^{-1}) (γεμάτα σύμβολα) και log *G''* (κενά σύμβολα) (Pa^{-1}) των ζελέ (1.5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει της τάσης διάτμησης (Pa). Τα υλικά ζελοποίησης ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων μετά από επεξεργασία 180 min στους 25 (τετράγωνα), 60 (τρίγωνα) και 80 ^{o}C (ρόμβοι). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2). Τα σύμβολα *G'* και *G''* αντιστοιχούν στους συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας, αντίστοιχα.

Στο **Σχήμα 6.5** παρουσιάζονται οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας (*G′* και *G″*, αντίστοιχα) των ζελέ που προετοιμάστηκαν από τα δείγματα WSAIR (με την ίδια περιεκτικότητα υπολείμματος: 25 g/100 mL) συναρτήσει της τάσης διάτμησης. Τα ζελέ είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις GalA (1,5, 1,8 και 2,3 g/100 mL) και διαφορετικό ΒΜ πηκτινών (78, 71 και 59 mol μεθανόλης/100 mol GalA) για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 25, 80 και 60 ^{o}C, αντίστοιχα. Το pH όλων των ζελέ ήταν όξινο (pH = 5,0 ± 0,1). Το μέγεθος και των δύο παραμέτρων αυξήθηκε με την ακόλουθη σειρά θερμικής επεξεργασίας: 80 > 60 > 25 ^{o}C, ενώ η εφαπτομένη απωλειών ήταν ίδια (0,29) για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 60 και 25 ^{o}C, και λίγο μικρότερη (0,24) στους 80 ^{o}C. Τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 60 και 80 ^{o}C δημιούργησαν τα πιο ισχυρά ζελέ σε σχέση με αυτό στους 25 ^{o}C, κυρίως ως αποτέλεσμα της υψηλότερης συγκέντρωσης GalA (53 και 20%, αντίστοιχα). Από την άλλη, το δείγμα που επεξεργάστηκε στους 80 ^{o}C έδειξε την καλύτερη λειτουργικότητα ζελοποίησης (δύναμη και ελαστικότητα) σε σχέση με αυτό στους 60 ^{o}C, παρά την μικρότερη συγκέντρωση GalA. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η θερμοκρασία των 80 ^{o}C είναι βέλτιστη σε σχέση με τις ιδιότητες ζελοποίησης των ανακτημένων πηκτινών. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς το WSAIR προτείνεται για απευθείας εφαρμογή ως παράγοντας ζελοποίησης και υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (Galanakis et al., 2010c).



Σχήμα 6.5. Log *G′* (Pa^{-1}) (γεμάτα σύμβολα) και log *G″* (κενά σύμβολα) (Pa^{-1}) των ζελέ (25 g υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος/100 mL) συναρτήσει της τάσης διάτμησης (Pa). Τα υλικά ζελοποίησης ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων μετά από επεξεργασία 180 min στους 25 (τετράγωνα), 60 (τρίγωνα) και 80 ^{o}C (ρόμβοι). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2). Τα σύμβολα *G′* και *G″* αντιστοιχούν στους συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας, αντίστοιχα.

6.5. Χαρακτηρισμός αποβλήτων ελαιουργείου και προεπεξεργασία αυτών

Στον **Πίνακα 6.5** φαίνεται η σύνθεση των αποβλήτων ελαιουργείου που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή. Τα απόβλητα ήταν ένα όξινο υδατικό μείγμα (pH ίσο με 5 και COD περίπου 140 g/L) που αποτελείται από υψηλό φαινολικό φορτίο (6033 mg/L) και σημαντική περιεκτικότητα ελαίων (0,89 g/100 g). Δύο στάδια προ-επεξεργασίας των αποβλήτων αναπτύχθηκαν ώστε να απομακρυνθούν μερικώς τα έλαια και να μειωθεί η περιεκτικότητα νερού. Το πρώτο στάδιο προ-επεξεργασίας περιελάμβανε φυγοκέντριση των αποβλήτων και το δεύτερο μια διεργασία συμπύκνωσης στους 80 ^{o}C για 2-3 h. Αυτή η σχετικά υψηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε αντί για τους 50-60 ^{o}C ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση της ενδογενούς ΠΜΕ (Galanakis et al., 2010e). Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ελαίων κατά 39%, από 9,15 σε 5,55 g/100 g ξ.β. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση κατά 15% των ολικών στερεών ανά βάρος αποβλήτων (από 8,80 σε 7,45 g/100 g). Η διεργασία συμπύκνωσης είχε ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης ελαίων και ολικών στερεών κατά 4 φορές περίπου. Το προκύπτον μείγμα είχε υψηλή συγκέντρωση στερεών (μέχρι 29,0 g/100 g) και μικρότερη περιεκτικότητα νερού (69,7 g/100 g), ενώ η συγκέντρωση ελαίου αυξήθηκε ακόμα σε αξιοσημείωτο επίπεδο (1,3 g/100 g). Η συγκέντρωση ολικών φαινολών αυξήθηκε κατά 3 φορές (21731 mg/L) σε σχέση με το αρχικό δείγμα αποβλήτων, με αποτέλεσμα το τελικό μείγμα να είναι πολύ πλούσιο σε αντιοξειδωτικά συστατικά.

6.6. Ανάπτυξη μεθόδου ανάκτησης

Η απομόνωση του υλικού των ινών βασίστηκε στην επεξεργασία των συμπυκνωμένων αποβλήτων με διαφορετικούς συνδυασμούς EtOH και οξέων, πριν την κατακρήμνιση του AIR με 85 mL EtOH/100 mL υπό βρασμό (**Σχήμα 5.1**). Τα υπολείμματα AIR που ανακτήθηκαν με διάφορους συνδυασμούς εκχυλιστικών και τα αντίστοιχα υδατοδιαλυτά κλάσματα αυτών προσδιορίσθηκαν και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.6**.

Η ποσότητα του AIR που ανακτήθηκε από τη διεργασία ελέγχου (χωρίς την προσθήκη κάποιου μίγματος εκχύλισης) ήταν 2,8 g/100 g νωπών αποβλήτων ελαιουργείου και 29,0 g/100 g ξ.β. αποβλήτων ελευθέρου ελαίων. Η προσθήκη EtOH σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μέχρι 20 mL/100 mL) κατά τη διάρκεια της εκχύλισης πριν το στάδιο της κατακρήμνισης, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανάκτηση του υλικού AIR (44-63 g/100 g ξ.β.). Η ποσότητα του ανακτημένου AIR αυξήθηκε μέχρι 6,0 g/100 g αυξάνοντας τη συγκέντρωση EtOH στα 5 mL/100 mL. Το AIR που ανακτήθηκε από αυτή τη διεργασία ήταν 62,8 g/100 g ξ.β. αποβλήτων ελαιουργείου. Αυτή η τιμή είναι διπλάσια σε σχέση με το υπόλειμμα που ανακτήθηκε από τη διεργασία ελέγχου. Ωστόσο, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης EtOH μείωσε τη ποσότητα του ανακτημένου AIR. Η EtOH μπορεί να δράσει ως επιφανειο-δραστικό και έτσι να βοηθήσει την εκχύλιση των πολυσακχαριτών από το αδιάλυτο μέρος, διεισδύοντας στην τριχοειδή

πορώδη δομή των φυτικών ιστών. Παρόλα αυτά, η απαίτηση για βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης EtOH σε σχέση με την απόδοση του ανακτημένου AIR μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η EtOH επιταχύνει όχι μόνο την εκχύλιση, αλλά και τη διάσπαση των πολυσακχαριτών με αποτέλεσμα να είναι πιο ευάλωτοι έναντι των διαλυτών οξέων (Kirtchev et al., 1989). Από την άλλη, η συγκέντρωση EtOH των 7 mL/100 mL έδωσε ικανοποιητική ανάκτηση AIR, με περισσότερη εκχύλιση του υδατοδιαλυτού κλάσματος AIR.

Πίνακας 6.5. Χαρακτηριστικά των αποβλήτων ελαιουργείου πριν και μετά την προ-επεξεργασία αυτών.

Παράμετρος	Unit	Δείγμα		
		Ως έχει[a]	Μετά την απομάκρυνση ελαίων[a]	Μετά την συμπύκνωση[a]
Νερό	g/100 g	90,31 ± 0,06	92,12 ± 0,85	69,66 ± 0,86
Λίπη και έλαια	g/100 g	0,89 ± 0,05	0,44 ± 0,03	1,34 ± 0,14
Λίπη και έλαια	g/100 g ξβ[b]	9,15 ± 0,49	5,55 ± 0,24	4,42 ± 0,41
Ολικά στερεά (χωρίς λίπη)	g/100 g	8,80 ± 0,09	7,45 ± 0,81	29,00 ± 0,78
pH		5,00 ± 0,01	4,86 ± 0,02	4,88 ± 0,02
COD[c]	mg/L	140123 ± 110	135523 ± 401	400333 ± 3350
Ολικές φαινόλες	mg/L	6033 ± 43	6474 ± 183	21731 ± 197

[a] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2).
[b] "ξβ" για "ξηρό βάρος αποβλήτων ελαιουργείου".
[c] "COD" για "χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο".

Πίνακας 6.6. Η επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης με ή χωρίς την παρουσία κιτρικού και νιτρικού οξέως, αντίστοιχα, στην απόδοση του αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη και στο υδατοδιαλυτό κλάσμα αυτού.

Εκχυλιστικό μίγμα	AIR[a] (g/100 g)[c, f]	AIR[a] (g/100 g)[d, f]	Υδατοδιαλυτό AIR[b] (g/100 g)[e, f]
Χωρίς (μόνο κατακρήμνιση)	2,8 ± 0,1[h]	29,0 ± 1[h]	63 ± 1[h]
3 mL EtOH[g]/100 mL	5,1 ± 0,3[i]	53,0 ± 3[i]	63 ± 3[h]
5 mL EtOH[g]/100 mL	6,0 ± 0,1[j]	62,8 ± 1[j]	65 ± 1[h]
7 mL EtOH[g]/100 mL	5,5 ± 0,4[i]	56,4 ± 4[i]	70 ± 2[i]
10 mL EtOH[g]/100 mL	5,0 ± 0,2[i]	50,6 ± 2[i]	57 ± 1[j]
15 mL EtOH[g]/100 mL	4,6 ± 0,2[k]	46,7 ± 2[k]	56 ± 2[j]
20 mL EtOH[g]/100 mL	4,3 ± 0,1[k]	43,7 ± 1[l]	54 ± 1[j]
5 mL EtOH[g] και 1 mL π. HNO_3/100 mL	4,5 ± 0,6[k]	47,5 ± 7[k]	65 ± 2[h]
5 mL EtOH[g] και 1 g κιτρικού οξέος/100 mL	6,3 ± 0,1[j]	64,8 ± 1[m]	64 ± 2[h]

[a] "AIR" για "υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη". [b] "υδατοδιαλυτό AIR" για "υδατοδιαλυτό, αδιάλυτο στην αιθανόλη, υπόλειμμα". [c] Το AIR εκφράζεται ως g/100 g φρέσκων αποβλήτων ελαιουργείου. [d] AIR εκφράζεται ως g/100 g αποβλήτων ελαιουργείου ξηρού βάρους (χωρίς τα λίπη). [e] Τα υδατοδιαλυτά κλάσματα των AIR εκφράζονται ως g/100 g ολικού AIR. [f] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2). [g] "EtOH" για "αιθανόλη". [h-m] Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p \leq 0,05$).

Γενικώς, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ένα μέρος της EtOH που χρησιμοποιείται στο στάδιο της κατακρήμνισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διεργασία εκχύλισης με ταυτόχρονη αύξηση της απόδοσης ανάκτησης του υλικού. Μια πιθανή εξήγηση σχετίζεται με το γεγονός ότι μερικές ίνες των φυτικών ιστών βρίσκονται ενωμένες με τις φαινόλες (Bravo et al., 1994). Οι φαινόλες είναι γενικώς διαλυτές στο νερό και την EtOH (Obied et al., 2005) και πιθανώς κάποιες από τις ενωμένες ίνες δεν κατακρημνίστηκαν μετά την προσθήκη EtOH μέχρι τη συγκέντρωση των 85 mL/100 mL. Ένα επιπλέον στάδιο εκχύλισης με χαμηλές συγκεντρώσεις EtOH θα μπορούσε να διαχωρίσει τα συμπλέγματα φαινολών και ινών, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του υπολείμματος μετά το στάδιο της κατακρήμνισης. Οι Kirtchev et al. (1989) αναφέρουν ότι η προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων (1-3 mL/100 mL) αλκοολών χαμηλού M.B. στο όξινο μίγμα εκχύλισης, οδηγεί στην επιτάχυνση της εκχύλισης και στην αύξηση της απόδοσης πηκτινών από μίγματα πεπιεσμένων μήλων.

Ακολουθώντας αυτή τη λογική, η EtOH (στη βέλτιστη συγκέντρωση των 5 mL/100 mL) διερευνήθηκε σε συνδυασμό με κιτρικό και νιτρικό οξύ. Η προσθήκη 1 g κιτρικού οξέος/100 mL στο αιθανολικό μίγμα εμπλούτισε την ανάκτηση AIR, ενώ το υδατοδιαλυτό κλάσμα ήταν σχετικά ίδιο. Αντίθετα, η προσθήκη νιτρικού οξέος μείωσε την ανάκτηση AIR από 6,0 σε 4,5 g/100 g, ενώ το υδατοδιαλυτό κλάσμα παρέμεινε σταθερό. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης των χρησιμοποιημένων οξέων. Το κιτρικό οξύ μπορεί να δεσμεύσει το Ca^{2+} (Keally, 2006) και ακολούθως να περιορίσει το σχηματισμό ζελέ (Ca^{2+} - πηκτινών) μέσα στο συμπυκνωμένο απόβλητο. Αυτή η διαδικασία αυξάνει τη διαλυτοποίηση των πηκτινών. Από την άλλη, είναι γνωστό ότι η EtOH μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση των μακρομορίων πηκτίνης σε συνθήκες υψηλής οξύτητας και θερμοκρασίας (Kirtchev et al., 1989). Η παρατηρούμενη διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το νιτρικό είναι ισχυρότερο σε σχέση με το κιτρικό οξύ και η μοριακή συγκέντρωση που εφαρμόστηκε είναι υψηλότερη. Οι Virk & Sogi (2004) δείξανε ότι η εκχύλιση πηκτινών από τις φλούδες μήλων πραγματοποιείται καλύτερα παρουσία κιτρικού έναντι του υδροχλωρικού οξέος. Εξάλλου, το κιτρικό οξύ θεωρείται βρώσιμο καθώς χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα.

Στον **Πίνακα 6.7** παρουσιάζεται η περιεκτικότητα ινών των υπολειμμάτων AIR που ανακτήθηκαν με τα προαναφερθέντα μίγματα. Τα υπολείμματα AIR περιείχαν από 37 έως 51 mg ολικών ινών/g AIR, ενώ οι υδατοδιαλυτές ίνες κυμάνθηκαν από 17 έως 23 mg/g. Η αναλογία προς ολικές ίνες κυμάνθηκε μεταξύ 42 και 47 g/100 g ολικών ινών για τα περισσότερα μείγματα εκχύλισης. Αυτές οι τιμές είναι γενικώς υψηλότερες σε σχέση με την αναλογία (4-39 g/100 g) των υδατοδιαλυτών ινών διαφόρων αγροβιομηχανικών αποβλήτων, όπως το απόβλητο παρασκευής μηλίτη, η σάρκα σταφυλιών και ο πολτός αγγουριών (Grigelmo-Miguel & Martín-Belloso, 1998). Η αύξηση της συγκέντρωσης EtOH στο μίγμα εκχύλισης φαίνεται να αυξάνει την κατακρήμνιση μη υδατοδιαλυτών ινών. Αντίθετα, αυξάνοντας τη συγκέντρωση EtOH, δεν επιτεύχθηκε παρόμοια αυξημένη

κατακρήμνιση για τις υδατοδιαλυτές ίνες που γενικώς κυμάνθηκαν μεταξύ 17-20 mg/g. Παρόλα αυτά, η συνδυασμένη επίδραση της EtOH και του κιτρικού οξέος οδήγησε σε μικρή αύξηση της ανάκτησης υδατοδιαλυτών ινών (23 mg/g). Εξάλλου, η παρουσία οξέος και η δράση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσουν τη διαλυτοποίηση πηκτινών (Kirtchev et al., 1989). Η τελευταία διεργασία (εκχύλιση με 5 mL EtOH και 1 g κιτρικού οξέος/100 mL) φαίνεται να έχει την υψηλότερη απόδοση σε σχέση με τις άλλες διεργασίες που διερευνήθηκαν, καθώς προσδίδει την υψηλότερη ανάκτηση AIR (**Πίνακας 6.6**) και την υψηλότερη περιεκτικότητα υδατοδιαλυτών ινών (**Πίνακας 6.7**).

Στον **Πίνακα 6.8** παρουσιάζεται η σύνθεση σακχάρων των ινών στα υπολείμματα AIR. Οι ίνες αποτελούνταν κυρίως από GalA, Ara και Glc. Άλλα σάκχαρα όπως η Gal, Man, Xyl και Rha βρέθηκαν σε μικρότερες ποσότητες. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε ακολουθία με τα αποτελέσματα των Veirhuis et al. (2003) για απόβλητα ελαιουργείων που ανακτήθηκαν από ελαιόκαρπους της ποικιλίας Moraiolo. Μερικές διαφορές που παρατηρούνται στη σύνθεση των σακχάρων των δειγμάτων (υψηλότερη περιεκτικότητα Glc από Gal) μπορεί να συσχετισθεί με τις διαφορετικές διεργασίες ανάκτησης. Εξάλλου, οι συνθέσεις σακχάρων των ινών ήταν διαφορετικές σε σχέση με αυτές που βρέθηκαν σε απόβλητα διφασικών ελαιουργείων (Cardoso et al., 2003a). Οι παρατηρούμενες διαφορές μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι τα απόβλητα διφασικών ελαιουργείων περιέχουν και τον ελαιοπυρήνα, δηλαδή κυτταρικά τοιχώματα με χαμηλή διαλυτότητα σε νερό. Η σύνθεση σακχάρων των ινών όπως φαίνεται στον **Πίνακα 6.8** φανερώνει την ύπαρξη πηκτινικών πολυσακχαριτών, πλούσιων σε GalA, Ara, ξυλογλυκάνες και γλυκορονοξυλάνες. Αυτά τα συστατικά έχουν βρεθεί στον ελαιόκαρπο από διάφορους ερευνητές (Cardoso et al., 2003b; Huisman et al., 1996).

Πίνακας 6.7. Περιεκτικότητα υδατοδιαλυτών, μη υδατοδιαλυτών και ολικών ινών των αδιάλυτων στην αιθανόλη υπολειμμάτων που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων με διαφορετικά μίγματα εκχύλισης.

Εκχυλιστικό μίγμα	Ίνες (mg/g) [a]			Διαλυτές ίνες (g/100 g)[c,d]
	Διαλυτές[b,c]	Μη διαλυτές[b,c]	Ολικές[c]	
Χωρίς (μόνο κατακρήμνιση)	17 ± 1[f]	20 ± 1[f]	37 ± 1[f]	46 ± 1[f]
3 mL EtOH[e]/100 mL	20 ± 1[g]	25 ± 1[g]	44 ± 2[g]	45 ± 2[f]
5 mL EtOH[e]/100 mL	20 ± 2[g]	25 ± 1[g]	45 ± 2[g]	44 ± 2[f]
7 mL EtOH[e]/100 mL	20 ± 1[g]	23 ± 1[g]	43 ± 1[g]	47 ± 1[f]
10 mL EtOH[e]/100 mL	20 ± 1[g]	28 ± 1[h]	48 ± 1[h]	42 ± 1[g]
15 mL EtOH[e]/100 mL	17 ± 1[f]	34 ± 1[i]	51 ± 1[i]	33 ± 1[h]
20 mL EtOH[e]/100 mL	19 ± 1[g]	31 ± 1[j]	49 ± 1[i]	39 ± 1[i]
5 mL EtOH[e] &1 mL π. HNO_3/100 mL	21 ± 1[g]	25 ± 1[g]	45 ± 1[g]	47 ± 1[f]
5 mL EtOH[e] & 1 g κιτρικού οξέος/100 mL	23 ± 1[h]	27 ± 1[k]	51 ± 1[i]	45 ± 1[f]

[a] Οι τιμές εκφράζονται ως mg άνυδρων σακχάρων/g αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη. [b] Υδατοδιαλυτό και μη υδατοδιαλυτό φράγμα των ινών. [c] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=2). [d] Οι υδατοδιαλυτές ίνες εκφράζονται ως g/100 g ολικών ινών. [e] "EtOH" για "αιθανόλη". [f-m] Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p \leq 0,05$).

Πίνακας 6.8. Η σύνθεση σακχάρων των ινών στα αδιάλυτα στην αιθανόλη υπολείμματα, όπως ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου με διαφορετικά μίγματα εκχύλισης.

Εκχυλιστικό μίγμα	Σύνθεση σακχάρων κυτταρικών τοιχωμάτων (mol/100 mol)[a]						
	Rha[b]	Ara[c]	Xyl[d]	Man[e]	Gal[f]	Glc[g]	GalA[h]
Χωρίς (μόνο κατακρήμνιση)	3,5 ± 0,1	20,2 ± 0,6	5,0 ± 1	5,6 ± 0,1	8,6 ± 1	14,8 ± 0,2	42,3 ± 0,6
3 mL EtOH[g]/100 mL	5,7 ± 0,2	18,4 ± 0,8	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,3	9,2 ± 0,2	18,1 ± 0,3	38,7 ± 0,6
5 mL EtOH[g]/100 mL	4,9 ± 0,5	17,8 ± 0,3	5,6 ± 0,1	6,4 ± 0,3	8,4 ± 0,1	16,8 ± 0,1	39,8 ± 0,4
7 mL EtOH[g]/100 mL	4,9 ± 0,9	18,1 ± 1	5,8 ± 0,3	4,4 ± 0,3	9,5 ± 1	16,1 ± 1	40,9 ± 3,1
10 mL EtOH[g]/100 mL	5,3 ± 0,5	19,3 ± 0,4	5,1 ± 0,2	4,6 ± 0,9	7,4 ± 0,7	14,2 ± 0,6	44,1 ± 0,7
15 mL EtOH[g]/100 mL	6,7 ± 0,7	21,8 ± 1	5,6 ± 0,2	4,5 ± 0,9	8,1 ± 0,4	17,2 ± 0,6	36,0 ± 1
20 mL EtOH[g]/100 mL	6,3 ± 0,5	20,7 ± 1	5,7 ± 0,1	5,4 ± 0,9	7,1 ± 1	16,9 ± 1	37,5 ± 0,4
5 mL EtOH[g] &1 mL π, HNO_3/100 mL	3,2 ± 0,6	18,4 ± 1,2	4,5 ± 0,1	5,5 ± 0,7	8,8 ± 0,1	15,0 ± 0,4	44,2 ± 0,7
5 mL EtOH[g] & 1 g κιτρικού οξέος/100 mL	2,1 ± 0,3	20,8 ± 1	4,1 ± 0,2	4,9 ± 0,5	8,1 ± 0,6	15,1 ± 2	45,1 ± 0,9

[a] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2).
[b] “Rha” για “ραμνόζη”.
[c] “Ara” για “αραβινόζη”.
[d] “Xyl” για “ξυλόζη”.
[e] “Man” για “μαννόζη”.
[f] “Gal” για “γαλακτόζη”.
[g] “Glc” για “γλυκόζη”.
[h] “GalA” για “γαλακτουρονικό οξύ”.
[i] “EtOH” για “αιθανόλη”.

6.7. Χαρακτηρισμός και ιδιότητες ζελοποίησης του υδατοδιαλυτού κλάσματος του ανακτημένου υπολείμματος

Στον **Πίνακα 6.9** παρουσιάζεται μια περαιτέρω ανάλυση του δείγματος AIR (όπως ανακτήθηκε με εκχύλιση με 5 mL EtOH και 1 g κιτρικού οξέος/100 mL), καθώς επίσης και του υδατοδιαλυτού και μη υδατοδιαλυτού κλάσματος. Το υπόλειμμα AIR χαρακτηρίστηκε από πολύ υψηλή περιεκτικότητα τέφρας (38,5 g/100 g) και καλίου (6,4 g/100 g). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού τα απόβλητα ελαιουργείου περιέχουν 0,4-2,5 g ανόργανα συστατικά (κυρίως άλατα του καλίου και φωσφορικών ενώσεων) ανά 100 g ακατέργαστου βάρους (Niaounakis et al., 2004). Το κλάσμα λιγνίνης Klason βρίσκεται επίσης σε μεγάλη περιεκτικότητα (30,5 g/100 g AIR). Αυτό περιλαμβάνει τη λιγνίνη αλλά και πρωτεϊνικές ενώσεις, τανίνες και δύσπεπτα παραπροϊόντα της αντίδρασης Maillard (Theander et al., 1995). Οι περιεχόμενες φαινόλες (3 g/100 g) αναμένονται να είναι δεσμευμένες στα πολυμερή πηκτινών. Εξάλλου, η παρουσία δεσμευμένων φαινολών-ινών είναι χαρακτηριστικό των πολυφαινολικών τροφίμων (Bravo et al., 1994). Επομένως, ο περαιτέρω εξευγενισμός του υπολείμματος AIR, με στόχο τη μείωση της περιεκτικότητας οργανικών ενώσεων και ιόντων, θα μείωνε πιθανότατα την ποσότητα των ανακτημένων πηκτινών, δεδομένου ότι η περιεκτικότητα των πηκτινών είναι ήδη χαμηλή (5,1 g ίνες και 2,1 g διαλυτό GalA/100 g). Άλλα συστατικά του υπολείμματος μπορεί να περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, αμινοξέα και άλλα οργανικά συστατικά του ελαιόκαρπου και των αντίστοιχων αποβλήτων. Όλα αυτά τα συστατικά είναι εδώδιμα και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων.

Πίνακας 6.9. Χαρακτηρισμός του ολικού, υδατοδιαλυτού και μη υδατοδιαλυτού κλάσματος του αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη, το οποίο ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας 5 mL EtOH και 1 g κιτρικό οξύ/100 mL στο μίγμα της εκχύλισης.

Παράμετρος	g/100 g κλάσματος αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος		
	Υδατοδιαλυτό	Μη-υδατοδιαλυτό	Ολικό
Νερό	–	–	10,0 ± 0,3[c, d]
Ολικές φαινόλες	–	–	3,0 ± 0,2[c, d]
Τέφρα	39,7 ± 1,0[a, d]	5,6 ± 0,1[b, d]	38,5 ± 1,5[c, d]
K^+	8,5 ± 0,1[a, e]	1,1 ± 0,3[b, e]	6,4 ± 0,1[c, e]
Na^+	1,14 ± 0,02[a, e]	0,11 ± 0,01[b, e]	0,79 ± 0,02[c, e]
Ca^{2+}	0,73 ± 0,04[a, e]	0,35 ± 0,02[b, e]	0,57 ± 0,03[c, e]
Λιγνίνη Klason	0[a, d]	84,0 ± 1,4[b, d]	30,5 ± 0,5[c, d]
Ολικές ίνες	3,8 ± 0,1[a, d]	7,4 ± 0,2[b, d]	5,1 ± 0,1[c, d]
Διαλυτό γαλακτουρονικό οξύ	3,3 ± 0,1[a, d]	–	2,1 ± 0,1[c, d]

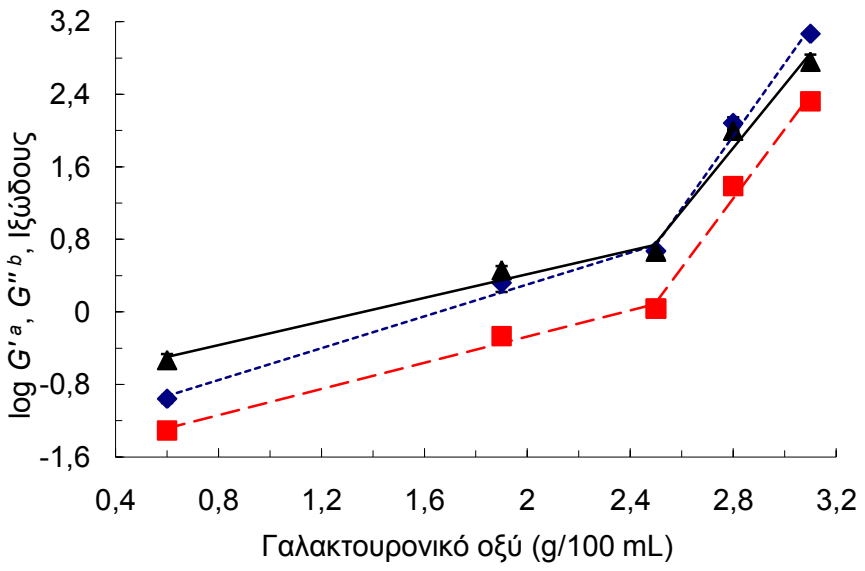
[a] Οι τιμές εκφράζονται ως g/ 100 g ξηρού βάρους υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος. [b] Οι τιμές εκφράζονται ως g/ 100 g ξηρού βάρους μη υδατοδιαλυτού, αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος. [c] Οι τιμές εκφράζονται ως g/ 100 g ξηρού βάρους αδιάλυτου στην αιθανόλη υπολείμματος. [d] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=2). [e] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=3).

Επιπλέον, το υδατοδιαλυτό AIR περιείχε πολύ υψηλή συγκέντρωση τέφρας και καλίου (**Πίνακας 6.9**, 39,7 και 8,5 g/100 g, αντίστοιχα) σε σχέση με την περιεκτικότητα του αδιάλυτου κλάσματος (5,6 και 1,1 g/100 g, αντίστοιχα). Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι τα περισσότερα κατιόντα διαλυτοποιήθηκαν στο νερό. Το νάτριο και το κάλιο του υδατοδιαλυτού κλάσματος βρέθηκαν σε χαμηλότερες αλλά όχι αμελητέες περιεκτικότητες, π.χ. 1,14 και 0,73 g/100 g, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση διαλυτού GalA του υδατοδιαλυτού AIR ήταν υψηλότερη σε σχέση με όλο το υπόλειμμα (3,3 και 2,1 g/100 g, αντίστοιχα). Τέλος, η λιγνίνη Klason κατανεμήθηκε αποκλειστικά στο μη υδατοδιαλυτό κλάσμα (84 g/100 g αδιάλυτου AIR). Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική αφού το κλάσμα λιγνίνης Klason, είναι το λιγότερο βρώσιμο συστατικό του AIR.

Η σύνθεση σακχάρων των ινών που περιέχονται σε δύο διαφορετικά κλάσματα (μη υδατοδιαλυτό και υδατοδιαλυτό) προσδιορίσθηκε και παρουσιάζεται στον **Πίνακα 6.8**. Οι αδιάλυτες ίνες ήταν πλούσιες σε Rha, Glc, GalA και Xyl και φτωχές σε Gal, Ara και Man. Σε αντίθεση, οι διαλυτές ίνες αποτελούνταν αποκλειστικά από GalA και Ara (93,9±2 και 6,1±1 mol/100 mol, αντίστοιχα), αποδεικνύοντας την ύπαρξη πολυσακχαριτών πηκτίνης. Ο ΒΜ των διαλυτών πηκτινών βρέθηκε ίσος με 59±4 mol/100 mol GalA, γεγονός που χαρακτηρίζει τις πηκτίνες ως «υψηλής μεθυλίωσης» (>50 mol/100 mol GalA). Η ικανότητα ζελοποίησης του υδατοδιαλυτού κλάσματος μελετήθηκε περαιτέρω ώστε να εκτιμηθεί η δυναμική αυτού ως σταθεροποιητικός παράγοντας σε τρόφιμα.

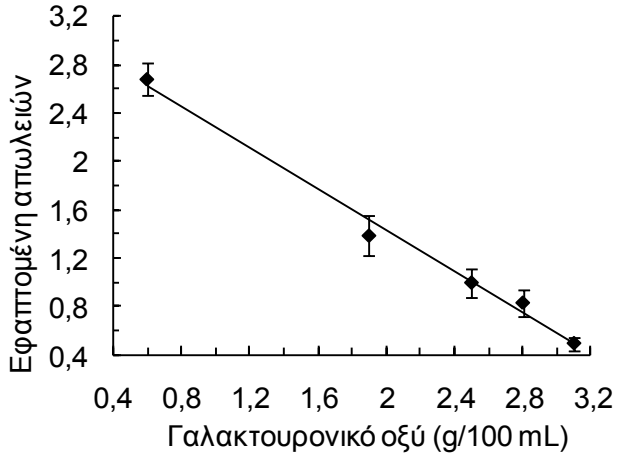
Πιο συγκεκριμένα, το υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR συμπυκνώθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πηκτινών και χρησιμοποιήθηκε σε ρεολογικές δοκιμές. Τα υπό εξέταση δείγματα περιείχαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις GalA: 0,6, 1,9, 2,5, 2,8 και 3,1 g/100 mL. Οι αντίστοιχες περιεκτικότητες μονο-κατιόντων (K^+ και Na^+) υπολογίστηκαν από το διαλυτό κλάσμα και ήταν ίσες με 1,75, 5,55, 7,30, 8,18 και 9,06 g/100 mL, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} ήταν ίσες με 0,13, 0,42, 0,55, 0,62 και 0,69 g/100 mL. Η περιεκτικότητα μονο-κατιόντων ήταν περισσότερο από 13 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτή του ασβεστίου, για όλες τις συγκεντρώσεις GalA. Έτσι, η αλληλεπίδραση μεταξύ K^+ και καρβοξυλικών ομάδων των πηκτινών θα πρέπει να κυριαρχεί στο σύστημα ζελοποίησης των συμπυκνωμάτων πηκτίνης.

Στο **Σχήμα 6.6** παρουσιάζονται οι συντελεστές αποθήκευσης και απώλειας (G' και G'', αντίστοιχα), καθώς επίσης και το ιξώδες των συμπυκνωμάτων πηκτίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης GalA. Το pH όλων των συμπυκνωμάτων ήταν όξινο (pH = 5,3). Οι δύο συντελεστές και το ιξώδες αυξήθηκαν εκθετικά ως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης GalA.



Σχήμα 6.6. Log G' (Pa^{-1}) (◆), log G'' (Pa^{-1}) (▲), log ιξώδους ($Pa^{-1}\cdot s^{-1}$) (■) συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος (g/100 mL), όπως προσδιορίσθηκε στο 1 Hz (για ζελοποίηση 2 h στους 20 ^{o}C). Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa). [a] G' για συντελεστή αποθήκευσης. [b] G'' για συντελεστή απωλειών.

Τα δεδομένα σχηματίζουν δύο ευθείες, μία κάτω και μία πάνω από την περιεκτικότητα των 2,5 g GalA/100 mL, αντίστοιχα, για κάθε παράμετρο. Τα συμπυκνώματα κάτω από αυτό το σημείο (0,6 και 1,9 g/100 mL) δεν είχαν ελαστικότητα ($G' < G''$), υποδεικνύοντας ότι δεν συμπεριφέρονται ως ζελέ. Η αύξηση του ιξώδους μπορεί να συσχετισθεί στις αυξημένες ενδομοριακές επαφές καθώς αυξάνεται η συμπύκνωση του υποστρώματος (Ross-Murphy, 1995). Αντίθετα, οι μεγαλύτερες κλίσεις (~10 φορές για όλα τα μετρούμενα μεγέθη) των ευθειών που παρατηρήθηκαν πάνω από αυτό το σημείο συγκέντρωσης υποδεικνύουν ότι οι δύο ιξωδο-ελαστικοί συντελεστές άλλαξαν πολύ περισσότερο με τη συμπύκνωση. Δηλαδή ότι πραγματοποιείται ένας εντελώς διαφορετικός μηχανισμός πήξης, όπου τα συμπυκνώματα των 3,1 και 2,8 g/100 mL χαρακτηρίζονται πλέον από ζελοειδή συμπεριφορά ($G' > G''$), για όλο το εύρος της τάσης διάτμησης που εξετάστηκε (0-10 Pa). Ωστόσο, η παρουσία ενός συμπαγούς ζελέ ($G' > G'' > 100$ Pa) παρατηρήθηκε άνω των 2,8 g GalA/100 mL. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα συμπυκνώματα πηκτινών μπορούν να συμπεριφερθούν ως ζελέ άνω μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης πηκτινών, η οποία ορίζει το σημείο ζελοποίησης. Το σημείο αυτό παρατηρείται όταν ο G' γίνεται μεγαλύτερος του G'' (μέθοδος διασταύρωσης) ή όταν η εφαπτομένη απωλειών ($\tan\delta = G''/G'$) γίνεται μικρότερη του ενός (<1) (Ross-Murphy, 1995). Αυτή η μέθοδος ωστόσο εξαρτάται από τη συχνότητα ταλάντευσης της δοκιμής (Gunasekaran & Ak, 2000). Παρόλα αυτά, η τιμή της εφαπτομένης απωλειών μπορεί να θεωρηθεί ως ένα καλό κριτήριο για την ανίχνευση του σημείου ζελοποίησης αν η επιλεγμένη συχνότητα είναι επαρκώς χαμηλή (Matia-Merino et al., 2004).



Σχήμα 6.7. Η εφαπτομένη απωλειών (tanδ) μετρήθηκε στο 1 Hz (για ζελοποίηση 2 h στους 20 ^{o}C) και παρουσιάζεται συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος (g/100 mL). Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa). Η εξίσωση της ευθείας είναι: y = -0,854x + 3,1371, με R^2 = 0,9907.

Στο **Σχήμα 6.7** παρουσιάζεται η εφαπτομένη απωλειών στη σχετικά χαμηλή συχνότητα ταλάντευσης του 1 Hz, συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων GalA. Τα δεδομένα συσχετίστηκαν σε μια ευθεία (με R^2 = 0,99) και η ζελοποίηση παρατηρήθηκε για συγκέντρωση μεγαλύτερη των 2,5 g GalA/100 mL. Αυτή η συγκέντρωση είναι τουλάχιστον 3 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τις βέλτιστες προτεινόμενες συγκεντρώσεις (0,75-1 g/100 mL) των εμπορικών πηκτινών χαμηλής μεθυλίωσης (May, 1990). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, π.χ. το μικρό χρόνο θερμοστάτησης του ρεομέτρου για τη ζελοποίηση, την πολύ υψηλή περιεκτικότητα ιόντων ή τον υψηλότερο ΒΜ (59 mol/100 mol GalA) του μη εξευγενισμένου υπολείμματος πηκτινών.

Ο μηχανισμός ζελοποίησης των υψηλά μεθυλιωμένων πηκτινών είναι πολύπλοκος (Cardoso et al., 2003b). Γενικώς, αυτές οι πηκτίνες σχηματίζουν ζελέ σε χαμηλό pH (συνήθως μικρότερο του 3,5) και παρουσία συστατικών που μειώνουν τη δραστικότητα του νερού, όπως η σακχαρόζη σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 55 g/100 g (Lopes da Silva & Goncalves, 1994). Αυτά τα ζελέ σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου και υδροφοβικές αντιδράσεις (Matia-Merino et al., 2004).

Στην τρέχουσα έρευνα, τα ελεύθερα σάκχαρα απομακρύνθηκαν από το υπόλειμμα στο στάδιο της κατακρήμνισης, ενώ δεν προστέθηκε ζάχαρη κατά τη διάρκεια σχηματισμού των ζελέ. Στο όξινο pH (~5) των συμπυκνωμάτων, τα περισσότερα υπολείμματα γαλακτουρονιδίων βρίσκονται στην καρβοξυλική μορφή. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση μονο-κατιόντων στο υπόλειμμα είναι σημαντική, αφού θωρακίζουν την απώθηση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων (Yoo et al., 2003). Με αυτόν τον τρόπο, οι πολυμερείς αλυσίδες των πηκτινών έρχονται πιο κοντά και ενδεχομένως δημιουργούνται συμπλέγματα μεταξύ των ιόντων Ca^{2+} και των

καρβοξυλικών ομάδων που δεν έχουν εξουδετερωθεί από τα ιόντα K^+. Παρόλο που οι πηκτίνες των αποβλήτων ελαιουργείου έχουν σχετικά υψηλό ΒΜ (59 mol/100 mol GalA), μπορούν να δημιουργήσουν ζελέ παρουσία ιόντων Ca^{2+}, όπως έδειξαν οι Löfgren et al., (2005) ότι συμβαίνει σε πηκτίνες υψηλού ΒΜ (>70 mol/100 mol GalA) αν ο «βαθμός κάλυψης» είναι κατάλληλος.

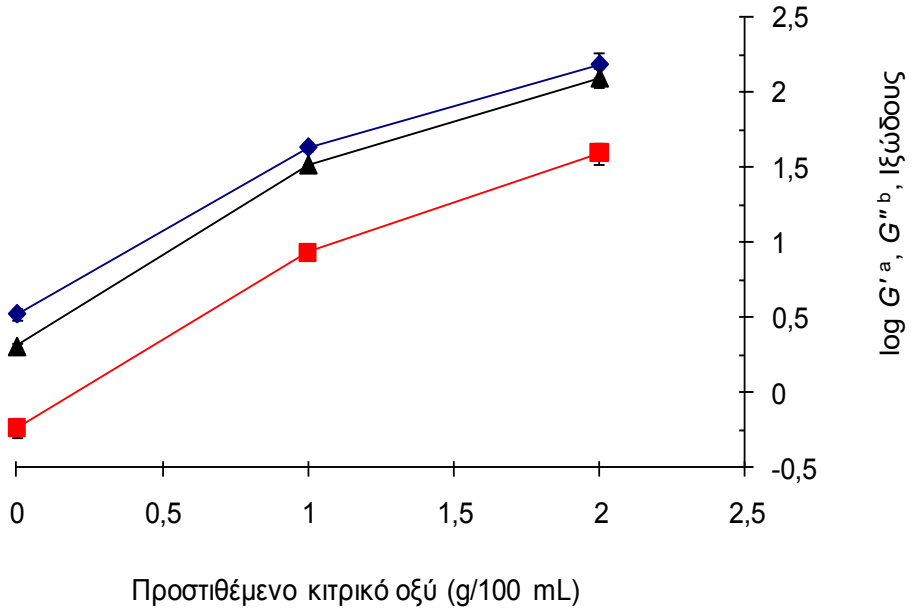
Επιπλέον, ο σχηματισμός ζελέ δεν μπορεί να οφείλεται στα συμπλέγματα πρωτεϊνών-πηκτινών καθώς οι πρωτεΐνες θα είναι είτε μετουσιωμένες (μετά την επεξεργασία των αποβλήτων στους 80 ^oC), είτε αδιάλυτες στο νερό εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, η διαλυτότητα των πηκτινών μειώνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (φαινόμενο “salting out”), εξαιτίας της τάσης ενυδάτωσης αυτών (Belitz & Grosch, 1999).

Μια άλλη σειρά ζελέ προετοιμάστηκε με την προσθήκη κιτρικού οξέος πριν τη συμπύκνωση των διαλυμάτων πηκτίνης ώστε να διερευνηθεί περισσότερο ο μηχανισμός ζελοποίησης. Στο **Σχήμα 6.8** παρουσιάζονται οι συντελεστές αποθήκευσης και απωλειών (G' και G'') καθώς επίσης και το ιξώδες των συμπυκνωμάτων πηκτίνης (2,5 g GalA/100 mL), συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Τα συμπυκνώματα πηκτινών ήταν ήδη όξινα (pH = 5,30), αλλά η προσθήκη 1 και 2 g κιτρικού οξέος/100 mL οδήγησε σε περαιτέρω μείωση του pH αυτών. Το «τυφλό» (χωρίς την προσθήκη κιτρικού οξέος) συμπύκνωμα προσέδωσε χαμηλές τιμές των G' και G''. Αυτές οι τιμές έχουν την ίδια τάξη μεγέθους σε σχέση με τις προηγούμενες για την ίδια συγκέντρωση πηκτινών και τυχόν διαφορές μπορούν να εξηγηθούν από τη χρήση διαφορετικών γεωμετριών (παράλληλη πλάκα και βαρίδι-κύπελλο, αντίστοιχα) στη ρεολογική μέθοδο προσδιορισμού των ιξωδο-ελαστικών ιδιοτήτων, καθώς επίσης στο διαφορετικό χρόνο ζελοποίησης και θερμοκρασία (48 h στους 5 ^oC εν συγκρίσει με 2 h στους 20 ^oC).

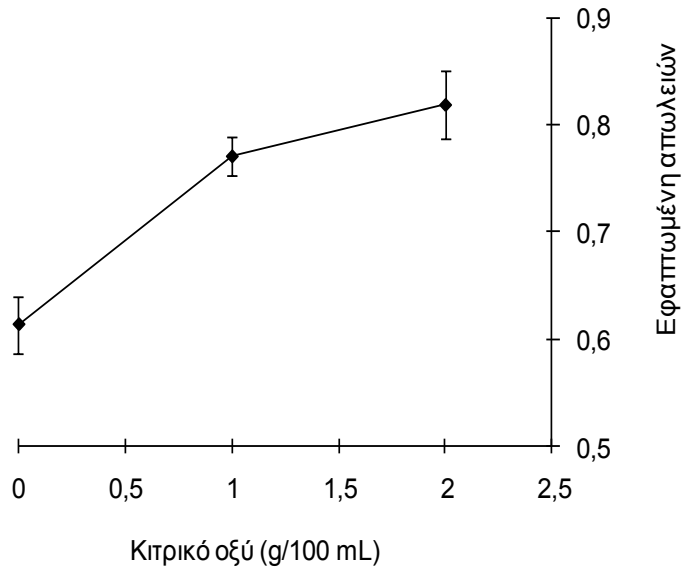
Ο εκτενέστερος χρόνος ζελοποίησης είχε πιθανώς ως αποτέλεσμα την αύξηση της ελαστικότητας των ζελέ, καθώς η εφαπτομένη απωλειών μειώθηκε (0,61 σε σχέση με 0,99, αντίστοιχα). Οι δύο συντελεστές και το ιξώδες αυξήθηκαν εκθετικά ως συνέπεια της αυξανόμενης συγκέντρωσης προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Η προσθήκη 1 και 2 g κιτρικού οξέος/100 mL οδήγησε σε 10 και 50 φορές αύξηση, αντίστοιχα, για όλες τις υπό εξέταση παραμέτρους. Η τελευταία συγκέντρωση προστιθέμενου κιτρικού οξέος (2 g/100 mL) είναι επαρκής για το σχηματισμό συμπαγούς ζελέ ($G' > G''$ >110 Pa).

Η αύξηση των δύο συντελεστών και του ιξώδους θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί εξαιτίας της συνδυασμένης επίδρασης του κιτρικού οξέος: δεσμεύει τα ιόντα Ca^{2+} (Keally, 2006) και έτσι αυξάνει την συγγένεια των γαλακτορουνικών υπολειμμάτων για τα μονο-κατιόντα. Εξάλλου, το κιτρικό οξύ μειώνει το pH και έτσι η ζελοποίηση θωρακίζεται μειώνοντας την ενδομοριακή ηλεκτροστατική απώθηση ανάμεσα στις από-εστεροποιημένες καρβοξυλομάδες (Ptitchkina et al., 1994). Στο **Σχήμα 6.9** παρουσιάζεται η εφαπτομένη απωλειών των προ-αναφερθέντων ζελέ συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Η εφαπτομένη απωλειών

αυξήθηκε και η ελαστικότητα των ζελέ μειώθηκε ως αποτέλεσμα της αύξησης συγκέντρωσης του προστιθέμενου κιτρικού οξέος (από 0,61 σε 0,77 και 0,82 για 1 και 2 g κιτρικού οξέος/100 mL, αντίστοιχα). Η προσθήκη κιτρικού οξέος μείωσε τη διαθεσιμότητα των ιόντων Ca^{2+} για συμπλοκοποίηση με υπολείμματα γαλακτουρονιδίων και προκάλεσε την απώλεια ελαστικότητας των ζελέ. Συμπερασματικά, η απομάκρυνση μονοκατιόντων ή Ca^{2+} από τα υπολείμματα AIR φαίνεται ότι θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τη συμπεριφορά ζελοποίησης των συμπυκνωμάτων πηκτίνης υψηλής μεθυλίωσης με συνέπεια την δημιουργία αδύναμων ή λιγότερο ελαστικών ζελέ, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι η ελαστικότητα των ζελέ μειώνεται με την προσθήκη κιτρικού οξέος, επιβεβαιώνει το σχηματισμό συμπλόκων Ca^{2+} ως κύριο μηχανισμό ζελοποίησης των ανακτημένων πηκτινών, παρά τον υψηλό ΒΜ αυτών.



Σχήμα 6.8. Log *G'* (Pa^{-1}) (◆), log *G''* (▲) (Pa^{-1}), log Ιξώδους (■) ($Pa^{-1}\cdot s^{-1}$) των ζελέ (2,5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Τα ζελέ σχηματίστηκαν για 48 h στους 5 ^{o}C και μετρήθηκαν στο 1 Hz και 20 ^{o}C. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa).



Σχήμα 6.9. Εφαπτομένη απωλειών (tanδ) των ζελέ ((2,5 g γαλακτουρονικού οξέος/100 mL) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου κιτρικού οξέος. Τα ζελέ σχηματίστηκαν για 48 h στους 5 ^{o}C και μετρήθηκαν στο 1 Hz και 20 ^{o}C. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

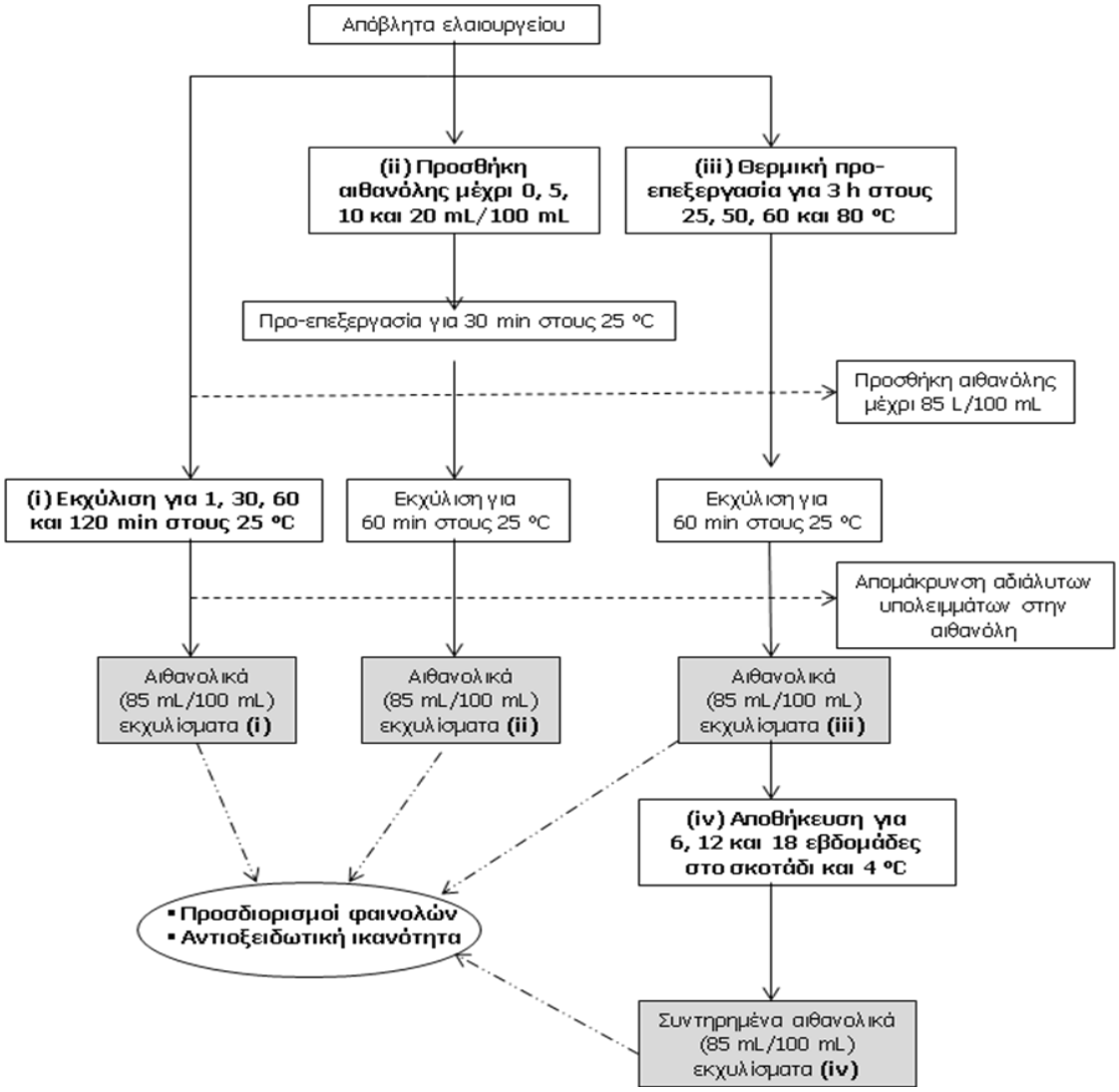
ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΩΝ

7.1. Περιγραφή μελέτης

Η ανάκτηση των φαινολών από τον ελαιόκαρπο, τα φύλλα ελιάς ή τα απόβλητα ελαιουργείων πραγματοποιείται συνήθως με εκχύλιση παρουσία οργανικών διαλυτών (Japón-Luján et al., 2006; Mylonaki et al. 2008; Obied et al., 2008). Η EtOH συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα ως διαλύτης: είναι σχετικά φτηνή, επαναχρησιμοποιούμενη και μη τοξική, ενώ τα αντίστοιχα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία ποτών. Επιπλέον, παρεμποδίζει τη δράση των ενζύμων μέσω της κατακρήμνισης και του χαμηλού pH (=2-3), όπως συμβαίνει και με άλλες αλκοόλες (Obied et al., 2005b). Οι Lesage-Meessen et al. (2001) υποστήριξαν ότι τα δείγματα αποβλήτων μπορούν να σταθεροποιηθούν έναντι ενζυμικών και μη ενζυμικών οξειδωτικών αντιδράσεων με EtOH (30 mL/100 mL). Ωστόσο τα δεδομένα για αυτόν τον ισχυρισμό δεν παρουσιάστηκαν. Αντίθετα, οι Obied et al. (2008) αναφέρουν ότι η EtOH σε συγκέντρωση 40 mL/100 mL δεν ήταν αρκετή ώστε να αποφευχθεί η απότομη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων που παρατηρήθηκε μέσα στις πρώτες 24 h. Αυτά τα διφορούμενα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευθούν από το γεγονός ότι οι παραπάνω ερευνητές μελέτησαν διαφορετικά κλάσματα των αποβλήτων ελαιουργείου: Οι Lesage-Meessen et al. (2001) ανάκτησαν το υγρό μέρος των δειγμάτων με διήθηση, ενώ οι Obied et al. (2008) απομάκρυναν το υπερκείμενο και μελέτησαν το ίζημα των δειγμάτων.

Στο προηγούμενο Κεφάλαιο (6^{ο}) μελετήθηκε η ανάκτηση ινών από συμπυκνωμένα απόβλητα ελαιουργείων βασιζόμενη στη θερμική εκχύλιση αυτών με EtOH σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (μέχρι 20 mL/100 mL), πριν την κατακρήμνισή τους με 85 mL EtOH/100 mL (Galanakis et al., 2010a). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε υπόσχεται την ταυτόχρονη ανάκτηση ινών και φαινολών σε δύο διαφορετικά κλάσματα: (i) στο AIR που είναι πλούσιο σε ίνες και (ii) στο αιθανολικό εκχύλισμα (85 mL/100 mL) που είναι πλούσιο στις φαινόλες. Το αιθανολικό υγρό είχε κίτρινο-καστανό χρώμα και ευχάριστο άρωμα του ελαιόκαρπου με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν στη βιομηχανία ποτών (Tornberg & Galanakis, 2008). Το AIR περιέχει επίσης 3 g ολικών

φαινολών/100 g που μπορεί να είναι αδιάλυτες στην EtOH ή ενωμένες στις κατακρημνισμένες ίνες κατά κάποιο τρόπο. Το προστιθέμενο στάδιο εκχύλισης με EtOH σε χαμηλές συγκεντρώσεις, υποδεικνύει ότι τα συμπλέγματα φαινολών-ινών μπορούν να διαχωριστούν με ταυτόχρονη αύξηση των τελευταίων στο κλάσμα AIR μετά το στάδιο κατακρήμνισης. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας (μέχρι 3 h στους 50-80 ^{o}C) των αποβλήτων στην απόδοση και στις λειτουργικές ιδιότητες των πηκτινών (Galanakis et al., 2010d). Εξάλλου, η θερμική επεξεργασία των αποβλήτων χρησιμοποιείται στη συμπύκνωση αυτών. Σύμφωνα με τα πειράματα, η επεξεργασία των αποβλήτων σε μέτρια θερμοκρασία (50-60 ^{o}C για 2-3 h) ενεργοποίησε την ενδογενή ΠΜΕ με ταυτόχρονη αλλαγή των λειτουργικών ιδιοτήτων των πηκτινών στο AIR. Αυτή η θερμική επεξεργασία θα μπορούσε ενδεχομένως να ενεργοποιήσει και άλλα ενδογενή ένζυμα, όπως οι ΠΦΟς που καταλύουν την οξείδωση των μόνο- και *ο*-διφαινολών σε *ο*-κινόνες (Casado-Vela et al., 2005).



Σχήμα 7.1. Σχηματική παράσταση της μελέτης ανάκτησης και συντήρησης φαινολών.

Ο στόχος της μελέτης στο τρέχον κεφάλαιο είναι η διερεύνηση της επίδρασης των προαναφερθέντων παραμέτρων στο φαινολικό περιεχόμενο και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ανακτώμενου αιθανολικού εκχυλίσματος (**Σχήμα 7.1**). Επιπλέον, τα παραπάνω χαρακτηριστικά ελέγχθησαν σε βάθος χρόνου (18 εβδομάδες) με στόχο τη μελέτη της συντήρησης αυτών στο αιθανολικό εκχύλισμα.

7.2. Επίδραση του χρόνου κατακρήμνισης

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και η αντιοξειδωτική δράση των αιθανολικών εκχυλισμάτων σε σχέση με το χρόνο κατακρήμνισης φαίνονται στον **Πίνακα 7.1**. Οι ολικές φαινόλες όλων των εκχυλισμάτων (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) κυμάνθηκαν μεταξύ των 619 και 631 mg/L χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) και υδροξυκινναμικών οξέων των εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν μετά από 30, 60 και 120 min κυμάνθηκαν από 676 μέχρι 691 mg/L, και από 163 μέχρι 165 mg/L, αντίστοιχα, αλλά οι τιμές δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές.

Από την άλλη πλευρά, το εκχύλισμα που ανακτήθηκε μετά από 1 min περιείχε σημαντικά μικρότερες τιμές σε σχέση με μεγαλύτερους χρόνους κατακρήμνισης. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο κατόπιν σύγκρισης των τιμών των φλαβονολών, ανθοκυανινών και ο-διφαινολών για χρόνο κατακρήμνισης 1 min και 120 min. Ανάμεσα στα 4 δείγματα εκχυλισμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των δύο παραμέτρων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα.

7.3. Επίδραση της συγκέντρωσης αιθανόλης στο στάδιο εκχύλισης

Τα φαινολικά και αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων σε σχέση με τη συγκέντρωση αιθανόλης στο στάδιο της εκχύλισης φαίνονται στον **Πίνακα 7.2**. Οι ολικές φαινόλες όλων των εκχυλισμάτων (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) κυμάνθηκαν από 571 μέχρι 649 mg/L και μειώθηκαν σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά συγκέντρωσης αιθανόλης: $0 \geq 10 > 5 > 20$ mL/100 mL. Ωστόσο, μόνο η τιμή του εκχυλίσματος που επεξεργάστηκε με 20 mL EtOH/100 mL ήταν στατιστικά διαφορετική σε σχέση με τις άλλες. Τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με 0 και 5 mL EtOH/100 mL περιείχαν παρόμοιες συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (όπως προσδιορίστηκαν στα 280 nm), *ο*-διφαινολών, υδροξυκινναμικών οξέων, φλαβονολών και ανθοκυανινών.

Πίνακας 7.1. Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών (85 mL/100 mL) εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατακρήμνισης.

Χρόνος κατακρήμνισης	Φαινολικό περιεχόμενο*						Αντιοξειδωτική Ικανότητα*	
	Ολικές (725 nm)	*o*-διφαινόλες (517 nm)	Ολικές (280 nm)	Υδροξυκινναμικά οξέα [a] (320 nm)	Φλαβονόλες (360 nm)	Ανθοκυανίνες (520 nm)	ΑΔ	Ισοδύναμα $FeSO_4$
min	mg/L						mg DPPH/g	mmol/L
1	$622 \pm 12^{\alpha}$	$296 \pm 16^{\alpha}$	619 ± 19	150 ± 7	174 ± 8	$25 \pm 2^{\alpha}$	$6{,}0 \pm 0{,}3^{\alpha}$	$3{,}3 \pm 0{,}1^{\alpha}$
30	$619 \pm 10^{\alpha}$	$315 \pm 9^{\alpha,\beta}$	$684 \pm 39^{\alpha}$	$165 \pm 8^{\alpha}$	$186 \pm 7^{\alpha,\beta}$	$27 \pm 2^{\alpha,\beta}$	$6{,}2 \pm 0{,}1^{\alpha}$	$3{,}1 \pm 0{,}4^{\alpha}$
60	$625 \pm 4^{\alpha}$	$316 \pm 4^{\alpha,\beta}$	$691 \pm 40^{\alpha}$	$165 \pm 6^{\alpha}$	$183 \pm 8^{\alpha,\beta}$	$27 \pm 2^{\alpha,\beta}$	$6{,}3 \pm 0{,}3^{\alpha}$	$3{,}2 \pm 0{,}2^{\alpha}$
120	$631 \pm 4^{\alpha}$	$330 \pm 18^{\beta}$	$676 \pm 5^{\alpha}$	$163 \pm 3^{\alpha}$	$186 \pm 5^{\alpha}$	$28 \pm 2^{\beta}$	$5{,}8 \pm 0{,}4^{\alpha}$	$3{,}6 \pm 0{,}3^{\alpha}$

* Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3). Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($p \leq 0{,}05$).

Πίνακας 7.2. Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών (85 mL/100 mL) εκχυλισμάτων που ανακτήθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης στο στάδιο της εκχύλισης.

Περιεκτικότητα αιθανόλης στο μίγμα εκχύλισης	Φαινολικό περιεχόμενο*						Αντιοξειδωτική Ικανότητα*	
	Ολικές (725 nm)	*o*-διφαινόλες (517 nm)	Ολικές (280 nm)	Υδροξυκινναμικά οξέα [a] (320 nm)	Φλαβονόλες (360 nm)	Ανθοκυανίνες (520 nm)	ΑΔ	Ισοδύναμα $FeSO_4$
mL/100 mL	mg/L						mg DPPH/g	mmol/L
0	$649 \pm 18^{\alpha}$	$326 \pm 18^{\alpha}$	$808 \pm 27^{\alpha}$	$184 \pm 7^{\alpha,\beta}$	$199 \pm 8^{\alpha}$	$43 \pm 3^{\alpha}$	$7{,}0 \pm 0{,}3$	$3{,}5 \pm 0{,}1$
5	$614 \pm 14^{\beta}$	$336 \pm 26^{\alpha}$	$798 \pm 29^{\alpha}$	$189 \pm 5^{\alpha}$	$205 \pm 5^{\alpha}$	$45 \pm 2^{\alpha}$	$5{,}9 \pm 0{,}4^{\alpha}$	$2{,}9 \pm 0{,}1^{\alpha}$
10	$634 \pm 28^{\alpha,\beta}$	$305 \pm 18^{\alpha,\beta}$	750 ± 10	$172 \pm 8^{\beta}$	$181 \pm 10^{\beta}$	$39 \pm 8^{\alpha,\beta}$	$6{,}3 \pm 0{,}2^{\alpha}$	$3{,}1 \pm 0{,}2^{\alpha}$
20	571 ± 13	$293 \pm 14^{\beta}$	713 ± 7	158 ± 7	$169 \pm 8^{\beta}$	$34 \pm 5^{\beta}$	$5{,}2 \pm 0{,}2$	$3{,}0 \pm 0{,}2^{\alpha}$

* Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3). Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($p \leq 0{,}05$).

Σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκαν διαφορετικές τάσεις ανάμεσα στα εκχυλίσματα για τους δύο υπό εξέταση δείκτες. Οι τιμές ΑΔ αυξήθηκαν σύμφωνα με την εξής σειρά συγκεντρώσεων EtOH: 20 < 5 < 10 < 0 mL/100 mL και οι τιμές ήταν στατιστικά διαφορετικές (εκτός από τη σύγκριση μεταξύ 10 και 5 mL/100 mL). Αντίθετα, τα ισοδύναμα $FeSO_4$ μειώθηκαν σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά: 5 > 20 > 10 > 0 mL/100 mL, αλλά μόνο η τιμή που βρέθηκε για το δείγμα ελέγχου (επεξεργασία με 0 mL EtOH /100 mL) ήταν στατιστικά διαφορετική σε σχέση με τις άλλες.

7.4. Επίδραση της θερμικής προ-επεξεργασίας

Στην πρώτη ομάδα σειρών του **Πίνακα 7.3** παρουσιάζονται η σύσταση σε φαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση των αιθανολικών εκχυλισμάτων (απευθείας μετά την ανάκτησή τους) σε συνάρτηση της θερμοκρασίας προ-επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου. Οι ολικές φαινόλες των εκχυλισμάτων (όπως προσδιορίστηκαν στα 725 nm) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά θερμικής επεξεργασίας: 25 > 80 > 60 > 50 ^{o}C. Τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 50, 60 και 80 ^{o}C είχαν σημαντικά μικρότερες τιμές ολικών φαινολών (όπως προσδιορίστηκαν στα 280 nm) σε σύγκριση με αυτό στους 25 ^{o}C.

Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις *ο*-διφαινολών των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν στους 25 και 80 ^{o}C ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με αυτές στους 50 και 60 ^{o}C. Η συγκέντρωση υδροξυκινναμικών οξέων των εκχυλισμάτων μειώθηκε αυξανομένης της θερμοκρασίας και οι τιμές ήταν στατιστικά διαφορετικές, εκτός τις τιμές ανάμεσα στα δείγματα των 25 και 50 ^{o}C, αλλά και αυτών των 50 και 60 ^{o}C. Η συγκέντρωση φλαβονολών έδειξε την ίδια τάση με τα υδροξυκινναμικά οξέα, παρόλο που οι διαφορές δεν ήταν πάντα στατιστικά διαφορετικές: π.χ. συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων επεξεργασίας στους 25 και 50 ^{o}C ή αυτές μεταξύ των 50 και 60 ^{o}C. Η συγκέντρωση ανθοκυανινών των δειγμάτων ακολούθησε την εξής σειρά: 50 > 25 > 60 > 80 ^{o}C και οι τιμές ήταν στατιστικά διαφορετικές εκτός από αυτές για τους 25 και 60 ^{o}C. Επιπροσθέτως, τα εκχυλίσματα που επεξεργάστηκαν στους 50 και 60 ^{o}C είχαν στατιστικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και για τις δύο παραμέτρους σε σύγκριση με αυτά στους 25 και 80 ^{o}C.

7.5. Συντήρηση των θερμικά επεξεργασμένων εκχυλισμάτων

Ο **Πίνακας 7.3** δείχνει επίσης την εξέλιξη των φαινολικών και αντιοξειδωτικών χαρακτηριστικών των θερμικά επεξεργασμένων εκχυλισμάτων κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους (συγκρίνοντας τις αντίστοιχες τιμές σε κάθε ομάδα σειρών). Η συγκέντρωση ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) των εκχυλισμάτων παρέμεινε σταθερή (χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές) για όλο το διάστημα των 18 εβδομάδων. Οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν στα 50, 60 και 80 ^{o}C έδειξαν την ίδια σταθερότητα. Το δείγμα που επεξεργάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση των

ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) τις πρώτες 6 εβδομάδες και η δεύτερη συγκέντρωση παρέμεινε στατιστικά σταθερή τις επόμενες 12 εβδομάδες. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τη συγκέντρωση *ο*-διφαινόλων των δειγμάτων στους 25, 50 και 60 ^{o}C. Η συγκέντρωση υδροξυκινναμικών οξέων και φλαβονολών παρέμεινε σταθερή για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 25, 50 και 60 ^{o}C.

Από την άλλη μεριά, οι συγκεντρώσεις αυτές για το δείγμα των 80 ^{o}C αυξήθηκαν σημαντικά για τις πρώτες 12 εβδομάδες. Τέλος, η συγκέντρωση ανθοκυανίνων όλων των δειγμάτων δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφορά στο χρονικό διάστημα των 18 εβδομάδων. Σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, οι τιμές της ΑΔ αυξήθηκαν σημαντικά για όλα τα δείγματα μετά από 18 εβδομάδες. Παρόλα αυτά, τα ισοδύναμα $FeSO_4$ παρέμειναν στατιστικά σταθερά για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 25, 60 και 80 ^{o}C, αλλά μειώθηκαν σημαντικά μετά από 6 εβδομάδες για το δείγμα των 50 ^{o}C: από 3.1 σε 2,6 mmol/L.

7.6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Η ανάκτηση φαινολών στο αιθανολικό εκχύλισμα από μία πολυφασική πηγή όπως τα απόβλητα ελαιουργείων είναι μια πολύπλοκη διεργασία. Το πρόβλημα της εκχύλισης είναι ότι κάποιες φαινόλες παραμένουν προσκολλημένες στα κυτταρικά τοιχώματα και άλλες στα κυτοπλασματικά χυμοτόπια (Obied et al., 2005b). Το στάδιο της διαλυτοποίησης και εκχύλισης των ελεύθερων και των δεσμευμένων φαινολών, αντίστοιχα, μέσα στο αιθανολικό εκχύλισμα είναι κρίσιμο για την ανάκτηση αυτών. Ο χρόνος είναι σημαντική παράμετρος σε κάθε διεργασία διαλυτοποίησης και εκχύλισης. Επιπλέον, στην περίπτωση ευπαθών και δραστικών συστατικών όπως είναι οι φαινόλες, ο χρόνος εκχύλισης είναι παράγοντας κλειδί (Obied et al., 2005a).

Παρόλα αυτά, ο χρόνος κατακρήμνισης-εκχύλισης δεν επηρέασε καθόλου την ανάκτηση φαινολών στο αιθανολικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι 30 min κατακρήμνισης είναι επαρκή για την ολοκλήρωση της διεργασίας: συγκρίνοντας όλες τις παραμέτρους των δειγμάτων που ανακτήθηκαν μετά τον παραπάνω χρόνο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**Πίνακας 7.1**). Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης δεν επηρέασαν την απόδοση εκχύλισης, π.χ. τα εκχυλίσματα που ανακτήθηκαν μετά από 1 και 30 min είχαν παρόμοιες τιμές συγκεντρώσεων με διαφορές στατιστικά μη σημαντικές ή αμελητέες. Μια εξαίρεση παρατηρήθηκε στις ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), που αυξήθηκαν μέχρι 10% (από 619 έως 684 mg/L, αντίστοιχα).

Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε αντίθεση με τις αντίστοιχες τιμές ολικών φαινολών (στα 725 nm) όπως προσδιορίσθηκαν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau, καθώς αυτές παρέμειναν σταθερές. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να σχετίζεται με τις δύο μεθόδους προσδιορισμού φαινολών που προσδιορίζουν διαφορετικές ομάδες συστατικών. Για παράδειγμα, η μέθοδος Folin-Ciocalteau προσδιορίζει όλες τις περιεχόμενες φαινόλες, καθώς επίσης και κάθε αναγωγικό συστατικό των δειγμάτων

(Niaounakis & Halvadakis, 2004). Επίσης, η μέθοδος αυτή προσδιορίζει φαινόλες με μικρότερο ΜΒ σε σχέση με την άλλη μέθοδο (Galanakis et al., 2010d). Επομένως, ο προστιθέμενος χρόνος εκχύλισης (από 1 σε 30 min) θα μπορούσε ενδεχομένως να εμπλουτίσει τη διαλυτοποίηση βαρύτερων φαινολικών κλασμάτων μέσα στο αιθανολικό μέσο. Σε κάθε περίπτωση, αυτή η υπόθεση εξακολουθεί να είναι υπό συζήτηση, καθώς όλα τα άλλα φαινολικά κλάσματα (ο-διφαινόλες, παράγωγα υδροξυ-κινναμικών οξέων, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες) παρέμειναν σταθερά ανάμεσα σε αυτούς τους δύο χρόνους εκχύλισης.

Τα αποτελέσματα είναι σε αντίθεση με άλλες μελέτες, όπου ο χρόνος είναι σημαντικός για την εκχύλιση φαινολών από λυοφιλιωμένα απόβλητα (Obied et al., 2005a). Μια ερμηνεία για αυτή τη διαφορά είναι ότι η εκχύλιση με διαλύτη από ένα στερεό φυτικό υπόστρωμα περιλαμβάνει αρχικώς ένα στάδιο διόγκωσης (swelling) εξαιτίας της προσρόφησης διαλύτη μέσα στη στερεά φάση (Silva et al., 2007). Στη τρέχουσα μελέτη, φρέσκα απόβλητα ελαιουργείων (αιώρημα 3 φάσεων) αναμείχθηκαν με EtOH μέχρι 85 mL/100 mL χωρίς να απαιτείται χρόνος για τη διόγκωση του υποστρώματος. Με τον τρόπο αυτό, φαίνεται ότι οι ελεύθερες φαινόλες διαλυτοποιούνται ή κατακρημνίζονται κατευθείαν μετά την ανάμειξη των αποβλήτων με EtOH, ενώ οι ενωμένες φαινόλες δεν εκχυλίζονται καθόλου. Εξάλλου, οι ίνες κατακρημνίζονται με την προσθήκη EtOH μέχρι 85 mL/100 mL (Qi et al., 2000) με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η εκχύλιση των δεσμευμένων φαινολών από τα αντίστοιχα συμπλέγματα τους με τις ίνες.

Από την άλλη, η διαλυτότητα των φαινολών μεταβάλλεται αλλάζοντας την συγκέντρωση EtOH και τις ιδιότητες του διαλύτη, π.χ. την πυκνότητα ή τη διηλεκτρική του σταθερά (Mylonaki et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη EtOH μέχρι 20 mL/100 mL σε ένα στάδιο προ-επεξεργασίας μείωσε τη συγκέντρωση φαινολών και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων (**Πίνακας 7.2**).

Μια παρόμοια τάση παρατηρήθηκε για την εκχύλιση με 5 ή 10 mL EtOH /100 mL, αλλά οι διαφορές σε σχέση με αυτή των 0 mL EtOH /100 mL ήταν σημαντικές μόνο για μία παράμετρο (ΑΔ) της αντιοξειδωτικής ικανότητας και έτσι δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Παρόλα αυτά, το δείγμα ελέγχου είχε τις υψηλότερες τιμές σχεδόν για όλες τις παραμέτρους και αυτό μπορεί να είναι μια ένδειξη ότι το στάδιο προ-επεξεργασίας με EtOH μειώνει τις συγκεντρώσεις των φαινολών και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

Στο προηγούμενο Κεφάλαιο (6^{ο}) αναφέρεται ότι η προσθήκη EtOH σε μικρές συγκεντρώσεις (5-20 mL/100 mL) αυξάνει τη συγκέντρωση των ινών στο AIR που ανακτήθηκε κατόπιν προσθήκης 85 mL EtOH /100 mL (Galanakis et al., 2010a). Αυτή η αύξηση ενισχύθηκε από την προσθήκη κιτρικού οξέος στο αιθανολικό μίγμα. Εφόσον κάποιες από τις φαινόλες είναι ενωμένες με τις ίνες (Bravo et al., 1994), θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ινών στο AIR ακολουθείται φυσιολογικά από τη μείωση της συγκέντρωσης φαινολών στο αιθανολικό μέσο.

Εξάλλου, οι φαινόλες είναι δραστικές χημικές ενώσεις, ευάλωτες στην οξείδωση, την υδρόλυση, τον πολυμερισμό και τη συμπλεγματοποίηση (Obied et al., 2005b). Το προστιθέμενο στάδιο εκχύλισης με EtOH θα μπορούσε να επιταχύνει τις παραπάνω αντιδράσεις. Αυτός εξάλλου ήταν ο κύριος λόγος για τον οποίο δεν ελέγχθηκε ο συνδυασμός EtOH με το κιτρικό οξύ στη μελέτη του τρέχοντος Κεφαλαίου.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η θέρμανση των αποβλήτων παίζει σημαντικό ρόλο στην περιεκτικότητα φαινολών και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, η θέρμανση στους 50 ή 60 ^{o}C προκάλεσε μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης φαινολών όλων των κατηγοριών, αλλά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (**Πίνακας 7.3**). Αυτή η μείωση μπορεί να ερμηνευτεί από τη θερμική ενεργοποίηση των ενδογενών ΠΦΟ. Για παράδειγμα, η θερμική ενεργοποίηση των ΠΦΟ σε άλλα υποστρώματα όπως το μήλο, πραγματοποιείται μεταξύ 45 και 65 ^{o}C (Soysal, 2008). Επιπροσθέτως, στο προηγούμενο Κεφάλαιο (6°) αναφέρεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενεργοποίηση άλλων ενζύμων (π.χ. της ΠΜΕ) στα απόβλητα ελαιουργείου είναι αυτή των 60 ^{o}C (Galanakis et al., 2010e).

Η θέρμανση των αποβλήτων σε ακόμα υψηλότερη θερμοκρασία (80 ^{o}C) προκάλεσε επίσης μείωση σε κάποιες από τις συγκεντρώσεις φαινολών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια μικρή μείωση ως προς τα μη επεξεργασμένα απόβλητα στη συγκέντρωση ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) και ανθοκυανινών, ενώ αυτές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των παραγώγων των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών παρούσιασαν μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τα δείγματα των 50 και 60 ^{o}C. Οι *o*-διφαινόλες παρέμειναν στο ίδιο επίπεδο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (25 ^{o}C) και αυτός ήταν πιθανώς ο λόγος για τον οποίο η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν μειώθηκε, αφού οι *o*-διφαινόλες είναι γνωστές για τις πλεονεκτικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους (Kiokias et al., 2008).

Πίνακας 7.3. Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα των αιθανολικών (85 mL/100 mL) εκχυλισμάτων σε διαφορετικούς χρόνους συντήρησης. Τα εκχυλίσματα ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων κατόπιν επεξεργασίας αυτών για 3 h σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Χρόνος αποθήκευσης	Θερμοκρασία Προ-επεξεργασίας	Φαινολικό περιεχόμενο* Ολικές (725 nm)	*o*-διφαινόλες (517 nm)	Ολικές (280 nm)	Υδροξυκινναμικά οξέα [a] (320 nm)	Φλαβονόλες (360 nm)	Ανθοκυανίνες (520 nm)	Αντιοξειδωτική Ικανότητα* ΑΔ	Ισοδύναμα $FeSO_4$
Εβδομάδες	^{o}C	mg/L						mg DPPH/g	mmol/L
0	25	$609 \pm 16^{\alpha}$	$351 \pm 25^{\alpha,\gamma}$	898 ± 28	$193 \pm 6^{\alpha,\gamma}$	$235 \pm 24^{\alpha,\gamma}$	$45 \pm 2^{\alpha,\beta}$	$5{,}4 \pm 0{,}1^{\alpha,\beta}$	$4{,}6 \pm 0{,}4^{\beta}$
	50	$300 \pm 16^{\beta}$	$251 \pm 24^{\beta,\delta}$	$724 \pm 12^{\alpha,\gamma}$	$178 \pm 26^{\alpha,\beta,\delta}$	$198 \pm 39^{\alpha,\beta,\delta}$	$54 \pm 6^{\gamma}$	$1{,}7 \pm 0{,}1^{\gamma}$	$3{,}1 \pm 0{,}3^{\alpha}$
	60	$432 \pm 24^{\gamma}$	$275 \pm 31^{\beta,\varepsilon}$	$693 \pm 57^{\alpha,\delta}$	$164 \pm 27^{\beta,\varepsilon}$	$172 \pm 10^{\beta,\varepsilon}$	$41 \pm 5^{\alpha,\delta}$	$3{,}4 \pm 0{,}5^{\delta}$	$2{,}8 \pm 0{,}1^{\alpha,\delta}$
	80	$560 \pm 18^{\delta}$	$342 \pm 9^{\alpha,\zeta}$	$723 \pm 24^{\alpha,\varepsilon}$	124 ± 8	134 ± 11	$32 \pm 1^{\varepsilon}$	$5{,}3 \pm 0{,}3^{\alpha,\varepsilon}$	$5{,}4 \pm 0{,}5^{\eta}$
6	25	$626 \pm 19^{\alpha}$	$353 \pm 27^{\gamma}$	$831 \pm 19^{\beta}$	$195 \pm 18^{\gamma}$	$227 \pm 24^{\gamma}$	$42 \pm 5^{\beta}$	$5{,}8 \pm 0{,}4^{\beta}$	$4{,}5 \pm 0{,}5^{\beta}$
	50	$300 \pm 10^{\beta}$	$281 \pm 20^{\delta}$	$707 \pm 29^{\gamma}$	$205 \pm 16^{\delta}$	$182 \pm 28^{\delta}$	$50 \pm 5^{\gamma}$	$1{,}8 \pm 0{,}1^{\gamma}$	$2{,}6 \pm 0{,}2^{\gamma}$
	60	$445 \pm 8^{\gamma}$	$310 \pm 18^{\varepsilon}$	$704 \pm 41^{\delta}$	$178 \pm 19^{\varepsilon}$	$168 \pm 14^{\varepsilon}$	$46 \pm 5^{\delta}$	$3{,}4 \pm 0{,}6^{\delta}$	$2{,}5 \pm 0{,}3^{\delta,\varepsilon}$
	80	$572 \pm 17^{\delta}$	$329 \pm 16^{\zeta,\eta}$	$706 \pm 14^{\varepsilon}$	147 ± 6	164 ± 8	$32 \pm 6^{\varepsilon}$	$5{,}2 \pm 0{,}3^{\varepsilon}$	$4{,}7 \pm 0{,}7^{\eta}$
12	25	$626 \pm 34^{\alpha}$	$339 \pm 17^{\gamma}$	$837 \pm 35^{\beta}$	$204 \pm 11^{\gamma}$	$237 \pm 13^{\gamma}$	$44 \pm 5^{\beta}$	$6{,}6 \pm 0{,}3$	$4{,}7 \pm 0{,}3^{\beta}$
	50	$296 \pm 8^{\beta}$	$276 \pm 28^{\delta}$	$701 \pm 27^{\gamma}$	$213 \pm 16^{\delta}$	$213 \pm 29^{\delta}$	$54 \pm 9^{\gamma}$	$2{,}1 \pm 0{,}1$	$2{,}5 \pm 0{,}1^{\gamma}$
	60	$441 \pm 25^{\gamma}$	$293 \pm 19^{\varepsilon}$	$727 \pm 42^{\delta}$	$177 \pm 7^{\varepsilon}$	$171 \pm 13^{\varepsilon}$	$42 \pm 5^{\delta}$	$3{,}9 \pm 0{,}2^{\delta}$	$2{,}4 \pm 0{,}1^{\varepsilon,\zeta}$
	80	$561 \pm 31^{\delta}$	$311 \pm 17^{\eta}$	$733 \pm 31^{\varepsilon}$	$193 \pm 15^{\zeta}$	$223 \pm 20^{\zeta}$	$31 \pm 5^{\varepsilon}$	$6{,}2 \pm 0{,}3$	$4{,}9 \pm 0{,}3^{\eta}$
18	25	$622 \pm 24^{\alpha}$	$321 \pm 17^{\gamma}$	$826 \pm 10^{\beta}$	$205 \pm 23^{\gamma}$	$245 \pm 25^{\gamma}$	$44 \pm 7^{\beta}$	$8{,}4 \pm 0{,}6$	$4{,}8 \pm 0{,}5^{\beta}$
	50	$309 \pm 13^{\beta}$	$255 \pm 28^{\delta}$	$704 \pm 31^{\gamma}$	$218 \pm 23^{\delta}$	$182 \pm 10^{\delta}$	$56 \pm 7^{\gamma}$	$3{,}2 \pm 0{,}2$	$2{,}5 \pm 0{,}4^{\gamma}$
	60	$451 \pm 20^{\gamma}$	$276 \pm 24^{\varepsilon}$	$722 \pm 36^{\delta}$	$181 \pm 12^{\varepsilon}$	$171 \pm 9^{\varepsilon}$	$40 \pm 7^{\delta}$	$5{,}9 \pm 0{,}4$	$2{,}4 \pm 0{,}4^{\delta,\zeta}$
	80	$566 \pm 24^{\delta}$	260 ± 20	$726 \pm 38^{\varepsilon}$	$176 \pm 11^{\zeta}$	$200 \pm 14^{\zeta}$	$31 \pm 1^{\varepsilon}$	$8{,}0 \pm 0{,}6$	$4{,}9 \pm 0{,}2^{\eta}$

* Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση ($n = 3$). Οι τιμές κάθε στήλης με το ίδιο γράμμα εκθέτη (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($p \leq 0{,}05$).

Τα αποτελέσματα δεν μπορούν να ερμηνευτούν από τη δράση των ενδογενών ενζύμων αφού αυτά έχουν πιθανότατα απενεργοποιηθεί. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι αντίστοιχες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος των 80 ^{o}C παρέμειναν στο ίδιο επίπεδο ή υψηλότερα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Η απενεργοποίηση των ΠΦΟ είναι ένα τυπικό παράδειγμα όπου η απενεργοποίηση διασπαστικών ενζύμων μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης ενός φυτικού υποστρώματος (Lindley, 1998). Εξάλλου, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι ΠΦΟ άλλων πηγών όπως του αβοκάντου και της σάρκας σταφυλιών απενεργοποιούνται πάνω από τους 65-70 ^{o}C (Rapeanu et al., 2005; Weemaes et al., 1998).

Παρόλα αυτά, ο οξειδωτικός πολυμερισμός των φαινολών μπορεί να είναι είτε ενζυμικός, είτε μη ενζυμικός (Obied et al., 2005a). Για παράδειγμα, οι Fernández-Bolaños et al. (2002) αναφέρουν ότι η αντίδραση συμπλοκοποίησης μεταξύ φαινολικών και μη φαινολικών συστατικών μπορεί να πραγματοποιηθεί παράλληλα ή ανεξάρτητα της οξείδωσης των φαινολών. Εξάλλου, η επεξεργασία σε υψηλή θερμοκρασία προκαλεί τη διάσπαση των ανθοκυανινών (Cacace & Mazza, 2003). Γενικώς, τα πειράματα δείχνουν ότι μερικές κατηγορίες φαινολών όπως τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες είναι ευάλωτες στη θερμική επεξεργασία και οι προαναφερθείσες αντιδράσεις θα μπορούσαν να επιταχυνθούν αυξανομένης της θερμοκρασίας.

Σε σχέση με τη μελέτη συντήρησης, παρατηρήθηκε ότι η EtOH μπορεί να διατηρήσει τις φαινόλες για 18 εβδομάδες, όταν τα απόβλητα προ-θερμανθούν μέχρι τους 60 ^{o}C. Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις φαινολών που επεξεργάστηκαν στους 25, 50 και 60 ^{o}C παρέμειναν σταθερές για όλες τις κατηγορίες, εκτός από τις ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) του δείγματος ελέγχουν (όπως επεξεργάστηκε στους 25 ^{o}C) που έδειξαν μια μικρή μείωση μετά τις πρώτες 6 εβδομάδες.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η EtOH (85 mL/100 mL) μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση ενζύμων, όπως κάνουν άλλες αλκοόλες όπως η μεθανόλη. Το δείγμα που θερμάνθηκε στους 80 ^{o}C παρουσίασε μείωση των περιεχόμενων *o*-διφαινολών με συνακόλουθη αύξηση των συγκεντρώσεων υδροξυκινναμικών οξέων και φλαβονολών κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες δημιουργούν διάφορες αντιδράσεις μεταξύ των περιεχόμενων φαινολών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συντήρησης είναι σε συμφωνία με αυτά αντίστοιχης μελέτης στα απόβλητα ελαιουργείου από τους Lesage-Meessen et al. (2001) (βλ. Ενότητα 7.1). Στην αναφερόμενη μελέτη, το υπό εξέταση υδροαιθανολικό εκχύλισμα διαχωρίστηκε από το κατακρημνισμένο αδιάλυτο υπόλειμμα (στερεό του δείγματος), δηλαδή οι μέθοδοι συντήρησης των μελετών είναι παρόμοιες. Η μόνη διαφορά έγκειται στη συγκέντρωση αιθανόλης των εκχυλισμάτων (εδώ είναι 85 αντί για 30 mL/100 mL).

Από την άλλη, τα αποτελέσματα των Lesage-Meessen et al. (2001) είναι σε αντίθεση με τη μελέτη των Obied et al. (2008), οι οποίοι αναφέρουν ότι η EtOH (σε συγκέντρωση 40 mL /100 mL) δεν είναι επαρκής για τη συντήρηση των φαινολών. Η διαφορά όμως των αποτελεσμάτων μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι η συγκέντρωση EtOH του εκχυλίσματος είναι υψηλότερη (εδώ είναι 85 αντί για 40 mL/100 mL) στη παρούσα μελέτη ή ότι το υπό εξέταση υπόστρωμα ήταν διαφορετικό (χρησιμοποίησαν το κατακρημνισμένο υπόλειμμα αντί για το υπερκείμενο υδροαιθανολικό μέσο).

Σε σχέση με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η EtOH μπόρεσε να συντηρήσει την ικανότητα των εκχυλισμάτων να ανάγουν τα ιόντα σιδήρου καθώς τα ισοδύναμα $FeSO_4$ δεν μειώθηκαν σημαντικά για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 25 ή στους 80 ^oC. Εξάλλου, η μείωση αυτής της παραμέτρου που παρατηρήθηκε μετά από 6 εβδομάδες για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν στους 50 ή 60 ^oC ήταν μεν στατιστικά σημαντική, αλλά επί της ουσίας ήταν σχετικά μικρή. Επιπλεόν, η ικανότητα των εκχυλισμάτων να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα του DPPH βελτιώθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης για όλα τα υπό εξέταση δείγματα.

Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί αντικείμενο για περαιτέρω συζήτηση, αφού παράλληλα η συγκέντρωση ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων παρέμεινε σταθερή. Εξάλλου, όπως είναι γνωστό, μερικές φαινόλες (π.χ. οι φλαβονόλες) αντιδρούν αντιστρεπτά με το αντιδραστήριο DPPH και παράγουν λιγότερο δραστικές κινόνες (Brand-Williams et al., 1995). Στη συνέχεια, οι κινόνες εξουδετερώνουν το DPPH μόριο με το μη-αντιστρεπτό σχηματισμό περίπλοκων παραγώγων αποδόμησης (Goupy et al., 2003). Οι αντιδράσεις αυτές εξελίσσονται σε δύο βήματα: σε ένα πρώτο ταχύ και σε ένα δεύτερο βραδύτερο στάδιο, αντίστοιχα, ειδικά όταν οι άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου δεν είναι πλήρως υποκατεστημένοι (Tsimogiannis et al., 2006). Τα απόβλητα ελαιουργείου περιέχουν τέτοιου είδους φλαβονοειδή (Niaounakis & Halvadakis, 2004). Επομένως, η αυξημένη ΑΔ των εκχυλισμάτων που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 εβδομάδων αποθήκευσης θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η ΑΔ των αρχικών δειγμάτων (εβδομάδα 0) προσδιορίσθηκαν μέσα σε 1 h. Αυτός ο χρόνος είναι σχετικά μικρός για την εξέλιξη της δεύτερης αντίδρασης.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη υπόθεση δεν μπορεί να ερμηνεύσει τη συνεχόμενη αύξηση των τιμών της ΑΔ κατά τη διάρκεια 18 εβδομάδων. Μια άλλη εξήγηση μπορεί να δοθεί από τις αλληλεπιδράσεις των περιεχόμενων φαινολών με την EtOH. Για παράδειγμα, σήμερα αυξάνονται οι αποδείξεις ότι η EtOH έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες από μόνη της, παρόλο που η παρουσία της δεν επηρεάζει πάντα την ΑΔ των δειγμάτων (Antolovich et al., 2002). Σε κάθε περίπτωση, η συντήρηση φαινολών στο αιθανολικό μέσο φαίνεται ότι είναι ευεργετική για την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, αφού τουλάχιστον οι αντίστοιχες δραστικότητες δεν μειώνονται.

Εν κατακλείδι, οι παραπάνω παρατηρήσεις επιφέρουν αλλαγές σε όλη τη μέθοδο ανάκτησης φαινολών και ινών όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6, π.χ. από το στάδιο συμπύκνωσης των αποβλήτων μέχρι το στάδιο εκχύλισης και κατακρήμνισης. Συγκεκριμένα, η συμπύκνωση των αποβλήτων θα ήταν προτιμότερο να πραγματοποιηθεί στους 25 είτε στους 80 ^{o}C, ώστε να αποφευχθεί η δράση των ενζύμων. Η δεύτερη θερμοκρασία (80 ^{o}C) επιταχύνει διάφορες μη-ενζυμικές αντιδράσεις που υποβαθμίζουν το εκχύλισμα φαινολών, αλλά βελτιώνουν τις ιδιότητες ζελοποίησης των πηκτινών του υπολείμματος. Επομένως, η θερμοκρασία θα πρέπει να επιλεχθεί με βάση την προτεραιότητα ανάκτησης των τελικών προϊόντων (φαινόλες ή εδώδιμες ίνες).

Επιπλέον, η προ-επεξεργασία με EtOH (μέχρι 5 mL/100 mL) αυξάνει την ανάκτηση εδώδιμων ινών (βλ. Κεφάλαιο 6) και ταυτόχρονα δεν επηρεάζει την ανάκτηση των φαινολών στο εκχύλισμα. Εν τέλει, η κατακρήμνιση του υπολείμματος αδιάλυτου στην EtOH και ταυτόχρονα η ανάκτηση των φαινολών με 85 mL EtOH/100 mL μπορεί να περιοριστεί στα 30 min χωρίς να επηρεασθεί σημαντικά η ανάκτηση και των δύο κλασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΤΗΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

8.1. Περιγραφή μελέτης

Η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για πιο υγιεινά τρόφιμα παρακινεί την ανάπτυξη προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας, όπως π.χ. προϊόντα σύγκοπτου κρέατος με μειωμένη περιεκτικότητα λίπους και διαφοροποιημένα προφίλ λιπαρών οξέων (Colmenero, 1996). Ώστοσο, η μείωση της περιεκτικότητας των λιπών μεταβάλλει συνήθως τα δομικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων κρέατος (Chevance et al., 2000). Για παράδειγμα, το σύγκοπτο κρέας έχει απώλειες βάρους κατά τη διάρκεια τηγανίσματος, ως αποτέλεσμα της θερμικής μετουσίωσης και της συστολής των πρωτεϊνών του κρέατος. Οι απώλειες λιπών εξαρτώνται συνήθως από την περιεκτικότητα τους στο προϊόν, ενώ οι απώλειες νερού αποτελούν το κύριο μέρος απωλειών στη διάρκεια του τηγανίσματος (Oroszvári et al., 2005b).

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2, η τεχνολογική και διατροφική σημασία των ινών οδήγησε στην ανάπτυξη μια δυναμικής αγοράς προσθέτων τροφίμων και παραγόντων ζελοποίησης. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες αναφορές για την εφαρμογή των ινών σε προϊόντα κρέατος. Έτσι, οι Grigelmo-Miguel et al. (1999b) αναφέρουν ότι η προσθήκη ινών ροδάκινου και νερού σε μίγματα σύγκοπτου κρέατος, ήταν ευεργετική για τις οργανοληπτικές ιδιότητες παραδοσιακών προϊόντων. Επιπροσθέτως, η προσθήκη ινών σιταριού ή πούλπας λεμονιού βελτίωσαν την απόδοση μαγειρέματος σε μπιφτέκια, χωρίς να επηρεάζεται η βρώση αυτών (Mansour & Khalil, 1999; Aleson-Carbonell et al., 2005). Εξάλλου, η προσθήκη πίτουρων σικάλεως ή ρυζιού (μέχρι 10 g/100 g) σε κεφτέδες, δημιούργησε προϊόντα με αποδεκτές οργανοληπτικές ιδιότητες (Huang et al., 2005; Yilmaz, 2004). Οι ίνες διαφόρων λαχανικών (ντομάτας, καρότου, κουνουπιδιού, λάχανου, Σουηδικής κράμβης κ.ά.) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα κρέατος (Tornberg & Sjöholm, 2005). Προσφάτως, οι ίνες φρούτων (π.χ. πορτοκαλιών, μήλου και ροδάκινου) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή λουκάνικων μειωμένων λιπών με αποδεκτό οργανοληπτικό προφίλ (García et al., 2007; Fernández-López et al., 2007).

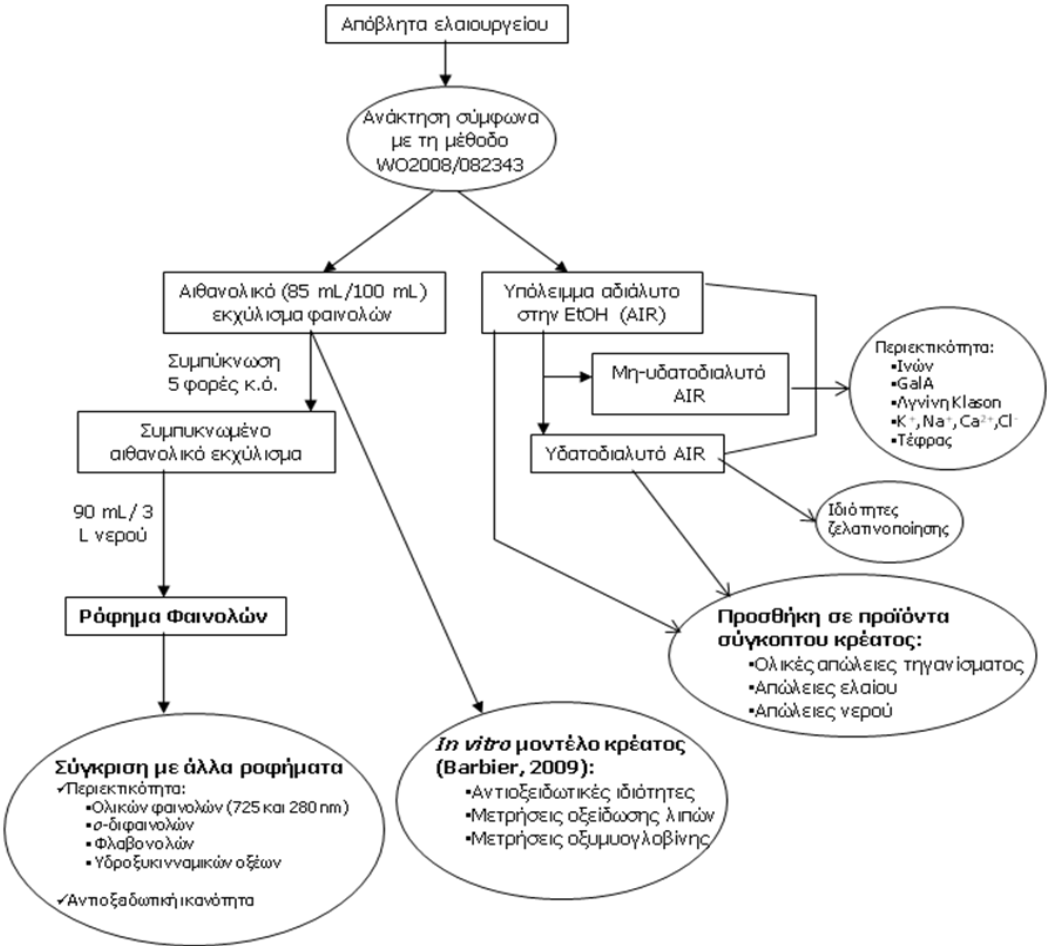
Πέρα όμως από τη διατροφική αξία, οι καταναλωτές σήμερα αναζητούν ολοένα και καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα τρόφιμα π.χ. ελκυστικό χρώμα και οσμή. Κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των προϊόντων πραγματοποιούνται οξειδωτικές διεργασίες που αλλοιώνουν τον οργανοληπτικό τους χαρακτήρα. Για παράδειγμα, η οξείδωση των λιπών του κρέατος και των αντίστοιχων προϊόντων του οδηγεί σε αλλαγή της ποιότητάς του, π.χ. οσμές ταγγίσματος, αλλαγές στο χρώμα και την υφή του κρέατος, μείωση της θρεπτικής του αξίας (Ventanas et al., 2007). Η οξείδωση είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο που επηρεάζει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια και τις φωτοευαίσθητες χρωστικές προκαλείται από το οξυγόνο παρουσία παραγόντων όπως η θερμότητα, οι ελεύθερες ρίζες, το φως, τα ένζυμα, τα μεταλλικά ιόντα και το αλάτι (Rouzen et al., 1987; Ladikos & Lougovois, 1990; Kanner, 1994; Laguerre et al., 2007). Επιπλέον, αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες απώλειας της ποιότητας του κρέατος και παράλληλα μειώνει το χρόνο ζωής του τελικού προϊόντος (Akarpat et al., 2008). Για παράδειγμα, προκαλείται η οξείδωση της μυογλοβίνης (σαρκοπλασμική πρωτεΐνη) σε μετα-μυογλοβίνη (καφέ χρώμα) που επηρεάζει το χρώμα του κρέατος (Mancini & Hunt, 2005). Οι αλλαγές στο χρώμα του κρέατος αποτελούν ένα βασικό πρόβλημα της βιομηχανίας κρέατος: προκαλούν ετήσια απώλεια 1 δισεκατομμυρίου αμερικανικών δολαρίων (Hunt & Mancini, 2009). Η καθυστέρηση των αρνητικών επιδράσεων της οξείδωσης μπορεί να αποφευχθεί με την προσθήκη αντιοξειδωτικών στο κρέας. Πιο συγκεκριμένα, διάφορα συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως η BHA (βουτυλιωμένη υδροξυ-ανισόλη) και το BHT (βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουένιο) χρησιμοποιούνται για περισσότερο από 50 χρόνια στα προϊόντα κρέατος (Rojas & Brewer, 2008). Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις δεν είναι φυσικές, οπότε δεν συμβαδίζουν με το πνεύμα της εποχής που επιβάλει τη συντήρηση τροφίμων με φυσικά πρόσθετα που θεωρούνται πιο υγιεινά από τους καταναλωτές.

Στα προηγούμενα Κεφάλαια μελετήθηκε η ανάκτηση ινών (6°) και φαινολών (7°) από τα απόβλητα ελαιουργείων σε δύο διαφορετικά προϊόντα: (α) το AIR (β) το αιθανολικό (85 mL EtOH/100 mL) εκχύλισμα φαινολών. Οι μελέτες των προηγούμενων Κεφαλαίων οδήγησαν στη βελτιστοποιήση της μεθόδου (βλ. Ενότητα 5.5.1) και στην κατοχύρωση αυτής με πατέντα (WO2008/082343) στον Παγκόσμιο Οργανισμό Πνευματικών Δικαιωμάτων-World Intellectual Property Organization-WIPO (Tornberg & Galanakis, 2008). Τα προϊόντα που ανακτήθηκαν σύμφωνα με αυτά τη μέθοδο διερευνήθηκαν περαιτέρω για την εφαρμογή τους ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ποτά (**Σχήμα 8.1**). Πιο συγκεκριμένα, το AIR χαρακτηρίστηκε σε σχέση με την περιεκτικότητα σε ίνες και ιόντα και το υδατοδιαλυτό του κλάσμα (WSAIR) μελετήθηκε ως προς τις ρεολογικές του ιδιότητες. Στη συνέχεια, τα δύο υλικά χρησιμοποιήθηκαν ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (συγκεκριμένα κεφτέδες) μαζί ή ξεχωριστά με άλλα πρόσθετα όπως ίνες καρότου και συγκρίθηκαν σε σχέση με τις ιδιότητες μαγειρέματος των προϊόντων. Εξάλλου, το αιθανολικό εκχύλισμα φαινολών χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή ενός ροφήματος (ελαφρού ποτού) φαινολών, η σύσταση του οποίου περιγράφεται αναλυτικά στο επόμενο Κεφάλαιο (Ενότητα 9.2). Το

ρόφημα συγκρίθηκε ως προς τις περιεχόμενες φαινόλες και τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες με άλλα παραδοσιακά ροφήματα όπως π.χ. πράσινο τσάι, φασκόμηλο, μαλοτήρα και δίκταμο.

Τέλος, το αιθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε ως αντιοξειδωτικό πρόσθετο σε ένα μοντέλο προϊόντος κρέατος *in vitro*, σύμφωνα με την μέθοδο των Hayes et al. (2009). Κατόπιν, προσδιορίσθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτού με τις μεθόδους της αντιριζικής δραστικότητας με το αντιδραστήριο $ABTS^+$ (2,2' azinobs-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid), της αναγωγικής ικανότητας FRAP (Ferric reducing ability of Plasma method), και της επιβράδυνδης της οξείδωσης των λιπών με το TBA (Thiobarbituric acid).

Η μελέτη με το μοντέλο προϊόντος κρέατος πραγματοποιήθηκε από μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Πανεπιστήμιου του Λουντ της Σουηδίας (Barbier, 2009), παράλληλα με τη μελέτη εφαρμογών του τρέχοντος Κεφαλαίου και σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα.



Σχήμα 8.1. Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων.

8.2. Χαρακτηρισμός και ιδιότητες ζελοποίησης των ανακτημένων υπολειμμάτων ινών

Στον **Πίνακα 8.1** φαίνονται τα χαρακτηριστικά του AIR, καθώς επίσης και των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών κλασμάτων του. Το AIR ήταν διαλυτό στο νερό κατά 56,7 g/100 g, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης ανόργανων συστατικών (32,7 g τέφρα/100 g). Τα ανόργανα συστατικά αποτελούνταν κυρίως από ιόντα K^+ και Cl^-, ενώ τα ιόντα Na^+ και Ca^{2+} βρέθηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Το AIR περιείχε επίσης 25,1 g λιγνίνης Klason, 5,0 g λιπών και 6,3 g ολικών ινών/100 g, ενώ το GalA ήταν ίσο με 3,7g/100 g. Το WSAIR περιείχε υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων συστατικών (46,2 g τέφρας και 10,4 g K^+/100 g) ενώ οι ίνες περιείχαν κυρίως πηκτίνες (5,6 g ολικών ινών και 5,3 g GalA/100 g). Η λιγνίνη Klason κατανεμήθηκε αποκλειστικά στο μη υδατοδιαλυτό κλάσμα. Η λιγνίνη Klason δεν αντιπροσωπεύει μόνο τη λιγνίνη, αλλά και διάφορες τανίνες, πρωτεϊνικά συστατικά και δύσπεπτα παραπροϊόντα της αντίδρασης Maillard (Theander et al., 1995). Η λιγνίνη Klason δεν απορροφάται εύκολα από τον οργανισμό. Εξάλλου, στο κλάσμα WSAIR υπάρχουν και άλλα συστατικά όπως αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα και άλλα ανόργανα άλατα (Galanakis et al., 2010a).

Το υδατοδιαλυτό κλάσμα AIR διαλύθηκε σε νερό μέχρι διαφορετικών συγκεντρώσεων GalA και εξετάστηκε σε ρεολογικές δοκιμές. Τα υπό εξέταση δείγματα είχαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 1,1, 1,4, 1,8, 2,1 και 2,4 g GalA/100 mL. Το pH όλων των συμπυκνωμάτων ήταν όξινο (pH = 5,2±0,2). Στο **Σχήμα 8.2** φαίνονται οι συντελεστές αποθήκευσης και απωλειών (G' και G'', αντίστοιχα), καθώς επίσης και το ιξώδες των μιγμάτων WSAIR συναρτήσει της συγκέντρωσης GalA. Οι δύο συντελεστές και το ιξώδες αυξήθηκαν εκθετικά ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης συγκέντρωσης GalA. Τα μίγματα πηκτινών άνω του 1,4 g GalA/100 mL χαρακτηρίσθηκαν από ελαστική συμπεριφορά ($G' > G''$) σε όλο το εξεταζόμενο εύρος πιέσεων αποκοπής (0-10 Pa). Ωστόσο, η ύπαρξη στερεού ζελέ ($G' > G'' > 100$ Pa) παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις άνω του 1,8 g/100 mL.

Στο **Σχήμα 8.3** φαίνεται η εφαπτομένη απωλειών, στη σχετικά χαμηλή συχνότητα ταλάντευσης του 1 Hz, συναρτήσει της συγκέντρωσης GalA. Το ακριβές σημείο ζελοποίησης παρατηρείται όταν η τιμή της εφαπτομένης απωλειών ($\tan\delta = G''/G'$) γίνεται μικρότερη από ένα (<1). Τιμές της εφαπτομένης απωλειών μικρότερες του 1, εμφανίσθηκαν όταν η συγκέντρωση του GalA αυξήθηκε άνω του 1,25 g/100 ml (περίπου), απότομη δε μείωσή της (3 φορές) παρατηρήθηκε όταν η συγκέντρωση του GalA στα 2,5 g/100 ml οδήγησε την τιμή της εφαπτομένης σε αμελητέα μείωση. Πέραν της συγκέντρωσης των 1,8 g/100 mL, η εφαπτομένη απωλειών και συνακόλουθα η ελαστικότητα του ζελέ των ανακτημένων μιγμάτων πηκτινών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε αντίθεση με την παρατηρούμενη αύξηση της ισχύος του ζελέ.

Παρά το σχετικά υψηλό ΒΜ των πηκτινών (48 mol CH_3OH/100 mol GalA) και το γεγονός ότι η συγκέντρωση μονοκατιόντων στο WSAIR είναι 15 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την περιεκτικότητα Ca (**Πίνακας 8.1**), ο μηχανισμός ζελοποίησης βασίστηκε πιθανότατα στο σχηματισμό συμπλόκων ανάμεσα στο Ca και τις καρβοξυλο-ομάδες των πηκτινών, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 6.7 για τα συμπυκνώματα πηκτινών του ελαιόκαρπου. Οι συγκεντρώσεις GalA γύρω από το σημείο ζελοποίησης ήταν μικρότερες σε αυτήν τη μελέτη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που παρατηρήθηκαν για το υλικό που ανακτήθηκε στην Ενότητα 6.7, π.χ. 2,5 και 2,8 g GalA/100 mL για ελαστική συμπεριφορά και αντίστοιχα το σχηματισμό ισχυρού-στερεού ζελέ. Επομένως, το ανακτώμενο υλικό ινών στη μελέτη αυτού του Κεφαλαίου έδειξε καλύτερη ικανότητα ζελοποίησης, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετου τροφίμων σε χαμηλότερες ποσότητες. Επιπλέον, ο ΒΜ των ανακτώμενων πηκτινών της τρέχουσας μελέτης ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με την τιμή που παρατηρήθηκε στη μελέτη του 6^{ου} Κεφαλαίου (48 αντί για 59 mol CH_3OH/100 mol GalA). Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει υψηλότερη δράση της ενδογενούς ΠΜΕ στη χαμηλότερη θερμοκρασία των 60 ^oC (αντί για 80 ^oC) κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης των αποβλήτων και της εκχύλισης των ινών.

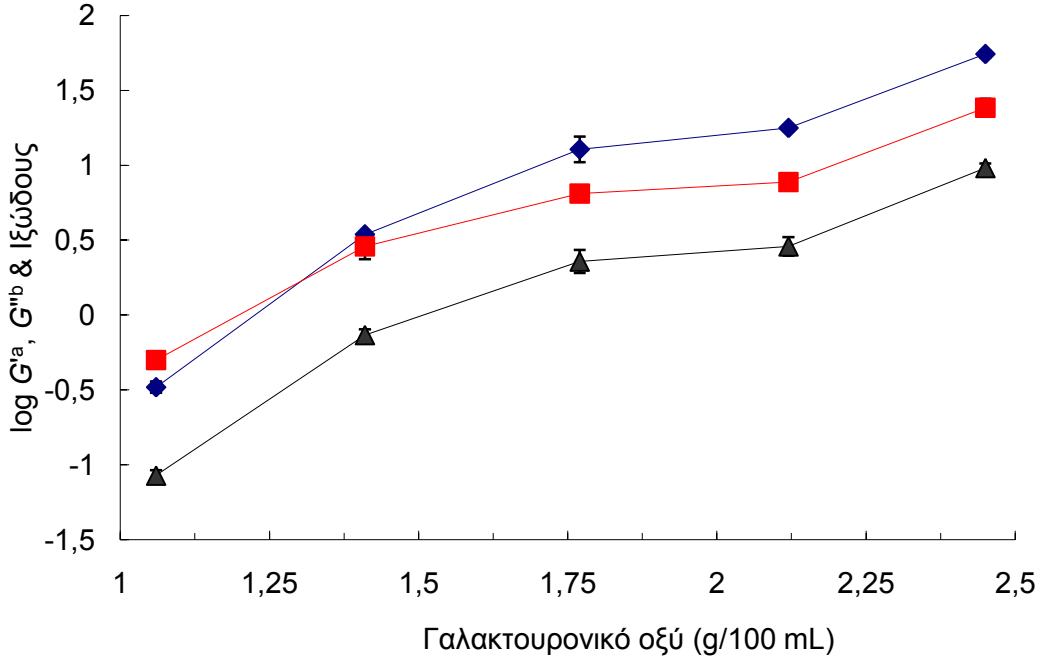
Πίνακας 8.1. Χαρακτηρισμός των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών κλασμάτων του δείγματος AIR, όπως ανακτήθηκαν με τη μέθοδο WO2008/082343.

Παράμετρος	Κλάσμα AIR[a] (g/100 g)[b]		
	Υδατοδιαλυτό	Μη υδατοδιαλυτό	Ολικό
Υδατοδιαλυτό υλικό	–	–	56,7 ± 0,5
Νερό	–	–	9,4 ± 0,2
Λίπη και έλαια	–	–	5,0 ± 0,3
Τέφρα	46,2 ± 0,2	4,6 ± 0,1	32,7 ± 0,5
K^+	10,44 ± 0,41	1,02 ± 0,01	5,76 ± 0,09
Na^+	1,29 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,71 ± 0,01
Ca^{2+}	0,61 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,54 ± 0,03
Cl^-	2,6 ± 0,2	–	1,5 ± 0,2
Λιγνίνη Klason	–	55,2 ± 0,3	25,1 ± 0,4
Ολικές εδώδιμες ίνες	5,6 ± 0,1	7,1 ± 0,2	6,3 ± 0,2
Γαλακτουρονικό οξύ	5,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
Βαθμός μεθυλίωσης των πηκτινών	48 ± 2[c]	–	–

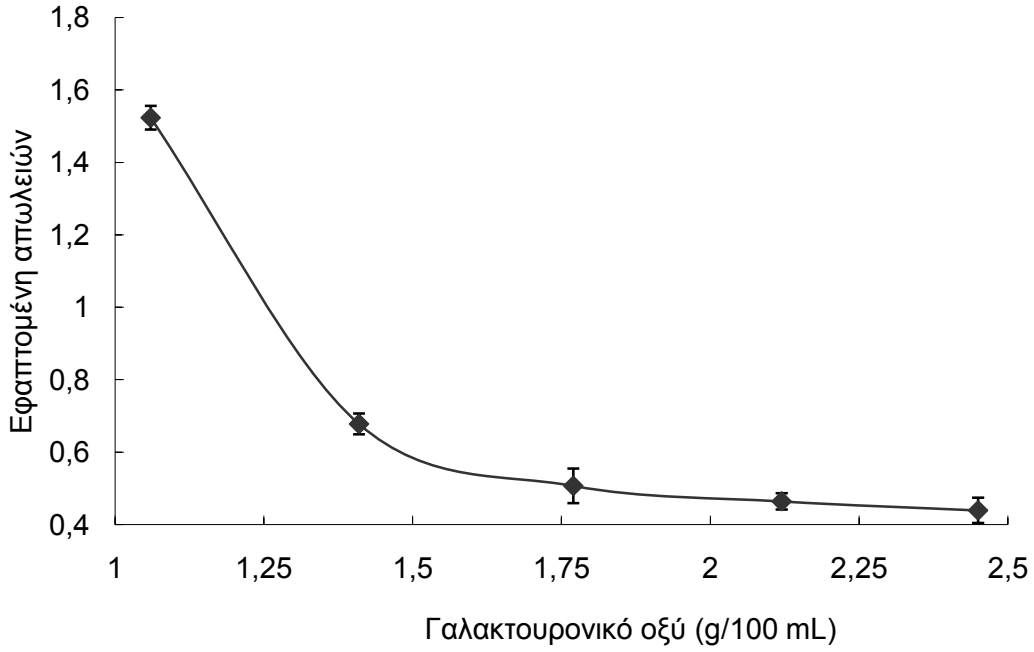
[a] "AIR" για "υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη", όπως ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[b] Οι τιμές εκφράζονται ως g/100 g υδατοδιαλυτού, μη υδατοδιαλυτού και ολικού ξηρού βάρους αδιάλυτου υπολείμματος στην αιθανόλη, αντίστοιχα. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3).

[c] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2) και εκφράζεται ως mol μεθανόλης/100 mol γαλακτουρονικού οξέος.



Σχήμα 8.2. Log *G'* (Pa^{-1}) (◆), log *G''* (Pa^{-1}) (■), log ιξώδους ($Pa^{-1}\cdot s^{-1}$) (▲) συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτουρονικού οξέος (g/100 mL), όπως προσδιορίσθηκε στο 1 Hz. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa). [a] *G'* για συντελεστή αποθήκευσης. [b] *G''* για συντελεστή απωλειών.



Σχήμα 8.3. Η εφαπτομένη απωλειών (tan*δ*) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση γαλακτουρονικού οξέος (g/100 mL) μετρηθείσα στο 1 Hz. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n*=2) των τιμών που παρατηρήθηκαν στην ευθεία ιξωδο-ελαστική περιοχή (0-10 Pa).

8.3. Εφαρμογή των ανακτημένων υπολειμμάτων ινών σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος

Στον **Πίνακας 8.2** φαίνεται η σύσταση των εξετασθέντων σκευασμάτων σύγκοπτου κρέατος (κεφτέδων). Η περιεκτικότητα πρωτεϊνών, αμύλου και νερού υπολογίστηκαν από τις συστάσεις των πρώτων υλών όπως δόθηκαν από τους προμηθευτές. Η περιεκτικότητα νερού και λιπών προσδιορίσθηκαν με ανάλυση των κεφτέδων άψητων και τηγανισμένων. Η αναλογία νερού/πρωτεΐνης (*W*/*P*) παρέμεινε σταθερή (8,1±0,2) για όλα τα δείγματα (συνταγές 1-8) ώστε να αποφευχθούν τυχόν παρεμβολές στην ικανότητα συγκράτησης νερού των πρωτεϊνών του κρέατος. Το δείγμα ελέγχου (συνταγή 1) περιείχε υψηλή περιεκτότητα λιπών και. Όλοι οι υπόλοιποι εξετασθέντες κεφτέδες (συνταγές 2-7) παρασκευάσθηκαν με άπαχη σπάλα μοσχαριού και χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα λιπών και σχετικά σταθερή περιεκτικότητα πρωτεϊνών. Το δεύτερο και το τρίτο δείγμα (συνταγές 2 και 3) χαρακτηρίζονται με χαμηλή λιπο-περιεκτικότητα, αλλά με υψηλή και χαμηλή περιεκτικότητα αμύλου, αντίστοιχα. Τα πρώτα τρία δείγματα (συνταγές 1-3) καθώς και το δείγμα νούμερο 5 περιείχαν ίνες σε κλίμακα χαμηλών συγκεντρώσεων (0,3-0,4 g/100 g), ενώ το τέταρτο δείγμα είχε λίγο υψηλότερη συγκέντρωση ινών (0,5 g/100 g) εξαιτίας του προστιθέμενου καρότου. Τα υπόλοιπα εξετασθέντα δείγματα (συνταγές 6-8) είχαν υψηλότερη συγκέντρωση ινών (0,6 g/100 g). Τέλος, τα δείγματα 3 και 8 χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα αμύλου.

Στον **Πίνακα 8.3** φαίνονται οι απώλειες μαγειρέματος των κεφτέδων (συνταγές 1-6) κατά τη διάρκεια μαγειρέματος αυτών (σε τηγάνι). Οι απώλειες μαγειρέματος μπορούν να εκφραστούν ως ολικές ή σε δύο κύριες κατηγορίες, π.χ. απώλειες νερού και λιπών. Όλα τα υπό εξέταση δείγματα με άπαχο κρέας έδειξαν αμελητέες απώλειες λιπών (0,0-0,1 g/100 g), ενώ το δείγμα ελέγχου έδειξε απώλειες ίσες με 4,3 g/100 g. Το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τους Andersson et al. (2000) που δείξανε ότι όσο πιο υψηλή είναι η περιεκτικότητα των λιπών, τόσο υψηλότερες είναι οι απώλειες αυτών. Από την άλλη, οι απώλειες νερού ήταν πολύ υψηλότερες και οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματα μεγαλύτερες. Οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για τα δείγματα με προστιθέμενο άμυλο (συνταγές 1-2), ενώ η υψηλότερη τιμή παρατηρήθηκε για το δείγμα χωρίς άμυλο ή ίνες (συνταγή 3). Η προσθήκη AIR στο μίγμα (συνταγή 5) δεν βελτίωσε στατιστικά σημαντικά τις απώλειες νερού. Τα δείγματα με προστιθέμενο καρότο (συνταγή 4) παρουσίασαν σημαντικά μικρότερες απώλειες νερού, σε σύγκριση με τους κεφτέδες που δεν είχαν κάποιο πρόσθετο (συνταγή 3). Επιπλέον, τα δείγματα με καρότο και AIR (συνταγή 6) έδειξαν τις ίδιες απώλειες νερού. Ωστόσο, οι τιμές αυτές εξακολουθούν να είναι πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες των δειγμάτων που περιέχουν άμυλο. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τις ολικές απώλειες, οι οποίες ακολούθησαν το μέγεθος και τη σειρά των απωλειών νερού, μιας και οι απώλειες λιπών ήταν αμελητέες.

Πίνακας 8.2. Χαρακτηρισμός των κεφτέδων πριν και μετά το τηγάνισμα τους.

Δείγματα κεφτέδων				Σύσταση (g/100 g)								
Σ.[a]	Περιγραφή		Ακατέργαστο	Ακατέργαστο					Μαγείρεμα σε τηγάνι		Μαγείρεμα σε φριτέζα	
	Κρέας	Πρόσθετο	(*W/P*)[b]	Πρωτεΐνη[c]	Ίνες[c]	Άμυλο[c]	Νερό[d]	Λίπη[d]	Νερό[d]	Λίπη[d]	Νερό[d]	Λίπη[d]
1	Κανονικό	Αλεύρι πατάτας	8,1	8,0	0,4	8,5	64,9 ± 0,5	12,7 ± 0,5	59,6 ± 1,9	11,0 ± 1,3	57,3 ± 0,6	11,2 ± 0,4
2	Άπαχο	Αλεύρι πατάτας	8,0	9,5	0,4	7,8	75,9 ± 0,1	1,3 ± 0,4	70,1 ± 1,1	1,8 ± 0,4	65,1 ± 0,7	3,4 ± 0,1
3	Άπαχο	—	7,9	10,2	0,3	1,1	80,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	68,1 ± 0,7	4,2 ± 0,3	58,8 ± 1,7	9,4 ± 1,1
4	Άπαχο	Καρότο	8,1	10,1	0,5	1,2	82,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	72,8 ± 0,2	2,2 ± 0,1	64,7 ± 1,4	7,7 ± 1,1
5	Άπαχο	AIR[e]	8,1	9,9	0,4	1,1	79,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1	69,2 ± 0,9	3,5 ± 0,3	60,6 ± 1,2	9,5 ± 0,8
6	Άπαχο	AIR[e] και καρότο	8,3	9,9	0,6	1,1	82,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	71,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2	63,2 ± 0,3	8,0 ± 0,6
7	Άπαχο	WSAIR[f]	8,0	9,5	0,6	1,0	75,8 ± 0,1	2,1 ± 0,4	δ.π.[g]	δ.π.[g]	58,1 ± 0,3	4,4 ± 0,1
8	Άπαχο	WSAIR[f] και καρότο	8,1	9,7	0,6	1,1	78,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	δ.π.[g]	δ.π.[g]	60,9 ± 0,4	7,0 ± 0,1

[a] "Σ." για "αριθμό συνταγής".

[b] "W/P" για "αναλογία νερού/πρωτεΐνης".

[c] Συγκέντρωση πρωτεΐνης, αμύλου και ινών των ακατέργαστων κεφτέδων όπως υπολογίστηκαν από την περιεκτικότητα των ακατέργαστων πρώτων υλών που δόθηκε από τους προμηθευτές.

[d] Περιεκτικότητα νερού και λιπών των ακατέργαστων και των τηγανισμένων κεφτέδων όπως προσδιορίσθηκαν με ανάλυση. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2).

[e] "AIR" για "υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη" όπως ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[f] "WSAIR" για "υδατοδιαλυτό υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη" όπως ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[g] "δ.π." για "δεν προσδιορίσθηκε".

Πίνακας 8.3. Απώλειες μαγειρέματος των κεφτέδων κατά το μαγείρεμα αυτών στο τηγάνι και τη φριτέζα.

Δείγματα κεφτέδων			Απώλειες μαγειρέματος (g/100 g αρχικού φρέσκου βάρους)[a]					
Αριθμός	Περιγραφή		Μαγείρεμα σε τηγάνι			Μαγείρεμα σε φριτέζα		
συνταγής	Κρέας	Πρόσθετο	Νερού	Λιπών	Ολικές	Νερού	Λιπών	Ολικές
1	Κανονικό	Άμυλο	19,3 ± 2,6[e]	4,3 ± 0,9[e]	23,9 ± 0,2[e]	23,4 ± 0,7[e]	4,1 ± 0,2[e]	25,8 ± 1,2[e]
2	Άπαχο	Άμυλο	18,8 ± 2,2[e]	0,0 ± 0,1[f]	19,0 ± 0,8[f]	28,5 ± 1,6[f]	-1,3 ± 0,1[f]	23,6 ± 1,2[e]
3	Άπαχο	–	39,8 ± 0,4[f]	0,1 ± 0,1[f]	42,6 ± 0,6[g]	48,1 ± 0,9[g]	-3,2 ± 0,4[g]	48,4 ± 1,0[f]
4	Άπαχο	Καρότο	34,3 ± 0,4[g]	0,1 ± 0,1[f]	37,9 ± 0,4[h]	43,6 ± 1,1[h]	-3,1 ± 0,6[g]	40,8 ± 0,5[g]
5	Άπαχο	AIR[b]	38,1 ± 0,9[f]	0,0 ± 0,1[f]	41,6 ± 0,5[g]	49,5 ± 0,1[g]	-3,1 ± 0,2[g]	43,8 ± 1,2[h, i]
6	Άπαχο	AIR[b] και καρότο	34,4 ± 1,9[g]	0,1 ± 0,1[f]	37,3 ± 0,9[h]	43,4 ± 1,3[h]	-3,6 ± 0,5[g]	42,2 ± 1,3[g, h]
7	Άπαχο	WSAIR[c]	δ.π.[d]	δ.π.[d]	δ.π.[d]	41,6 ± 0,5[h]	-0,5 ± 0,1[h]	45,1 ± 1,0[i]
8	Άπαχο	WSAIR[c] και καρότο	δ.π.[d]	δ.π.[d]	δ.π.[d]	41,9 ± 0,6[h]	-2,2 ± 0,1[i]	44,4 ± 0,4[i]

[a] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 2). Αρνητικές τιμές αναπαριστούν προσρόφηση ελαίων (g/100 g αρχικού φρέσκου βάρους) αντί για απώλειες λιπών.

[b] "AIR" για "υπόλειμμα αδιάλυτο στην αιθανόλη" όπως ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[c] "WSAIR" για "υδατοδιαλυτό υπόλειμμα, αδιάλυτο στην αιθανόλη" όπως ανακτήθηκε από τα απόβλητα ελαιουργείου.

[d] "δ.π." για "δεν προσδιορίσθηκε".

[e-i] Οι τιμές με το ίδιο ελληνικό γράμμα για εκθέτη (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($P \leq 0,05$).

Το μαγείρεμα με τηγάνι είναι μία από τις πιο κοινές μεθόδους στη βιομηχανία τροφίμων και μάλιστα δεν περιλαμβάνει τη δυσάρεστη προσρόφηση ελαίου. Οι παρατηρούμενες απώλειες λιπών αναμένονταν, καθώς τα λίπη μπορούν να απομακρυνθούν από τους κεφτέδες μόνο σε μορφή σταγόνων, καθώς δεν εξατμίζονται στις συνήθεις θερμοκρασίες τηγανίσματος (175 °C). Από την άλλη, η υγρασία μπορεί να απομακρυνθεί από τους κεφτέδες είτε σε μορφή σταγόνων, είτε σε μορφή ατμών. Το μαγείρεμα προκαλεί δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες του κρέατος και συρρίκνωση αυτών, με συνέπεια τη συνεχόμενη ροή απομάκρυνσης νερού έξω από τους κεφτέδες και τη μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού (Oroszvári et al., 2006). Οι ίνες μπορούν να βελτιώσουν την ικανότητα συγκράτησης νερού των κεφτέδων με τη δέσμευση του απελευθερωμένου νερού. Παρόλο που το άμυλο πατάτας έδειξε την υψηλότερη συγκράτηση νερού, κάποια από τα δείγματα με προστιθέμενες ίνες έδειξαν επίσης βελτιωμένες απώλειες νερού και ολικές απώλειες κατά τη διάρκεια μαγειρέματος αυτών στο τηγάνι.

Τα δείγματα με καρότο (μόνο του ή μαζί με AIR) έδειξαν σημαντικά μικρότερες απώλειες νερού σε σύγκριση με το δείγμα που περιείχε μόνο AIR, είτε εξαιτίας την υψηλότερης περιεκτικότητας ινών (0,5-0,6 g αντί για 0,4 g/100 g, αντίστοιχα). Παρόλο που οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις ινών είναι μικρές σε σχέση με το βάρος όλου του κεφτέ, η συγκέντρωση ινών μπορεί να είναι τοπικά υψηλή καθώς το περισσότερο νερό δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες. Οι διαλυτές ίνες συχνά δεσμεύουν το νερό σχηματίζοντας ένα δίκτυο ζελέ (Thebaudin et al., 1997). Οι αδιάλυτες ίνες μπορούν επίσης να σχηματίσουν ζελέ, αλλά η ελαστικότητα τους είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με το ιξώδες της υδατικής φάσης, π.χ. των διαλυτών ινών. Έτσι, όταν οι διαλυτές ίνες συνδυάζονται με τις αδιάλυτες, οι τελευταίες κυριαρχούν στο μέσο (Bayod et al., 2008). Η πούλπα καρότου είναι πλούσια (56,3 g/100 g) σε αδιάλυτες ίνες (Hsu et al., 2006), ενώ το AIR ήταν πλουσιότερο σε υδατο-διαλυτό υλικό (56,7 g/100 g, **Πίνακας 8.1**). Επομένως, το πλεονέκτημα των ινών καρότου έναντι των ινών του AIR, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το πρώτο περιέχει περισσότερες αδιάλυτες ίνες από το δεύτερο.

Στον **Πίνακα 8.3** φαίνονται επίσης οι απώλειες μαγειρέματος των κεφτέδων (συνταγές 1-8) κατά τη διάρκεια τηγανίσματός τους στη φριτέζα. Τα δείγματα με προστιθέμενο άμυλο (συνταγές 1 και 2) έδειξαν τις χαμηλότερες τιμές, ενώ οι υψηλότερες απώλειες νερού παρατηρήθηκαν ξανά για τα δείγματα που προετοιμάστηκαν χωρίς κάποιο πρόσθετο (συνταγή 3) ή την προσθήκη AIR (συνταγή 5), αντίστοιχα. Σημαντικά μικρότερες απώλειες νερού παρατηρήθηκαν για τα δείγματα που περιείχαν καρότο (συνταγές 4 και 6). Τα δείγματα που περιέχουν WSAIR (συνταγές 7 και 8) έδειξαν ακόμα μικρότερες απώλειες νερού, αλλά οι τιμές δεν ήταν στατιστικά διαφορετικές από αυτές που παρατηρήθηκαν για τα δείγματα που περιείχαν καρότο.

Σε σχέση με τις απώλειες λιπών, το δείγμα αναφοράς έδειξε απώλειες της τάξης των 4,1 g/100 g. Όλα τα υπό εξέταση δείγματα που προετοιμάστηκαν με άπαχο κρέας έδειξαν αρνητικές απώλειες λιπών υποδεικνύοντας την προσρόφηση ελαίου σε αυτά. Το δείγμα με προστιθέμενο άμυλο (συνταγή 2) έδειξε προσθήκη ελαίου της τάξης των 1,3 g/100 g, ενώ το δείγμα χωρίς κάποιο πρόσθετο (συνταγή 3) έδειξε δύο φορές μεγαλύτερη προσρόφηση ελαίου. Τα δείγματα που προετοιμάστηκαν με την προσθήκη καρότου ή AIR (συνταγή 4 και 5) είχαν ανάλογες τιμές προσρόφησης. Επιπλέον, το δείγμα που προετοιμάστηκε με συνδυασμό καρότου και AIR (συνταγή 6) έδειξε ακόμα υψηλότερη προσρόφηση ελαίου, αλλά οι τιμές δεν ήταν στατιστικά διαφορετικές από τα δείγματα 3-5. Από την άλλη μεριά, το δείγμα που προετοιμάστηκε με συνδυασμό καρότου και WSAIR (συνταγή 8) έδειξε σημαντικά μικρότερη τιμή προσρόφησης, ενώ το δείγμα που προετοιμάστηκε μόνο με το WSAIR (συνταγή 7) έδειξε τη χαμηλότερη προσρόφηση ελαίου (0,5 g/100 g). Εν κατακλείδι, οι αντίστοιχες ολικές απώλειες των υπό εξέταση δειγμάτων ακολούθησαν λίγο ή πολύ τη σειρά και το μέγεθος των απωλειών νερού, παρά τις διακυμάνσεις στην προσρόφηση ελαίου.

Το ποσοστό της προσρόφησης ελαίου σε σχέση με τις ιδιότητες των πρόσθετων ινών είναι σημαντικό να επισημανθεί. Τα τελευταία τρία δείγματα (συνταγές 6-8) είχαν την ίδια περιεκτικότητα ινών (0,6 g/100 g), αλλά διαφορετικά ποσοστά προσρόφησης ελαίου. Για παράδειγμα, η χαμηλότερη τιμή της προσρόφησης ελαίου παρατηρήθηκε για το δείγμα που περιείχε τις περισσότερες διαλυτές ίνες (συνταγή 8), ενώ οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για τα δείγματα που περιείχαν χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις αδιάλυτων ινών (συνταγές 4-6). Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι οι διαλυτές ίνες μπορούν να μειώσουν την προσρόφηση ελαίου του προϊόντος. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι διαλυτές ίνες μπορούν να δημιουργήσουν δίκτυο ζελέ που αυξάνει το ιξώδες της υδατικής φάσης των κεφτέδων και πιθανότατα θα περιόριζε τη διείσδυση ελαίου στον πυρήνα του κεφτέ. Τα αποτέλεσματα της τρέχουσας μελέτης είναι πολύ σημαντικά για την τεχνολογία κρέατος, αφού προσρόφηση ελαίου πραγματοποιείται πάντα κατά τη διάρκεια τηγανίσματος σε φριτέζα και έτσι είναι δύσκολο να προκύψει ένα τηγανισμένο προϊόν με χαμηλή συγκέντρωση ελαίων.

Στον **Πίνακα 8.2** φαίνεται η περιεκτικότητα νερού και ελαίου των κεφτέδων, πριν και μετά το μαγείρεμα τους. Σε σχέση με τη διεργασία μαγειρέματος σε τηγάνι, όλοι οι υπό εξέταση κεφτέδες με άπαχο κρέας, έδειξαν μέχρι 2 φορές υψηλότερη συγκέντρωση λιπών κατόπιν τηγανίσματος, παρά τις προαναφερθείς αμελητέες απώλειες λιπών. Αυτό συμβαίνει επειδή οι απώλειες νερού ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές των λιπών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται υψηλότερη περιεκτικότητα λιπών μετά το μαγείρεμα. Η περιεκτικότητα του νερού των κεφτέδων μειώθηκε μεν μετά το μαγείρεμά τους αλλά έμεινε σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νερού (72,8 και 71,7 g/100 g) παρατηρήθηκαν για τα δείγματα που περιείχαν καρότο (συνταγές 4 και 6, αντίστοιχα).

Σε σχέση με τη διεργασία τηγανίσματος σε φριτέζα, όλα τα υπό εξέταση δείγματα που προετοιμάστηκαν με άπαχο κρέας, έδειξαν πολύ υψηλότερες (3-5 φορές) περιεκτικότητες λιπών μετά το τηγάνισμά τους. Επιπλέον, οι μαγειρεμένοι κεφτέδες χωρίς κανένα πρόσθετο (συνταγή 3) είχαν πολύ υψηλή περιεκτικότητα λιπών που είναι συγκρίσιμη με αυτήν που παρατηρήθηκε για το δείγμα που προετοιμάστηκε με κανονικό κρέας και άμυλο (συνταγή 1). Η χαμηλότερη περιεκτικότητα λιπών (3,4 g/100 g) παρατηρήθηκε για το δείγμα με άπαχο κρέας και προστιθέμενο άμυλο (συνταγή 2). Το δείγμα που προετοιμάστηκε με προστιθέμενο WSAIR (συνταγή 7) είχε τη δεύτερη μικρότερη τιμή περιεκτικότητας λιπών, εξαιτίας της προαναφερθείσας χαμηλής προσρόφησης ελαίου (0,5 g/100 g). Η περιεκτικότητα νερού των κεφτέδων μειώθηκε σημαντικά εξαιτίας της υψηλότερης προσρόφησης ελαίου κατά τη διάρκεια τηγανίσματος σε φριτέζα. Το δείγμα που περιείχε WSAIR (συνταγή 7) είχε τη μικρότερη περιεκτικότητα νερού (58,1 g/100 g) σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα άπαχου κρέατος. Από την άλλη πλευρά, οι κεφτέδες που προετοιμάστηκαν με άπαχο κρέας και άμυλο ή καρότο (συνταγές 2, 4 και 6) έδειξαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις νερού, όπως παρόμοια περιγράφηκε από τη διεργασία μαγειρέματος σε τηγάνι.

Παρότι το ποσοστό της προσρόφησης ελαίου (0,5-3,6 g/100 g) ήταν σχετικά χαμηλό, η προκύπτουσα περιεκτικότητα ελαίου των μαγειρεμένων κεφτέδων ήταν υψηλή (3,4-9,5 g/100 g). Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχει μια επιπλέον επίδραση των υψηλών απωλειών νερού σε σύγκριση με τις απώλειες λιπών κατά τη διάρκεια τηγανίσματος. Το άμυλο πατάτας αποδείχτηκε ως το καταλληλότερο πρόσθετο στους κεφτέδες σε σύγκριση με τα άλλα υπό εξέταση δείγματα, καθώς έδωσε το προϊόν με την υψηλότερη περιεκτικότητα νερού και ελαίου. Σε σχέση με τα πρόσθετα ινών, το καρότο έδειξε την καλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού, ενώ το WSAIR είχε τη χαμηλότερη ικανότητα προσρόφησης ελαίου κατά το τηγάνισμα στη φριτέζα.

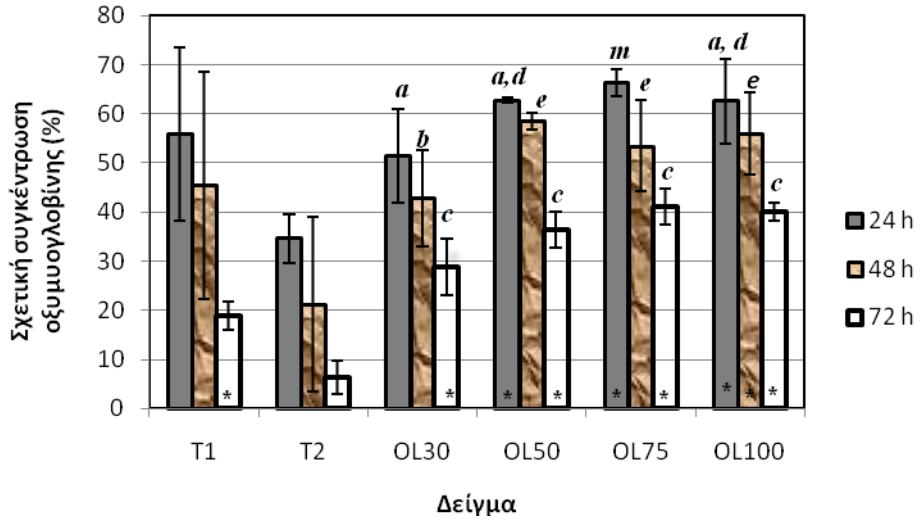
8.4. Εφαρμογή του εκχυλίσματος φαινολών ως πρόσθετου σε ρόφημα

Στον **Πίνακα 8.4** φαίνεται το φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητα του ροφήματος φαινολών από τα απόβλητα ελαιουργείου, σε σύγκριση με άλλα παραδοσιακά ροφήματα. Το ρόφημα φαινολών περιείχε 280 mg/L ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm). Αυτή η περιεκτικότητα προέκυψε μετά από συμπύκνωση (5 φορές) του εκχυλίσματος φαινολών και κατόπιν αραίωση αυτού με νερού έτσι ώστε να προκύψει ένα ελαφρύ ποτό μέχρι 1,7 mL EtOH/100 mL. Η επιλογή του βαθμού συμπύκνωσης του εκχυλίσματος έγινε με γνώμονα την παραγωγή ενός ελαφρού ποτού, συνολικού όγκου 100 mL. Αυτό σημαίνει ότι η κατανάλωση 100 mL του ροφήματος αντιστοιχεί σε κατανάλωση 28 mg φαινολών του ελαιοκάρπου. Η τιμή αυτή είναι αρκετά υψηλή, αν αναλογιστούμε ότι 50-100 g ελαιολάδου περιέχουν περίπου 10 mg φαινολών (Boskou, 2006).

Το ρόφημα φαινολών περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) σε σχέση με το ρόφημα δίκταμου και μαλοτήρας, και χαμηλότερη εν συγκρίσει με το πράσινο τσάι και το φασκόμηλο. Αντίθετα, η συγκέντρωση ολικών φαινολών του ροφήματος (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) ήταν μεγαλύτερη μόνο έναντι της μαλοτήρας και μικρότερη από το δίκταμο, το φασκόμηλο και το πράσινο τσάι. Από την άλλη, οι *ο*-διφαινόλες του ροφήματος ήταν πολύ λιγότερες (από 2 έως 5 φορές) σε σχέση με τα παραπάνω ροφήματα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο για τα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος, όσο και για τις φλαβονόλες. Παρά τις μικρότερες συγκεντρώσεις φαινολών, το ρόφημα είχε μεγαλύτερη (από 3 έως 6 φορές) ΑΔ από τις αντίστοιχες του δίκταμου και της μαλοτήρα και λίγο μικρότερη (σε σύγκριση με τις διαφορές στο φαινολικό περιεχόμενο) ΑΔ από το φασκόμηλο και το πράσινο τσάι. Αντίθετα, τα ισοδύναμα $FeSO_4$ του ροφήματος φαινολών ήταν πολύ μικρότερα συγκρινόμενα με αυτό του φασκόμηλου και και του πράσινου τσαγιού. Εν πάσει περιπτώσει όμως τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παρά τη χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολών του ροφήματος έναντι εδραιωμένων προϊόντων (π.χ. του πράσινου τσαγιού), έχει ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητα (συγκεκριμένα ΑΔ) και θα μπορούσε να θεωρηθεί εν δυνάμει αντιοξειδωτικό.

8.5. Εφαρμογή του εκχυλίσματος φαινολών ως αντιοξειδωτικό σε μοντέλο κρέατος

Το εκχύλισμα έδειξε αντι-ριζική και αναγωγική ικανότητα που αυξήθηκε (από 100 στα 530 και από 105 στα 320 μM trolox για τις δοκιμές ABTS και FRAP, αντίστοιχα) συναρτήσει της συγκέντρωσης των φαινολών από 30 στα 100 mg/L, αντίστοιχα. Επιπλέον, στα 100 mg/L φαινολών η αντι-ριζική ικανότητα αυξήθηκε περίπου 2,5 φορές σε σύγκριση με αυτή στα 75 mg/L, αλλά η αναγωγική ικανότητα, αντίστοιχα, δεν αυξήθηκε καθόλου. Μια υπόθεση είναι ότι σε αυτήν τη συγκέντρωση φαινολών, οι δραστικότητες πιάνουν την τιμή κατωφλίου τους (threshold value). Σε σχέση με την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπών, το εκχύλισμα φαινολών ήταν δραστικό για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50 mg/L και η δραστικότητα ήταν μέγιστη για συγκεντρώσεις των 75-100 mg/L. Τέλος, σε σχέση με το χρώμα του κρέατος, το εκχύλισμα φαινολών μπόρεσε να αυξήσει τα επίπεδα της οξυμυογλοβίνης (κόκκινο χρώμα) μέσα σε 3 μέρες για συγκεντρώσεις ανάμεσα στα 50 και 100 mg/L (**Σχήμα 8.4**). Αναλυτικά, τα αποτελέσματα της εφαρμογής καταγράφονται σε διεργαστηριακή μελέτη που βρίσκεται υπό δημοσιεύση (Barbier, Tornberg & Galanakis, υπό ανασκόπηση).



Σχήμα 8.4: Εξέλιξη της σχετικής συγκέντρωσης οξυμυογλοβίνης (%) συναρτήσει διαφορετικών δειγμάτων (που προστέθηκαν στο μοντέλο προϊόντος κρέατος) και χρόνου διάμεσου. "T1" και "T2": δείγμα ελέγχου με ή χωρίς προ-οξειδωτικό, αντίστοιχα. "OL": εκχύλισμα φαινολών. Οι αριθμοί μετά το σύμβολο OL αντιστοιχούν σε συγκεντρώση (mg/L). [a-e] Οι μπάρες με το ίδιο λατινικό γράμμα (τουλάχιστον ένα) δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($P \leq 0,05$). Οι μπάρες με ένα αστέρι είναι στατιστικά διαφορετικές από το δείγμα ελέγχου T2 στον ίδιο χρόνο αποθήκευσης (Barbier, 2009).

Πίνακας 8.4. Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων ροφημάτων και ποτών.

Ρόφημα	Φαινολικό περιεχόμενο*					Αντιοξειδωτική Ικανότητα*	
	Ολικές (725 nm)	*o*-διφαινόλες (517 nm)	Ολικές (280 nm)	Υδροξυκινναμικά οξέα [a] (320 nm)	Φλαβονόλες (360 nm)	ΑΔ	Ισοδύναμα $FeSO_4$
	mg/L					mg DPPH/g	mmol/L
Πράσινο τσάι	$489 \pm 39^{\alpha}$	$201 \pm 10^{\alpha}$	$363 \pm 57^{\alpha}$	$50 \pm 11^{\alpha}$	$49 \pm 12^{\alpha, \beta}$	$2,9 \pm 0,3^{\alpha}$	$6,8 \pm 0,4^{\alpha}$
Δίκταμος	$146 \pm 10^{\beta}$	$126 \pm 20^{\beta}$	$133 \pm 7^{\beta}$	$65 \pm 3^{\alpha}$	$54 \pm 4^{\alpha}$	$0,7 \pm 0,1^{\beta}$	$2,1 \pm 0,2^{\beta}$
Φασκόμηλο	$302 \pm 17^{\gamma}$	$269 \pm 30^{\gamma}$	$316 \pm 34^{\alpha}$	$116 \pm 11^{\beta}$	$90 \pm 9^{\gamma}$	$1,9 \pm 0,1^{\gamma}$	$5,3 \pm 0,3^{\gamma}$
Μαλοτήρα	$92 \pm 19^{\delta}$	$119 \pm 28^{\beta}$	$104 \pm 19^{\gamma}$	$60 \pm 12^{\alpha}$	$39 \pm 7^{\beta}$	$0,2 \pm 0,1^{\delta}$	$1,1 \pm 0,1^{\delta}$
Ρόφημα φαινολών	$280 \pm 18^{\gamma}$	$57 \pm 5^{\delta}$	$112 \pm 11^{\gamma}$	$19 \pm 2^{\gamma}$	$18 \pm 2^{\delta}$	$1,7 \pm 0,1^{\gamma}$	$1,6 \pm 0,2^{\varepsilon}$

* Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση ($n = 3$).

[α-i] Οι τιμές με το ίδιο ελληνικό γράμμα για εκθέτη (τουλάχιστον ένα) μέσα σε κάθε στήλη δεν είναι στατιστικά διαφορετικές ($P \leq 0,05$).

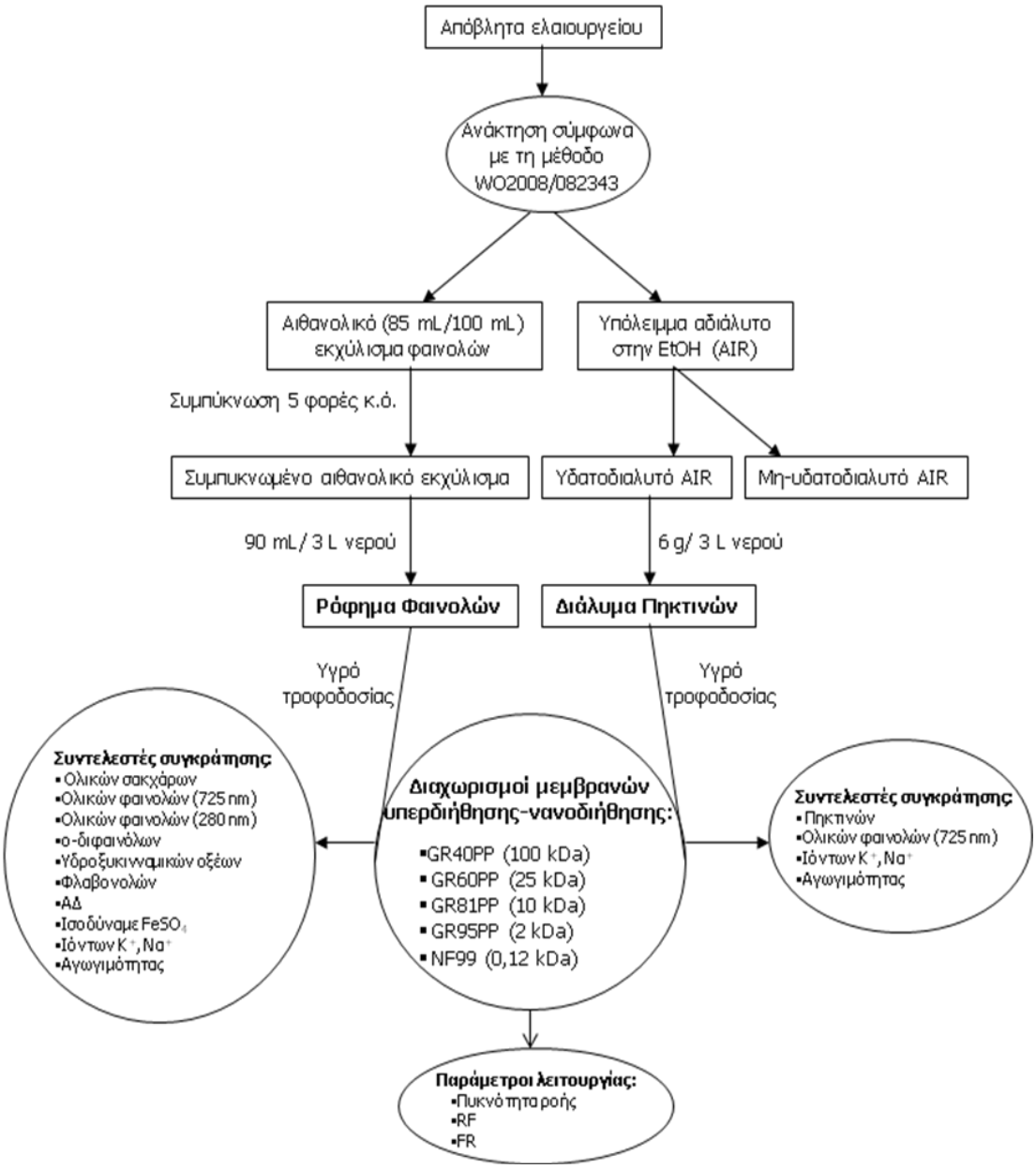
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

9.1. Περιγραφή μελέτης

Στα προηγούμενα Κεφάλαια μελετήθηκε η ανάκτηση ινών (6°) και φαινολών (7°) από τα απόβλητα ελαιουργείων σε δύο διαφορετικά προϊόντα: (α) το AIR που είναι πλούσιο σε ίνες και (β) το αιθανολικό (85 mL EtOH/100 mL) εκχύλισμα που είναι πλούσιο σε φαινόλες. Επιπλέον, στο 8° Κεφάλαιο προτάθηκαν συγκεκριμένες εφαρμογές των προϊόντων, π.χ. το αιθανολικό εκχύλισμα ως πρόσθετου σε ελαφρά ποτά ή προϊόντα κρέατος και το υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR (WSAIR) ως υποκατάστατο λίπους σε κεφτέδες. Παρά τις ελπιδοφόρες εφαρμογές, τα παραπάνω ακατέργαστα υλικά θα πρέπει να καθαριστούν πριν τη χρησιμοποίησή τους ώστε να βελτιωθούν οι λειτουργικές τους ιδιότητες και η γεύση αυτών. Για παράδειγμα, το κλάσμα WSAIR περιέχει μόνο 5,3 g πηκτινών/100 g, ενώ η περιεκτικότητα τέφρας και ιόντων K^+ είναι εννέα (46,2 g/100 g) και δύο φορές (10.4 g/100 g) μεγαλύτερη, αντίστοιχα. Ο εμπλουτισμός με ίνες σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος ήταν αποτελεσματικός όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση του ~1 g/100 g. Αυτό σημαίνει ότι η αντίστοιχη συγκέντρωση τέφρας στο τελικό προϊόν θα μπορούσε να είναι τεράστια (π.χ. >5 g/100 g) και συνακόλουθα η βρώση αυτού αδύνατη. Η τεχνολογία μεμβρανών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του WSAIR διαχωρίζοντας τις πηκτίνες από τα ιόντα. Ομοίως, οι μεμβράνες θα μπορούσαν να συμπυκνώσουν τις φαινόλες του ροφήματος, να διαφοροποιήσουν το αντιοξειδωτικό προφίλ αυτού ή να το καθαρίσουν από άλλα συστατικά μικρού ΜΒ, όπως ιόντα και ελεύθερα σάκχαρα.

Επομένως, το αντικείμενο της μελέτης του τρέχοντος Κεφαλαίου είναι η διερεύνηση του καθαρισμού και της ανάκτησης συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από το διάλυμα πηκτινών και το ρόφημα φαινολών. Για το σκοπό αυτό, τα δύο υγρά χρησιμοποιήθηκαν ως τροφοδοσία σε πειράματα μεμβρανών υπερδιήθησης και νανοδιήθησης υπό σταθερές συνθήκες, π.χ. θερμοκρασία, ταχύτητα ανακύκλωσης ροής. Διάφορες παράμετροι όπως η πυκνότητα ροής και οι συντελεστές απόρριψης των συστατικών ελέχθησαν για κάθε συνδυασμό υγρού-μεμβράνης (**Σχήμα 9.1**).



Σχήμα 9.1. Διάγραμμα πειραμάτων μελέτης διαχωρισμού των συστατικών των προϊόντων ανάκτησης από τα απόβλητα ελαιουργείου.

9.2. Χαρακτηριστικά των υγρών τροφοδοσίας

Τα χαρακτηριστικά των υγρών τροφοδοσίας που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαχωρισμού, φαίνονται στον **Πίνακα 9.1**. Το διάλυμα πηκτινών ήταν ασθενώς όξινο (pH=6,3) με σχετικά υψηλή αγωγιμότητα (784 μS/cm). Αυτή η υψηλή τιμή οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις κατιόντων όπως K^+ και Na^+. Οι συγκεντρώσεις πηκτινών και φαινολών κυμάνθηκαν μεταξύ των προαναφερθέντων συγκεντρώσεων κατιόντων. Από την άλλη, το ρόφημα φαινολών ήταν ένα όξινο (pH=4,9) ελαφρύ ποτό (1,6 mL EtOH/100 mL) με χαμηλότερες συγκεντρώσεις K^+ και Na^+ σε σύγκριση με το διάλυμα πηκτινών. Αυτές οι συγκεντρώσεις κατιόντων συνέβαλαν στη χαμηλή τιμή της αγωγιμότητας (507 μS/cm). Επιπλέον, το ρόφημα ήταν πλούσιο σε ολικά σάκχαρα και φαινόλες. Διάφορες κατηγορίες φαινολών όπως οι *o*-διφαινόλες, τα υδροξυκινναμικά οξέα και οι φλαβονόλες προσδιορίσθηκαν. Οι περιεχόμενες φαινόλες συνέβαλαν στη δημιουργία ενός ροφήματος με αντιοξειδωτική ικανότητα, π.χ. η ΑΔ ήταν ίση με 1,7 mg DPPH/g και η αντίστοιχη αναγωγική ικανότητα των τρισθενών ιόντων σιδήρου ίση με 1,6 mmol $FeSO_4$/L).

Πίνακας 9.1. Χαρακτηριστικά των υγρών τροφοδοσίας. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (*n* = 3).

Παράμετρος	Μονάδα	Υγρό τροφοδοσίας	
		Διάλυμα Πηκτινών	Ρόφημα Φαινολών
pH	—	6,3 ± 0,1	4,9 ± 0,1
Αγωγιμότητα	μS/cm	784 ± 17	507 ± 26
K^+	mg/L	262 ± 6	96 ± 5
Na^+	mg/L	42 ± 1	26 ± 2
Αιθανόλη	mL/100 mL	δ.π.[b]	1,6 ± 0,1
Ολικά σάκχαρα	mg/L	δ.π.[b]	384 ± 25
Πηκτίνη	mg GalA[a]/L	87 ± 7	δ.π.[b]
Ολικές φαινόλες (στα 725 nm)	mg/L	68 ± 2	280 ± 18
Ολικές φαινόλες (στα 280 nm)	mg/L	δ.π.[b]	112 ± 11
o-διφαινόλες	mg/L	δ.π.[b]	57 ± 5
Υδροξυκινναμικά οξέα	mg/L	δ.π.[b]	19 ± 2
Φλαβονόλες	mg/L	δ.π.[b]	18 ± 2
Αντιοξειδωτική ικανότητα			
Αντιριζική δραστικότητα	mg DPPH[c]/g	δ.π.[b]	1,7 ± 0.1
Αναγωγική ικανότητα	mmol $FeSO_4$/L	δ.π.[b]	1,6 ± 0.2

[a] "GalA" για "γαλακτουρονικό οξύ"
[b] "δ.π." για "δεν προσδιορίσθηκαν".
[c] "DPPH" για "2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο".

9.3. Παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας των μεμβρανών

Στον **Πίνακα 9.2** φαίνονται οι παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας με διαφορετικές μεμβράνες σε σχέση με την πυκνότητα ροής των διηθημάτων των δύο υγρών τροφοδοσίας. Η πυκνότητα ροής του καθαρού νερού (πριν τα πειράματα διαχωρισμού) ήταν στατιστικά μη διαφορετική για τις μεμβράνες GR40PP, GR60PP και NF99 και περισσότερο από 7 φορές μικρότερη για τις μεμβράνες GR81PP και GR95PP. Η πυκνότητα ροής του διαλύματος πηκτινών ήταν σχετικά χαμηλή (4-15 $L/h \cdot m^2$) για όλες τις μεμβράνες υπερδιήθησης και υψηλότερη (56 $L/h \cdot m^2$) για τη μεμβράνη νανοδιήθησης. Η RF του διαλύματος πηκτινών ήταν πολύ χαμηλή και μη σημαντικά διαφορετική για τις μεμβράνες με MWCO πάνω από 25 kDa (16 και 13% για τις GR40PP και GR60PP, αντίστοιχα) και υψηλότερη για αυτές που έχουν MWCO κάτω από 10 kDa (44, 31 και 57% για τις GR81PP, GR95PP και NF99, αντίστοιχα). Επιπροσθέτως, η πυκνότητα ροής του καθαρού νερού μειώθηκε μετά τα πειράματα διαχωρισμού του διαλύματος πηκτινών για όλες τις υπό εξέταση μεμβράνες (44, 46, 7, 8 και 82 $L/h \cdot m^2$ για τις GR40PP, GR60PP, GR81PP, GR95PP και NF99, αντίστοιχα). Επιπλέον, η τιμή της FR κυμάνθηκε από 47 σε 58% για όλες τις μεμβράνες υπερδιήθησης (χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές) και ήταν ίση με 83% για την NF99.

Αντίθετα, η πυκνότητα ροής του ροφήματος φαινολών ήταν σχετικά υψηλή για τις μεμβράνες GR40PP, GR60PP και NF99 και πολύ χαμηλή για τις GR81PP και GR95PP. Συνακόλουθα, η RF του ροφήματος φαινολών ήταν πολύ υψηλή για τις μεμβράνες με MWCO άνω των 25 kDa (80 και 78% για τις GR40PP και GR60PP, αντίστοιχα), μέτρια (48%) για την NF99 και χαμηλή για τις μεμβράνες με MWCO των 10 και 2 kDa (27 και 17% για τις GR81PP και GR95PP, αντίστοιχα). Μετά τα πειράματα διαχωρισμού του ροφήματος φαινολών, η πυκνότητα ροής του καθαρού νερού μειώθηκε για όλες τις μεμβράνες. Οι ροές επηρέασαν τις τιμές της FR που κυμάνθηκαν από 48 σε 66% για τις μεμβράνες υπερδιήθησης και 82% για την NF99.

Πίνακας 9.2. Παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας των πειραμάτων καθαρισμού των δύο υγρών τροφοδοσίας με διαφορετικές μεμβράνες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3).

Τύπος μεμβράνης	Νερό	Διάλυμα πηκτινών				Ρόφημα φαινολών			
	J_{w0}[a] (L/h·m^2)	J_v[b] (L/h·m^2)	J_{wf}[c] (L/h·m^2)	RF[d] (%)	FR[e] (%)	J_v[b] (L/h·m^2)	J_{wf}[c] (L/h·m^2)	RF[d] (%)	FR[e] (%)
GR40PP	95 ± 5[f]	15 ± 2[f]	44 ± 2[f]	16 ± 1[f]	47 ± 4[f]	76 ± 7[f]	63 ± 4[f]	80 ± 4[f]	66 ± 2[f]
GR60PP	95 ± 7[f]	12 ± 3[f]	46 ± 4[f]	13 ± 3[f]	48 ± 7[f]	74 ± 1[f]	61 ± 3[f]	78 ± 6[f]	64 ± 5[f]
GR81PP	11 ± 1[g]	5 ± 1[g]	7 ± 1[g]	44 ± 10[g]	58 ± 4[f]	3 ± 1[g]	6 ± 1[g]	27 ± 3	48 ± 9
GR95PP	14 ± 2[g]	4 ± 1[g]	8 ± 1[g]	31 ± 11[g]	56 ± 9[f]	2 ± 1[g]	9 ± 1[g]	17 ± 1	63 ± 5[f]
NF99	99 ± 3[f]	56 ± 1	82 ± 2	57 ± 2	83 ± 1	47 ± 2	81 ± 4	48 ± 1	82 ± 2

[a] "J_{w0}" για την "πυκνότητα ροής καθαρού νερού πριν τα πειράματα καθαρισμού των υγρών τροφοδοσίας". [b] "J_v" για την "πυκνότητα ροής του υγρού τροφοδοσίας σε σταθερή κατάσταση". [c] "J_{wf}" για την "πυκνότητα ροής νερού μετά τα πειράματα καθαρισμού των υγρών τροφοδοσίας". [d] "RF" για τη "σχετική πυκνότητα ροής" των υγρών τροφοδοσίας. [e] "FR" για την "ανάκτηση ροής". [f-g] Οι τιμές που έχουν το ίδιο γράμμα για δείκτη σε κάθε στήλη είναι στατιστικά μη διαφορετικές ($P \leq 0{,}05$).

Πίνακας 9.3. Συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του διαλύματος πηκτινών συναρτήσει διαφορετικών μεμβρανών. Συντελεστής απόρριψης = $100\cdot(A_{feed}-A_{perm})/A_{feed}$, όπου A_{feed} και A_{perm} είναι οι τιμές κάθε παράμετρου της τροφοδοσίας και του διηθήματος, αντίστοιχα.

Τύπος μεμβράνης	Συντελεστής απόρριψης (%)[a]				
	Πηκτίνες	Ολικές φαινόλες[b]	K^+	Na^+	Αγωγιμότητα
GR40PP	79 ± 3	13 ± 3	2 ± 1	2 ± 1	5 ± 2
GR60PP	98 ± 2*	40 ± 4	10 ± 2	14 ± 2	12 ± 3
GR81PP	98 ± 2*	71 ± 3	49 ± 2*	56 ± 3*	58 ± 4*
GR95PP	99 ± 1*	81 ± 4	55 ± 4*	60 ± 4*	61 ± 2*
NF99	99 ± 1*	99 ± 1	96 ± 2	91 ± 3	93 ± 3

[a] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3). Οι τιμές με αστέρι (*) για δείκτη μέσα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά μη διαφορετικές μεταξύ τους ($P \leq 0{,}05$). [b] Ολικές φαινόλες όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteau.

9.4. Καθαρισμός του διαλύματος πηκτινών

Οι συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του διαλύματος πηκτινών από τις διαφορετικές μεμβράνες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9.3**. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκρατήσεις πηκτινών ήταν σχεδόν πλήρεις (98-99%) για όλες τις υπό εξέταση μεμβράνες με MWCO κάτω από 25 kDa (GR60PP, GR81PP, GR95PP και NF99) και οι τιμές ήταν στατιστικά μη διαφορετικές. Εξάλλου, η συγκράτηση πηκτινών ήταν επίσης πολύ υψηλή (79%) για τη μεμβράνη (GR40PP) με το μεγαλύτερο MWCO (100kDa). Από την άλλη, η συγκράτηση άλλων συστατικών όπως οι ολικές φαινόλες, το K^+, το Na^+ και η μείωση της αγωγιμότητας ήταν πρακτικώς ποσοτική μόνο για τη μεμβράνη νανοδιήθησης (NF99) και σχετικά αμελητέα για την μεμβράνη GR40PP. Οι αντίστοιχες συγκρατήσεις που παρατηρήθηκαν για τις τρεις μεμβράνες με MWCO μεταξύ 2 και 25 kDa (GR60PP, GR81PP και GR95PP) έδειξαν διαφορετική συμπεριφορά ανάμεσα στα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η ανάκτηση ιόντων όπως εκφράστηκε με τους συντελεστές απόρριψης K^+, Na^+ και αγωγιμότητας ήταν πολύ μικρή για τη μεμβράνη GR60PP (MWCO=25 kDa), ενώ η ανάκτηση ολικών φαινολών ήταν αρκετά υψηλότερη (40%). Οι συντελεστές απόρριψης ολικών φαινολών ήταν πολύ υψηλοί (71 και 81%) για τις μεμβράνες με MWCO των 10 kDa (GR81PP) και 2 kDa (GR95PP), αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες συγκρατήσεις K^+, Na^+ και αγωγιμότητας ήταν λίγο μικρότερες, ενώ οι τιμές για κάθε παράμετρο δεν ήταν στατιστικά διαφορετικές.

9.5. Καθαρισμός του ροφήματος φαινολών

Οι συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του ροφήματος φαινολών, από τις υπό εξέταση μεμβράνες, φαίνονται στον **Πίνακα 9.4**. Πιο συγκεκριμένα, όλοι οι συντελεστές απόρριψης ήταν αμελητέοι (<1) για τη μεμβράνη GR40PP (MWCO=100 kDa) εκτός από την ανάκτηση φλαβονολών που ήταν λίγο υψηλότερη (10%). Οι συντελεστές των υπόλοιπων μεμβρανών παρουσίασαν διάφορα εύρη τιμών για διαφορετικούς παραμέτρους. Για παράδειγμα, οι συγκρατήσεις K^+ και Na^+ κυμάνθηκαν από 17 έως 28%, για τις υπό εξέταση μεμβράνες με MWCO από 2 έως 25 kDa (GR60PP, GR81PP και GR95PP), ενώ οι τιμές που παρατηρήθηκαν για κάθε συστατικό ήταν στατιστικά με διαφορετικές. Ωστόσο, οι αντίστοιχες συγκρατήσεις για τη μεμβράνη NF99 ήταν σημαντικά υψηλότερες. Οι συντελεστές αγωγιμότητας παρουσίασαν υψηλότερες τιμές για τις μεμβράνες με MWCO<10 kDa (GR81PP, GR95PP και NF99, αντίστοιχα) και παρόμοια τιμή για την GR40PP (MWCO=100 kDa) σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν για το K^+ και το Na^+. Οι συγκρατήσεις των ολικών σακχάρων ήταν σχετικά χαμηλές για τις μεμβράνες με MWCO μεταξύ των 2 και 25 kDa (GR60PP, GR81PP και GR95PP, αντίστοιχα), αλλά σχεδόν ποσοτική για την NF99.

Πίνακας 9.4. Συντελεστές απόρριψης διαφόρων παραμέτρων του ροφήματος φαινολών όπως προέκυψαν κατόπιν επεξεργασίας με διάφορες μεμβράνες. Συντελεστής απόρριψης = $100 \cdot (A_{feed}-A_{perm})/A_{feed}$, όπου A_{feed} και A_{perm} είναι οι τιμές κάθε παράμετρου της τροφοδοσίας και του διηθήματος, αντίστοιχα.

Τύπος μεμβράνης	Συντελεστής απόρριψης (%)[a]										
	K^+	Na^+	Αγωγιμότητα	Ολικά σάκχαρα	Ολικές φαινόλες[b]	Ολικές φαινόλες[c]	*o*-διφαινόλες	Υδροξυκ. οξέα[d]	Φλαβονόλες	ΑΔ	Ισοδύναμα $FeSO_4$
GR40PP	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	10 ± 2	<1	<1
GR60PP	26 ± 4*	19 ± 3*	21 ± 3	18 ± 3	10 ± 3	19 ± 3	6 ± 3	32 ± 3	37 ± 4	8 ± 2	4 ± 2
GR81PP	23 ± 4*	17 ± 4*	36 ± 3*	32 ± 4*	21 ± 3*	33 ± 3	32 ± 4*	44 ± 3	56 ± 4*	24 ± 3	15 ± 3*
GR95PP	28 ± 5*	20 ± 4*	40 ± 4*	38 ± 5*	25 ± 5*	42 ± 2	48 ± 4*	53 ± 3	62 ± 5*	36 ± 4	24 ± 5*
NF99	55 ± 4	45 ± 5	73 ± 2	98 ± 1	70 ± 3	91 ± 4	85 ± 5	99 ± 1	99 ± 1	63 ± 5	75 ± 5

[a] Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο ± τυπική απόκλιση (n = 3). Οι τιμές που έχουν για εκθέτη ένα αστέρι (*) μέσα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά μη διαφορετικές μεταξύ τους ($P \leq 0.05$).

[b] Όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm.

[c] Όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm.

[d] "Υδροξυκ. οξέα" για "παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων".

Οι συγκρατήσεις ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 και 280 nm) παρουσίασαν περίπου την ίδια τάση με αυτή των ολικών σακχάρων: χαμηλές τιμές για τις μεμβράνες GR60PP, GR81PP και GR95PP, αντίστοιχα, και πολύ υψηλές για τη μεμβράνη NF99. Οι συντελεστές απόρριψης διαφόρων κατηγοριών φαινολών έδειξαν την ίδια τάση με τους αντίστοιχους συντελεστές ολικών φαινολών, αλλά οι τιμές ήταν λίγο υψηλότερες. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκρατήσεις των *o*-διφαινολών, των παράγωγων των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών ήταν ίσες με 6, 32 και 37%, αντίστοιχα, για τη μεμβράνη GR60PP, σημαντικά υψηλότερες για τις μεμβράνες με MWCO μεταξύ 2 και 10 kDa και σχετικά ποσοτικές για τη μεμβράνη νανοδιήθησης. Από την άλλη, οι τιμές συγκρατήσεων των ΑΔ και των ισοδύναμων $FeSO_4$ ήταν σχετικά χαμηλές για τις μεμβράνες με MWCO μεταξύ 2 και 25 kDa και σημαντικά υψηλότερες αλλά όχι ποσοτικές για τη μεμβράνη NF99.

9.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στα πειράματα διαχωρισμού του διαλύματος πηκτινών, οι δύο μεμβράνες με το υψηλότερο MWCO (100 και 25 kDa, αντίστοιχα) έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα για το διαχωρισμό των πηκτινών από τα ιόντα και την ανάκτησή τους από το συμπύκνωμα και το διήθημα, αντίστοιχα. Η μεμβράνη GR40PP μπόρεσε να απομακρύνει ποσοτικά τις φαινόλες στο διήθημα (η συγκράτηση ήταν μόνο 13%) σε αντίθεση με την GR60PP που συγκράτησε 40% αυτών. Έτσι, μια μεμβράνη με MWCO ανάμεσα στα 100 και 25 kDa θα μπορούσε υποθετικά να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των περιεχόμενων πηκτινών ταυτόχρονα από τα ιόντα και τις φαινόλες. Το μειονέκτημα της εφαρμογής των δύο παραπάνω μεμβρανών είναι η χαμηλή πυκνότητα ροής και RF (12-15 $L/h \cdot m^2$ και 13-16%, αντίστοιχα), καθώς επίσης η περιορισμένη FR (47-48%). Για αυτό το λόγο, θα μπορούσε να εφαρμοστεί υψηλότερη πίεσης εκατέρωθεν της μεμβράνης (TMP) και για τις δύο μεμβράνες ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης. Παρόλα αυτά, αυτή η παράμετρος θα επηρέαζε αρνητικά την ανάκτηση πηκτινών ειδικά στην περίπτωση της GR40P που δεν έχει τόσο υψηλό ποσοστό απόρριψης (79%).

Αντίθετα, ο διαχωρισμός πηκτινών-ιόντων με την εφαρμογή των άλλων μεμβρανών υπερδιήθησης (GR81PP και GR95PP) δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός, καθώς η συγκράτηση των ιόντων ήταν επίσης σχετικά υψηλή (49-60%). Οι αντίστοιχες τιμές απόρριψης των φαινολών ήταν ακόμα μεγαλύτερες (71-81%). Αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο αναμενόμενα, καθώς οι πόροι των μεμβρανών (MWCO των 10 και 2 kDa, αντίστοιχα) ήταν πολύ μεγάλοι για το μέγεθος των μικρών φαινολικών ενώσεων και των ιόντων. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι μερικές από τις φαινόλες των αποβλήτων είναι ενωμένες στις ίνες-πηκτίνες (Galanakis et al., 2010a) και έτσι συγκρατούνται μαζί με αυτές στο συμπύκνωμα. Εξάλλου, η συγκράτηση μακρομοριακών συστατικών ζελοποίησης δημιουργεί μία δεύτερη δυναμική μεμβράνη που αυξάνει τη συγκράτηση των διαλελυμένων σωματιδίων μικρού MB, όπως είναι τα ιόντα (Mulder, 1996).

Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από την πολύ χαμηλή πυκνότητα ροής (4-5 L/h·m^2) και την περιορισμένη FR (56-58%) και για τις δύο μεμβράνες, παρά τη σχετικά υψηλή εφαρμοζόμενη TMP (5 και 8 bar για τις GR81PP και GR95PP, αντίστοιχα). Η διεργασία νανοδιήθησης έδειξε πολύ υψηλότερη πυκνότητα ροής (56 L/h·m^2) και FR (83%) εξαιτίας της υψηλότερης TMP (12 bar), αλλά ο διαχωρισμός ήταν σχεδόν αδύνατος καθώς η συγκράτηση των συστατικών ήταν ποσοτική (91-99%) για όλες τις υπό εξέταση δείκτες. Οι υψηλές τιμές απόρριψης (ακόμα και για τα μονοκατιόντα) μπορεί να οφείλονται στην πόλωση συγκέντρωσης των συγκρατούμενων ειδών (μακρομοριακών ή μικρομοριακών) στους πόρους της μεμβράνης νανοδιήθησης. Έτσι, όλες οι μεμβράνες με MWCO <10 kDa δεν συστήνονται για το διαχωρισμό του διαλύματος πηκτινών.

Ο διαχωρισμός των συστατικών του ροφήματος φαινολών αποδείχτηκε πιο δύσκολος σε σχέση με το διάλυμα πηκτινών. Η ύπαρξη μικρότερων ενώσεων (π.χ. σάκχαρα) και η απουσία μακρομορίων πηκτινών περιπλέξανε το διαχωρισμό, καθώς τα διάφορα διαλυμένα συστατικά έχουν μικρό MB της ίδιας τάξης μεγέθους. Για παράδειγμα, η μεμβράνη με το υψηλότερο MWCO (GR40PP) δεν συγκράτησε κανένα συστατικό στο συμπύκνωμα, καθώς όλες οι ενώσεις (εκτός από το 10% των φλαβονολών) περάσανε ολοκληρωτικά στο διήθημα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στις μεμβράνες με MWCO των 10 και 2 kDa (GR81PP και GR95PP) ήταν ασήμαντος, καθώς οι τιμές απόρριψης κυμάνθηκαν από ~20 σε 60% για όλες τις υπό εξέταση παραμέτρους. Επιπλέον, ο διαχωρισμός σακχάρων και φαινολών ήταν σχεδόν αδύνατος καθώς οι τιμές απόρριψης των ολικών σακχάρων και φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν και με τις δύο μεθόδους) ήταν παρόμοιος για όλες τις υπό εξέταση μεμβράνες (**Πίνακας 9.4**).

Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι περιεχόμενες φαινόλες περιέχουν παρόμοιο MB με τα σάκχαρα και συνακόλουθα δεν είχαν προλάβει να πολυμεριστούν. Παρόλα αυτά, το εξεταζόμενο ρόφημα είναι ένα υδατικό διάλυμα με χαμηλή συγκέντρωση EtOH (1,6 mL/100 mL) που δεν μπορεί να συντηρήσει τις φαινόλες όπως τα προαναφερθέντα εκχυλίσματα. Η αυτοξείδωση και ο πολυμερισμός των φαινολών χαμηλού MB στα απόβλητα ελαιουργείων παράγουν πολυμερή με σκούρο χρώμα και χαρακτηριστική άσχημη οσμή (Niaounakis & Halvadakis, 2004). Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική καθώς η αυτοξείδωση πρέπει να αποφεύγεται ώστε να προκύψει ένα ρόφημα με ικανοποιητική οσμή και γεύση. Για αυτόν το σκοπό, η απομάκρυνση των «βαρύτερων» φαινολών θα μπορούσε να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ροφήματος και να επιμηκύνει το χρόνο ζωής του ως προϊόν. Τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων και οι φλαβονόλες φαίνεται ότι είναι μεγαλύτερα («βαρύτερα») μόρια σε σχέση με τις *o*-διφαινόλες, καθώς οι αντίστοιχες τιμές απόρριψης αυτών έδειξαν την ίδια τάση (φλαβονόλες > παράγωγα υδροξυκινναμικών οξέων > *o*-διφαινόλες) για όλα τα επίπεδα του MWCO.

Ο διαχωρισμός των φαινολών φαίνεται ότι είναι εφικτός με την εφαρμογή της μεμβράνης GR60PP, καθώς οι *ο*-διφαινόλες περάσανε ποσοτικά στο διήθημα (6% συγκράτηση), ενώ οι φλαβονόλες και τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων παρέμειναν μερικώς στο συμπύκνωμα (37 και 32% συγκράτηση, αντίστοιχα). Επιπροσθέτως, το διήθημα διατήρησε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροφήματος, καθώς οι συγκρατήσεις της ΑΔ και της αναγωγικής ικανότητας των ιόντων σιδήρου ήταν αμελητέα (8 και 4%, αντίστοιχα). Η τελευταία παρατήρηση ερμηνεύεται από το γεγονός ότι οι *ο*-διφαινόλες βρισκόντουσαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εν συγκρίσει με τις φλαβονόλες και τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων (**Πίνακας 9.1**) μέσα στο ρόφημα φαινολών, ενώ γενικώς έχουν καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας της δομής τους (Kiokias et al., 2008). Επιπλέον, οι παράμετροι απόδοσης της λειτουργίας αυτής της μεμβράνης ήταν ικανοποιητικές, αφού οι πυκνότητες ροής, RF και FR ήταν σχετικά υψηλές (74 $L/h \cdot m^2$, 78 και 64%, αντίστοιχα). Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι το ρόφημα θα μπορούσε υποθετικώς να συμπυκνωθεί περισσότερο από δύο φορές, καθώς δεν υπήρχαν σοβαρά προβλήματα πόλωσης συγκέντρωσης και απόφραξης των πόρων.

Εν τέλει, η νανοδιήθηση του ροφήματος φαινολών θα μπορούσε να εφαρμοστεί ώστε να συμπυκνωθούν οι διάφορες κατηγορίες φαινολών και τα σάκχαρα, με ταυτόχρονο καθαρισμό αυτών από τα μικρά κατιόντα (K^+ και Na^+). Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση σακχάρων, παραγώγων των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών ήταν ποσοτική (99%) και την ίδια στιγμή η συγκράτηση K^+ και Na^+ ήταν πολύ μικρότερη (55 και 45%, αντίστοιχα). Η πυκνότητα ροής ήταν σχετικά υψηλή (47 $L/h \cdot m^2$) εξαιτίας της εφαρμοζόμενης TMP (12 bar) και η FR ήταν επίσης ικανοποιητική (82%). Σε κάθε περίπτωση, το κύριο μειονέκτημα αυτής της εφαρμογής ήταν η απώλεια αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του ροφήματος φαινολών (οι τιμές απόρριψης της ΑΔ και των ισοδύναμων $FeSO_4$ ήταν ίσες με 63 και 75%, αντίστοιχα) εξαιτίας της χαμηλής απόρριψης των *ο*-διφαινολών (85%).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

10.1. Συμπεράσματα διατριβής

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η ανάπτυξη μιας μεθόδου για την ταυτόχρονη ανάκτηση ενός υπολείμματος πλούσιου σε εδώδιμες ίνες και ενός αιθανολικού εκχυλίσματος πλούσιου σε φαινόλες, από συμπυκνωμένα απόβλητα ελαιουργείου. Η εκχύλιση των ινών βασίστηκε στη θερμική επεξεργασία μιγμάτων των αποβλήτων με EtOH και οξέα πριν την κατακρήμνιση του αδιάλυτου υπολείμματος (AIR) με συμπυκνωμένη EtOH εν βρασμώ. Τα διαφορετικά στάδια της μεθόδου διερευνήθηκαν σε ξεχωριστά πειράματα και βελτιστοποιήθηκαν σύμφωνα με την ανάκτηση ινών και φαινολών σε δύο προϊόντα, κατόπιν διήθησης του παραπάνω μίγματος.

Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (π.χ. για το στάδιο της συμπύκνωσης) στις λειτουργικές ιδιότητες των πηκτινών των αποβλήτων ελαιουργείου (Κεφάλαιο 6). Σε αυτήν τη μελέτη αποδείχτηκε ότι η παρατεταμένη θέρμανση των αποβλήτων σε μέτρια θερμοκρασία (για 120 min στους 60 ^{o}C) ενεργοποιεί την ενδογενή ΠΜΕ και προωθεί την απομεθυλίωση, παρά την υψηλή συγκέντρωση των φαινολών. Η ενέργεια ενεργοποίησης της ΠΜΕ ήταν υψηλή (130 kJ/mol) σε σύγκριση με τους φυτικούς ιστούς άλλων υποστρωμάτων, υποδεικνύοντας πιθανή παρεμπόδιση από τις φαινόλες. Η ενεργοποίηση του ενζύμου προκάλεσε την διαλυτοποίηση πηκτινών στο υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR, πιθανώς λόγω της μερικής αποδόμησης των πηκτινών.

Εξάλλου, η διεργασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των πηκτινών με ταυτόχρονες απώλειες στις ιδιότητες ζελοποίησης. Η εναλλακτική θερμική διεργασία των 80 ^{o}C για 180 min (αντί για 180 min στους 60 ^{o}C) προκάλεσε μηδαμινή ενζυμική αποδόμηση των πηκτινών και βελτίωσε τις ιδιότητες ζελοποίησης του ανακτώμενου υλικού, καθώς η αντίδραση της *β*-αποδόμησης δεν προχώρησε σε αυτές τις συνθήκες. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση (2-3 h στους 80 ^{o}C) του σταδίου συμπύκνωσης και την ανάκτηση πηκτινών από τα απόβλητα ελαιουργείων. Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε με περιστροφική ανάδευση και παροχή αέρα που

διασπείρει το υγρό μέσα στη φιάλη και αυξάνει την ταχύτητα εξάτμισης σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Σε σχέση με την εκχύλιση, η βέλτιστη διεργασία παρατηρήθηκε με τη χρησιμοποίηση 5 mL EtOH με 1 g κιτρικού οξέος/100 mL, καθώς αυξήθηκε η ποσότητα ανάκτησης του AIR από 29,0 (όπως ανακτήθηκε μόνο με το στάδιο της κατακρήμνισης) σε 64,8 g/100 g ξηρού βάρους αποβλήτων. Η περιεκτικότητα ολικών ινών αυξήθηκε επίσης από 37 σε 51 mg/g AIR, αντίστοιχα. Η μοριακή σύνθεση των ινών περιλαμβάνει κυρίως GalA, Ara και Glc (45,1, 20,8 και 15,1 mol/100 mol, αντίστοιχα). Παρά την υψηλή συγκέντρωση ιόντων, τη χαμηλή περιεκτικότητα πηκτινών και το χαμηλό ΒΜ αυτών, το υδατοδιαλυτό κλάσμα του AIR δημιούργησε ζελέ κατόπιν μιας απλής διεργασίας απομόνωσης και συμπύκνωσης αυτού. Η ελαστικότητα του ζελέ βρέθηκε ότι εξαρτάται εκθετικά από την περιεκτικότητα GalA των συμπυκνωμάτων. Η περαιτέρω επεξεργασία του υλικού πηκτινών με κιτρικό οξύ κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης αυτού, δημιούργησε ένα πιο δυνατό-στερεό ζελέ, αλλά λιγότερο ελαστικό. Επομένως, η προσθήκη κιτρικού οξέος συνιστάται μόνο στη διεργασία της εκχύλισης και όχι κατά τη διάρκεια δημιουργίας ζελέ. Συμπερασματικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε απλοποιεί την ανάκτηση ινών από τα απόβλητα ελαιουργείων και αυξάνει την πιθανότητα χρησιμοποίησης αυτών ως πηγή για την παραγωγή μέσων ζελοποίησης.

Η ανάκτηση φαινολών στο αιθανολικό εκχύλισμα με την παραπάνω μέθοδο διερευνήθηκε σε ξεχωριστή μελέτη (Κεφάλαιο 7). Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση φαινολών με EtOH από ακατέργαστα απόβλητα ελαιουργείων βασίστηκε στη διαλυτοποίησή τους στο προκύπτον υδρο-αιθανολικό μίγμα. Ο χρόνος εκχύλισης δεν ήταν σημαντικός για τη διεργασία ανάκτησης με EtOH 85 mL/100 mL, πιθανώς εξαιτίας της κατακρήμνισης των ενωμένων φαινολών μαζί με τις ίνες. Επιπλέον, η προ-επεξεργασία με προστιθέμενη EtOH σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 20 mL/100 mL) φαίνεται ότι επηρεάζει αρνητικά την ανάκτηση φαινολών στο προκύπτον αιθανολικό μίγμα (85 mL/100 mL). Ωστόσο, η προ-επεξεργασία με EtOH στη βέλτιστη συγκέντρωση ανάκτησης ινών (5 mL/100 mL), δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση των φαινολών.

Η θέρμανση των αποβλήτων είχε επίσης αρνητική επίδραση στα ανακτώμενα εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η θέρμανση των αποβλήτων ανάμεσα στους 50 και 60 ^{o}C (για 180 min) προκάλεσε την ενεργοποίηση των ενδογενών ΠΦΟ με ταυτόχρονη μείωση των φαινολικών χαρακτηριστικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα μπορούσαν να διατηρήσουν τις περιεχόμενες φαινόλες για διάρκεια 18 εβδομάδων (στο σκοτάδι). Από την άλλη, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η θέρμανση των αποβλήτων σε ακόμα υψηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 80 ^{o}C) επιτάχυνε κάποιες μη ενζυμικές αντιδράσεις με συνακόλουθη μείωση σε κάποιες φαινολικές ομάδες των εκχυλισμάτων. Αυτές οι αντιδράσεις προκάλεσαν τη μείωση των *ο*-διφαινολών με ταυτόχρονη αύξηση των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών. Για αυτό το λόγο, η συμπύκνωση των αποβλήτων σε

βιομηχανική ή ημι-βιομηχανική κλίμακα προτείνεται να πραγματοποιηθεί υπό κενό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 ^{o}C), αφού με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται οι αρνητικές επιδράσεις στις περιεχόμενες φαινόλες και ταυτόχρονα στις λειτουργικές ιδιότητες των πηκτινών. Εν τέλει, το μέσο των 85 mL EtOH/100 mL αποδείχτηκε κατάλληλος διαλύτης για τη συντήρηση των φαινολών, καθώς οι αντίστοιχες αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων διατηρήθηκαν και σε κάποιες περιπτώσεις αυξήθηκαν κατά την αποθήκευσή τους για 18 εβδομάδες (στο σκοτάδι).

Τα προϊόντα ανάκτησης των αποβλήτων ελαιουργείων διερευνήθηκαν περαιτέρω σε διάφορες εφαρμογές της τεχνολογίας τροφίμων (Κεφάλαιο 8). Το AIR και το υδατοδιαλυτό κλάσμα αυτού (WSAIR) ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων με κάποιες αλλαγές της μεθόδου που σχετίζονται με την καταλληλότητα βρώσης αυτών (βλ. Ενότητα 5.5.1) και χρησιμοποιήθηκαν μόνα ή σε συνδυασμό με ίνες καρότου ως υποκατάστατα λίπους σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος (κεφτέδες). Τα υλικά αυτά παρείχαν διαφορετικές δομικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, το AIR που περιείχε τόσο υδατοδιαλυτές, όσο και μη υδατοδιαλυτές ίνες, δεν προκάλεσε καμία μείωση στις απώλειες νερού και στην προσρόφηση ελαίου κατά τη διάρκεια τηγανίσματος αυτών (σε φριτέζα) όπως συγκρίθηκε με το δείγμα ελέγχου. Η βελτίωση στις απώλειες νερού του προϊόντος ήταν φανερή μόνο παρουσία αδιάλυτων ινών καρότου. Εξάλλου, οι κεφτέδες που παρασκευάσθηκαν με το AIR είχαν «αμμώδη» υφή και «μεταλλική» γεύση (όπως παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά με μη-οργανωμένες οργανοληπτικές δοκιμές), πιθανώς εξαιτίας της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων λιγνίνης Klason και K^+, αντίστοιχα. Έτσι το υλικό αυτό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτήν τη μορφή ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα κρέατος.

Από την άλλη μεριά, το WSAIR περιέχει αποκλειστικά υδατοδιαλυτές ίνες, οι οποίες ήταν ικανές να μειώσουν την προσρόφηση ελαίου σε κεφτέδες χαμηλών λιπαρών. Επιπλέον, το δείγμα αυτό δεν είχε την «αμμώδη» γεύση, πιθανώς εξαιτίας της απουσίας της λιγνίνης Klason, αλλά διατήρησε το «μεταλλικό» άρωμα εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων K^+. Παρόλα αυτά, οι κεφτέδες που περιείχαν τόσο τις υδατοδιαλυτές ίνες του WSAIR, όσο και τις αδιάλυτες ίνες του καρότου συνδύαζαν και τα δύο πλεονεκτήματα (ικανότητα συγκράτησης νερού και μειωμένη προσρόφηση ελαίου), χωρίς την παρουσία των παραπάνω δυσάρεστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Εξάλλου, οι αδιάλυτες ίνες καρότου αποτελούνται κυρίως από πηκτίνες, ημικυτταρίνες και κυτταρίνη (Hsu et al., 2006) με γνωστή βρώση και γεύση. Συμπερασματικά, το WSAIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετου σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος για τη μείωση της ανεπιθύμητης προσρόφησης ελαίου.

Το αιθανολικό εκχύλισμα που ανακτήθηκε παράλληλα με τα AIR και WSAIR (βλ. Ενότητα 5.5.1) ήταν πλούσιο σε φαινόλες, με ελκυστικό κιτρινωπό χρώμα και τη φρουτώδη οσμή του ελαιόκαρπου. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετου για την παραγωγή ενός ελαφρού ποτού (1,7 mL EtOH/100 mL). Το προκύπτον ρόφημα είχε συγκρίσιμες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (αν και μικρότερες σε κάποιες περιπτώσεις)

από άλλα παραδοσιακά ροφήματα όπως το πράσινο τσάι, το φασκόμηλο και το τσάι βουνού (δίκταμο και μαλοτήρα), παρά τις πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις κάποιων φαινολικών ομάδων (π.χ. των *ο*-διφαινολών). Το αιθανολικό εκχύλισμα φαινολών χρησιμοποιήθηκε και ως αντιοξειδωτικό-πρόσθετο σε μοντέλο προϊόντος κρέατος, όπως διερευνήθηκε σε μελέτη παράλληλα με την παρούσα διδακτορική διατριβή (Barbier, 2009). Σύμφωνα με αυτήν τη μελέτη, όταν το αιθανολικό εκχύλισμα προστίθεται σε συγκεντρώσεις της τάξης των 75-100 mg/L στο μοντέλο προϊόντος κρέατος, η οξείδωση των λιπών αυτού παρεμποδίζεται και παράλληλα διατηρείται το χρώμα του. Επομένως, το αιθανολικό εκχύλισμα ενδεχομένως να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό πρόσθετο σε προϊόντα κρέατος για τη συντήρηση και την παράταση του χρόνου ζωής αυτών.

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 9, τα παραπάνω ακατέργαστα υλικά (WSAIR και ρόφημα φαινολών) θα πρέπει να καθαριστούν πριν τη χρησιμοποίησή τους ώστε να βελτιωθούν οι λειτουργικές τους ιδιότητες και η γεύση αυτών. Ο καθαρισμός και ο διαχωρισμός των συστατικών των παραπάνω προϊόντων διερευνήθηκε με τη χρήση τεχνολογίας μεμβρανών. Σύμφωνα με αυτή την μελέτη, ο διαχωρισμός των συστατικών εξαρτάται κατά βάση από τα χαρακτηριστικά κάθε υλικού τροφοδοσίας και το μοριακό κατώφλι (MWCO) των εφαρμοζόμενων μεμβρανών. Σε σχέση με το διάλυμα πηκτινών (που προέκυψε κατόπιν αραίωσης του WSAIR με νερό), οι μεμβράνες με MWCO ανάμεσα στα 25 και τα 100 kDa (GR60PP και τα GR40PP, αντίστοιχα) κατάφεραν να ανακτήσουν ποσοτικά τις πηκτίνες στο συμπύκνωμα και να αφήσουν τα «μικρότερα» διαλυμένα συστατικά όπως το K^+, το Na^+ και τις φαινόλες να περάσουν στο διήθημα. Το καθαρισμένο υλικό πηκτινών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κατόπιν συμπύκνωσής του, ως παράγοντας ζελοποίησης σε κεφτέδες χαμηλών λιπαρών.

Από την άλλη, η μεμβράνη GR60PP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του ροφήματος φαινολών. Η μεμβράνη ήταν ικανή να απομακρύνει μερικώς τα «βαρύτερα» κλάσματα των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών στο συμπύκνωμα και παράλληλα να διατηρήσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροφήματος στο διήθημα. Αυτή η διεργασία θα μπορούσε να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και το χρόνο ζωής του ροφήματος. Εν κατακλείδι, η νανοδιήθηση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με στόχο τον καθαρισμό του ροφήματος από διάφορα ιόντα (π.χ. K^+ και Na^+). Ωστόσο, η διεργασία μειώνει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροφήματος στο συμπύκνωμα, εξαιτίας των απωλειών των *ο*-διφαινολών στο διήθημα.

10.2. Πρωτοτυπίες διατριβής

Οι πρωτοτυπίες της διατριβής επεκτείνονται σε διάφορα ερευνητικά πεδία, όπως είναι η αντιμετώπιση περιβαλλοντικών προβλημάτων με ανάπτυξη εναλλακτικής αντιρυπαντικής τεχνολογίας, η επαναχρησιμοποίηση αγροβιομηχανικών αποβλήτων, η τεχνολογία τροφίμων αλλά και η βιοτεχνολογία τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα οι πρωτοτυπίες αυτές είναι:

- Η ανάπτυξη μιας απλής μεθόδου (με λίγα στάδια) για την ταυτόχρονη ανάκτηση εδώδιμων ινών και φαινολών σε δύο διαφορετικά προϊόντα, από τα απόβλητα ελαιουργείων. Η μέθοδος κατοχυρώθηκε ως πατέντα: WO2008/082343 (Tornberg & Galanakis, 2008).
- Η μελέτη των επιπτώσεων της θερμικής επεξεργασίας στις πηκτίνες των αποβλήτων ελαιουργείου. Τα στοιχεία της μελέτης συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των μεταβολών των πηκτινών του ελαιόκαρπου (Galanakis et al., 2010e).
- Η μελέτη των ιδιοτήτων ζελοποίησης του υδατοδιαλυτού κλάσματος του υπολείμματος (WSAIR) ως έχει, π.χ. χωρίς τον καθαρισμό ή εξευγενισμό αυτού (Galanakis et al., 2010a; e).
- Η εκχύλιση των εδώδιμων ινών πριν (αντί για μετά) το στάδιο της κατακρήμνισης (Galanakis et al., 2010a).
- Η απόδειξη της ενεργοποίησης της ενδογενούς ΠΜΕ, κατόπιν παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου, παρά την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων φαινολών που δρουν ως παρεμποδιστικός παράγοντας (Galanakis et al., 2010e).
- Η ένδειξη της ενεργοποίησης των ενδογενών ΠΦΟ, κατόπιν παρατεταμένης θερμικής επεξεργασίας των αποβλήτων ελαιουργείου (Galanakis et al., 2010d).
- Η απόδειξη της συντήρησης των φαινολών μέσα στο αιθανολικό (85 mL/100 mL) εκχύλισμα για τουλάχιστον 18 εβδομάδες (στο σκοτάδι) και οι ενδείξεις για διατήρηση (ακόμα και βελτίωση) των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων στο ίδιο χρονικό διάστημα (Galanakis et al., 2010b; e).
- Η εφαρμογή προϊόντων που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείου ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ποτά, π.χ. οι ανακτώμενες ίνες ως υποκατάστατο λίπους σε προϊόντα κρέατος (Galanakis et al., 2010c).
- Η απόδειξη ότι οι διαλυτές ίνες από τα απόβλητα ελαιουργείου μπορούν να μειώσουν την προσρόφηση ελαίου σε προϊόντα κρέατος κατά τη διάρκεια τηγανίσματος αυτών. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει τη συγκεκριμένη ιδιότητα ινών από οποιαδήποτε πηγή προέλευσης (Galanakis et al., 2010c).
- Η χρησιμοποίηση των μεμβρανών για το διαχωρισμό-καθαρισμό των συστατικών προστιθέμενης αξίας των προϊόντων που ανακτήθηκαν από τα απόβλητα ελαιουργείων (Galanakis et al., 2010b).

10.3. Προοπτικές έρευνας

Για τη μελλοντική επέκταση της παρούσας διατριβής προτείνονται να εξετασθούν τα ακόλουθα ερευνητικά αντικείμενα:

- Εφαρμογή της μεθόδου ανάκτησης εδώδιμων ινών και φαινολών σε πιλοτική εγκατάσταση ώστε να εκτιμηθεί το κόστος παραγωγής σε σχέση με τα ενδεχόμενα οφέλη από την πώληση των προϊόντων.

- Μοντελοποίηση της σχέσης συμπύκνωσης δειγμάτων αποβλήτων ελαιουργείου με την περιεκτικότητά τους σε φαινόλες και στερεά συστατικά.

- Προσδιορισμό των επιμέρους φαινολικών ενώσεων του αιθανολικού εκχυλίσματος και διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτών σε σχέση με τη δομή τους.

- Καθαρισμός του υδατοδιαλυτού υπολείμματος WSAIR με τεχνολογία μεμβρανών σε μεγαλύτερη κλίμακα και αναλογία συμπύκνωσης (π.χ. από 30 L σε 3 L) και κατόπιν μέτρηση των ρεολογικών-τεχνολογικών ιδιοτήτων του νέου υπολείμματος και πραγματοποίηση οργανοληπτικών (panel test) δοκιμών σε προϊόντα σύγκοπτου κρέατος, π.χ. λουκάνικα, κεφτέδες.

- Τέλος, η διερεύνηση επιπλέον εφαρμογών των ανακτημένων προϊόντων οδηγεί σε ένα ευρύ πεδίο διαφόρων ερευνών όπως π.χ. των εκχυλισμάτων φαινολών ως πρόσθετου σε πραγματικά προϊόντα κρέατος, αντιηλιακές κρέμες ή ως παράγοντα αντι-κιτρινοποίησης (anti-yellowing agent) χρωμάτων, των εδώδιμων ινών ως υπόστρωμα ανάπτυξης προβιοτικών μικροοργανισμών σε γιαούρτια ή ως πρε-βιοτικό (prebiotic), του εκχυλίσματος φαινολών κ.ά.

Βιβλιογραφία

Διεθνής Βιβλιογραφία

AACC (2001). The definition of dietary fiber, AACC Report. *Cereal Food World*, 46(3), 112-129.

Abu-Zreig & Al-Widyan (2002). Influence of olive mills solid waste on soil hydraulic properties. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 33(3-4), 505-517.

Adamczak, M., & Bednarski, W. (2008). Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose in whey-permeate after the ultrafiltration of whey. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc*, 15(6), 105-117.

Adhoum, N., & Monser, L. (2004). Decolourization and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation *Chemical Engineering and Processing*, 43(10), 1281-1287.

Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., & Manios, T. (2007). A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2671-2676.

Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., Rao, U. J. S. P. (2010). Mango peel power: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 219-224.

Akarpat, A., Turhan, S., & Ustun, N. S. (2008). Effects of Hot-water extracts from myrtle, Rosemary, Nettle and Lemon Balm leaves on lipid oxidation and color of beef patties during frozen storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(1), 117-132.

Aktas, E. S., Imre, S., & Esroy, L. (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 35(9), 2336-2340.

Al-Malah, K., Azzam, M., & Abu-Lail, N., I. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separation and Purification Technology*, 20(2-3), 225-234.

Alcaide, M. E., & Nefzaoui, A. (1996). Recycling of olive-oil by-products: Possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4),227.

Allouche, N., Fki, I., & Sayadi, S. (2004). Towards a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 267-273.

Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (1996). An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell wall of all higher plants. In J. Visser, & A. G. J. Voragen. Pectins and pectinases (pp. 47-53). Amsterdam: Elsevier Science B. V..

Alburquerque, J., A., Gonzalvez, J., Garcia, D., & Cegarra, J. (2006). Agrochemical characterization of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195.

Aleson-Carbonell, L., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J. A., & Kuri, V. (2005). Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(2), 247-255.

Alonso, J., Canet, W., & Rodriguez, T. (1997). Thermal and calcium pretreatment affects texture pectinesterase and pectic substances of frozen sweet cherries. *Journal of Food Science*, 62(3), 511-515.

Alonso J., Rodriguez, T., & Canet, W. (1995). Effect of calcium pretreatments on the texture of frozen cherries. Role of pectinesterase in the changes in the pectic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 1011-1016.

Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., & Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S151-S183.

Amro, B., Aburjai, T., & Al-Khalil, S. (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, 73(6), 456-461.

Ammary, B. Y. (2005). Treatment of olive mill wastewater using anaerobic sequencing batch reactor. *Desalination*, 177(1-3), 157-165.

Andersson, A., Andersson, K., & Tornberg, E. (2000). A comparison of fat-holding between beefburgers and emulsion sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 555-560.

Anderson, D. M. W. (1989). Evidence for the safety of gum Karaya (*Sterculia* spp) as a food additive. *Food additives and contaminants*, 6(2), 189-199.

Ang, J. F., & Miller, W. B. (1991). Multiple functions of powdered cellulose as food ingredient. *Journal of American Association of Cereal Chemistry*, 36(7), 558-564.

Anglo, P. G. (1977). Alginic acid, agar, and carrageenan contents of some Philippine marine-algae. Journal of phycology, *13*, 4-4.

Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2006). Characterization of the temperature activation of pectin methylesterase in green

beans and tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 204-211.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.

AOAC. (1990a). Official Methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Method 975.03. Metals in Plants and Pet Foods (pp. 42-43). Arlington, VA: AOAC.

AOAC. (1990b). Official Methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Method 956.01. Potassium and/or Sodium in Plants (pp. 47-48). Arlington, VA: AOAC.

Araujo, A. J., Labavitch, J. M., & Moreno A. H. (1994). Changes in the cell wall of olive fruit during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1194-1199.

Aravantinos-Zafiris, G., & Oreopoulou, V. (1992). The effect of nitric acid extraction variables on orange pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(1), 127-129.

Aravantinos-Zafiris, G., Oreopoulou, V., Tzia, C., & Thomopoulos, C. D. (1994). Fiber fraction from orange peel residues after pectin extraction. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 27(5), 468-471.

Arienzo, M., & Capasso, R., (2000). Analysis of metal cations and inorganic anions in olive oil mill waste waters by atomic absorption spectroscopy and ion chromatography. Detection of metals bound mainly to the organic polymeric fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1405-1410.

Arienzo, M., De Martino, A., Capasso, R., Di Maro, A., & Parente, A. (2003). Analysis of carbohydrates and amino acids in vegetable wastewaters by Ion Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14(1), 74-82.

Arora, A., & Camire, M. E. (1994). Performance of potato peels in muffins and cookies. *Food Research International*, 27(1), 15-22.

Artes, F., Castaner, M., & Gil M. I. (1998). Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*, 4(6), 377-389.

Arvanitoyiannis, I. S., Kassaveti, A., & Stefanatos, S. (2007). Olive oil waste treatment: A comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 187-229.

Asp, N.-G. (1996). Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chemistry*, 57(1), 9-14.

Atanassova, D., Kefalas, P., & Psillakis, E. (2005). Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environmental International*, 31(2), 275-280.

Aydemir, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87(1), 59-67.

Avula, R. Y., Nelson, H. M., & Singh, R. K. (2009). Recycling of poultry process wastewater by ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 1-8.

Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., & Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(3), 209-247.

Azbar, N., Keskin, T., & Yuruyen (2008). Enhancement of biogas production from olive mill effluent (OME) by co-digestion. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1195-1201.

Azbar, N., Tutuk, F., & Keskin, T. (2009a). Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(6), 690-698.

Azbar, N., Tutuk, F., & Keskin, T. (2009a). Effect of organic loading rate on the performance of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating olive mill effluent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(1), 99-104.

Balannec, B., Gesan-Guiziou, G., Chaufer, B., Rabiller-Baudry, M., & Daufin, G. (2002). Treatment of dairy process waters by membrane operations for water reuse and milk constituents concentration. *Desalination*, 147(1-3), 89-94.

Balice, V., & Cera, O. (1984). Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas-chromatographic method. *Grasas y Aceites*, 35(3), 178-180.

Balyan, D. K., Tyagi, S. M., Singh, D., & Tanwar, V. K. (2001). Effect of extraction parameters on the properties of fenugreek mucilage and its use in ice cream as stabilizer. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 38(2), 171-174.

Barbier, C. (2009). The behavior of some antioxidants in an *in vitro* meat model: Erasmus collaboration project (pp. 1-31). Lund University: Lund.

Barbier, C., Tornberg, E., & Galanakis, C. M. The behaviour of raw and pure natural antioxidants in an in vitro meat model. *Manuscript*.

Bartolome. L. G., & Hoff, J. E. (1972). Firming of potatoes: Biochemical effects of preheating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2), 266–70.

Bártová, V., & Bárta, J. (2009). Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9028-9034.

Basak, S., & Ramaswamy, H. S. (1996). Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. *Food Research International*, 29(7), 601-607.

Bayod, E. (2008). Microstructure and rheological properties of concentrated tomato suspensions during processing. PhD Thesis (pp. 5-16). Lund University: Lund.

Bayod, E., Willers E. P., & Tornberg, E. (2008). Rheological and structural characterization of tomato paste and its influence on the quality of ketchup. *LWT-Food Science and Technology*, 41(7), 1289-1300.

Bearden, J. (1974). Isolation of nucleolar proteins by ethanol precipitation of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 361(1), 109-113.

Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., & Villano, M. (1999). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 901-908.

Beccari, M., Carucci, G., Lanz, A. M., Majone, M., & Papini, M. P. (2000). Removal of molecular weight fractions of COD and phenolic compounds in an integrated treatment of olive oil mill effluents. *Biodegradation*, 13(6). 401-410.

Beecher, G. (1999). Phytonutrients role in metabolism: Effects on resistance to degenerative processes. *Nutrition Reviews*, 57(1), 3-6.

Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 133(10), 3248S-3254S.

Belitz, H.-D., & Grosch, W. (1999). Amino acids, peptides, proteins. In H.-D. Belitz, & W. Grosch. Food Chemistry (pp. 8-88). Belitz, H.-D., & Grosch, W. (1999). Amino acids, peptides, proteins. In H.-D. Belitz, & W. Grosch. Food Chemistry (pp. 8-88). Berlin: Springer-Verlag.

Belitz, H., -D., Grosch, W., & Schieberle, P. (1999). Fruit and Fruit Products. In H., -D., Belitz, W., Grosch, P. & Schieberle, Food Chemistry, 3rd Edition. (748-799). Berlin: Springer-Verlag.

.Beldman, G., Schols, H. A., Pitson, S. M., Searle-van Leeuwen, M. J. F. & Voragen, A. G. J. (1997). Arabinans and arabinan degrading enzymes. In R. J. Sturgeon. Advances in Macromolecular Carbohydrate Research (pp 1-64). London: JAI Press INC.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4504-4515.

Bengtsson, H. (2009). The physicochemical and sensory properties of fruit and vegetable fibre suspensions. The effect of fibre processing and its addition to low-fat sausages. PhD Thesis (pp. 1-3). Lund University: Lund.

Benitez, F. J., Beltrán-Heredia, J., Torregrosa, J., Acero, J. L. & Cervcas, V. (1997). Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Applied Microbiology Biotechnology*, 47(2), 185-188.

Benitez, F. J., Beltrán-Heredia, J., Torregrosa, J., & Acero, J. L. (1999). Treatment of olive mill wastewaters by ozonation, aerobic degradation and the combination of both treatments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 639-646.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bianchi, G., Murelli, C., & Vlahov (1992). Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*, 31(10), 3503-3506.

Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., & Margherita, P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*, 26(5), 409-416.

Boari, G., Brunetti, A., Passino, R., & Rozzi, A. (1984). Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters. *Agricultural Wastes*, 10(3), 161-175.

Borsani, R., & Ferrando, B. (1996). Ultrafiltration plant for olive vegetation waters by polymeric membrane batteries. *Desalination*, 108(1-3), 281-286.

Boskou, D. (2006). Sources of natural antioxidant phenols. In D. Boskou Eds., Natural antioxidant phenols (pp. 1-14). Kerala: Research Signpost.

Boskou, G., Salta, F. N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., & Andrikopoulos, N. K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94(4), 558-564.

Boskou, D. (2008). Phenolic compounds in olives and olive oil. In D. Boskou Eds., olive oil minor constituents and health (pp. 11-44). Boca Raton: CRC Press

Borsani, R., & Ferrando, B. (1996). Ultrafiltration plant for olive vegetation waters by polymeric membrane batteries. *Desalination*, 108(1-3), 281-286.

Braddock, R. J. (1995). By-products of citrus fruit. *Food Technology*, 49(9), 74-&.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481–1487.

Bradley, R. M., & Baruchello, L. (1980). Primary wastes in the olive oil industry. *Effluent and Water Treatment Journal*, 20(4), 176-177.

Braeken, L., Van der Bruggen, B., & Vandecasteele, C. (2004). Regeneration of brewery waste water using nanofiltration. *Water Research*, 38(13), 3075-3082.

Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535–3540.

Bressan, M., Liberatore, L., D'Alessandro, N., Tonucci, L., Belli, C., & Ranalli, G. (2004). Improved combined chemical and biological treatments of olive oil mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1288-1233.

Burkitt, D. P. (1973). Some diseases characteristic of Western civilization. *British Medical Journal*, 1(5848), 274-278.

Burkus, Z. and F. Temelli (1999). Gelation of Barley β-Glucan Concentrate. *Journal of Food Science*, 64(2) 198-201.

Burton, S. G. (1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase – A review. *Catalysis Today*, 22(3), 459-487.

Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiú, A., Dupuy de Lome, E., & Murillo, J. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biotedeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 215-225.

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Food Engineering and Physical Properties*, 68(1), 240-248.

Cameron, R. G., & Grohmann, K. (1996). Purification and characterization of a thermally tolerant pectin pectinmethylesterase from a commercial Valencia fresh frozen orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 458-462.

Canepa, P., Marignetti, N., Rognoni, U., & Calgari S. (1988). Olive mills wastewater treatment by combined membrane processes. *Water Research*, 22(12), 1491-1494.

Canepa, P., Marignetti, N., Rognini, U., & Calgari, S. (1988). Olive mills waste-water treatment by combined membrane processes. *Water Research*, 22(12), 1491-1494.

Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992a). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste-waters. *Phytochemistry*, 31(12), 4125-4128.

Capasso, R., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (1992b). A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochemical Analysis*, 3(6), 270-275.

Capasso, R., Evidente, A., & Scognamiglio, F. (2002). Recovery and characterization of the metal polymeric fraction (polymerin) from olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10). 2846-2855.

Capasso, R., Evidente, A., & Visca, C. (1994). Production of hydroxytyrosol from olive oil vegetation waters. *Agrochimica*, 38(1-2), 165-171.

Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., & Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste-waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 393-398.

Caputo, A. C., Scacchia, F., & Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23(2), 197-214.

Capasso, R., De Martino, A., & Arienzo, M. (2002). Recovery and Characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2846-2855.

Cardoso, S. M., Coimbra, M. A., & Lopez da Silva, J. A. (2003a). Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydrate Polymers*, 52(2), 125-133.

Cardoso, S. M., Coimbra, M. A., & Lopez da Silva, J. A. (2003b). Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca^{2+} networks: a rheological study. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 801-807.

Cardoso, S. M., Ferreira, J. A., Mafra, I., Silva, A. M. S., & Coimbra, M. A. (2007). Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7124-7130.

Cardoso, S. M., Mafra, I., Reis, A., Georget, D. M. R., Smith, A. C., Waldron, K. W., & Coimbra, M. A. (2008). Effect of dry-salt processing on the textural properties and cell wall polysaccharides of cv. Thasos black olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(12), 2079-2086.

Cardoso, S. M., Mafra, I., Reis, A., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 153-160.

Cardoso, S. M., Silva A. M. S., & Coimbra, M. A. (2002). Structural characterization of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydrate Research*, 337(10), 917-924.

Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.

Carrieri, C. (1978). Ultrafiltration of vegetation waters from olive oil extraction plants-preliminary experiences. *Olii Grassi Derivati*, 14, 29-31.

Caruso, D., Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., & Galli, G. (2000). Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atomspheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1182-1185.

Carvalho, L. M. J., Castro, I. M. & Silva, C. A. B. (2008). A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus* L. Merril) by micro- and ultra-filtration. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 447-454.

Carvalho, L. M. J., Silva, C. A. B., & Pierucci A. P. T. R. (1998). Clarification of pineapple juice (*Ananas comosus* L. Merril) by ultrafiltration and microfiltration: Physicochemical evaluation of clarified juices, soft drink formulation, and sensorial evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2185-2189.

Casado-Vela, J., Sellés, S., & Bru, R. (2005). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from tomato fruits (*Lycopersicon Esculentum* CV. Muchamiel). *Journal of Food Biochemistry*, 29(4), 381-401.

Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, V., Tecce, M. F., & Landriscina, C. (2002). Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn^{2+} in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology*, 133(4), 625-632.

Cassano, A., Donato, L., Conidi, C. & Drioli, E. (2008). Recovery of bioactive compounds in kiwifruit juice by ultrafiltration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), 556-562.

Cassano, A., Donato, L., & Drioli, E. (2007). Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 613-621.

Ceccon, L., Saccu, D., Procida, G., & Cardinali, S. (2001). Liquid chromatographic determination of simple phenolic compounds in wastewaters from olive oil production plants. *Journal of AOAC International*, 84(6), 6804-6811.

Chantaro, P., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2008). Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1987-1994.

Chatjipavlidis, I., Antonakou, M., Demou, D., Flouri, F., & Balis, C. (1996). Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messinia, Greece. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 183.

Chatzisymeon, E., Diamadopoulos, E. & Mantzavinos, D. (2009a). Effect of key operating parameters on the non-catalytic wet oxidation of olive mill wastewaters. *Water Science and Technology*, 59(12), 2509-2518.

Chatzisymeon, E., Xekoukoulotakis, N. P., & Mantzavinos, D. (2009b). Determination of key operating conditions for the photocatalytic treatment of olive mill wastewaters. *Catalysis Today*, 144(1-2), 143-148.

Chau, C. F., Chen, C. H., & Lee, M. H. (2004). Comparison of the characteristics, functional properties, and in vitro hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37(2), 155-160.

Chen, C. S., & Wu, M. C. (1998). Critical review: kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterases in citrus juices. *Journal of Food Science*, 63 (5), 747-750.

Chevance, F. F. V., Farmer, L. J., Desmond, E. M., Novelli, E., Troy, D. J., & Chizzolini R. (2000). Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3476-3484.

Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 561-566.

Claye, S. S., Idouraine, A., & Weber C. W. (1996). Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. *Food Chemistry*, 57(2), 305-310.

Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*, 317(1-4), 145-154.

Coimbra, M. A., Rigby, N. M., Selvendran, R. R., & Waldron, K. W. (1995a). Investigation of the occurrence of xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of olive pulp (*Olea europaea*). *Carbohydrate Polymers*, 27(4), 277-284.

Coimbra, M., A., Waldron, K. W., & (1994). Isolation and characterization of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydrate Polymers*, 27(1), 285-294.

Coimbra, M. A., Waldron, K. W., Delgadillo, I., & Selvendran, R. R. (1995b). Isolation and characterisation of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydrate Polymers*, 27(4), 285-294.

Coimbra, M. A., Waldron, K. W., Delgadillo, I., & Selvendran, R. R. (1996). Effect of processing on cell wall polysaccharides of green table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2394-2401.

Coenen, G. J. (2007). Structural characterization of native pectins. PhD Thesis (pp. 1-28). Wageningen University: Wageningen.

Collet, L. S. F. C. A., Shigeoka, D. S., Badolato, G. G., & Tadini, C. C. (2005). Short communication. A kinetic study on pectinesterase inactivation during continuous pasteurization of orange juice. *Journal of Food Engineering*, 69(1), 125-129.

Coll, M. D., Coll, L., Laencina, J., & Tomas-Barberan, F. A. (1998). Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Zetischrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A-Food Research and Technology*, 206(6), 404-407.

Colmenero, F. J. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 7(2), 41-48.

Commission Regulation (EEC) 2568 (1991). The characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Community*, L248, 1-83.

Concellón, A., Anon, M. C., & Chaves, A. R. (2004). Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chemistry*, 88(1), 17-24.

Cox, L., Celis, R., Hermosin, M. C., Becker, A., & Cornejo, J. (1997). Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agricultural Ecosystems and Environment*, 65(2), 151-161.

Cuperus, F. P., & Nijhuis, H. H. (1993). Applications of membrane technology to food-processing. *Trends in Food Science and Technology*, 4(9), 277-282.

D'Alessandro, F., Marucchini, C., Minuti, L., Zadra, C., & Tatocchi, A. (2005). Gc/MS-SIM analysis of phenolic compounds in olive oil waste waters. Italian *Journal of Food Science*, 17(1), 83-88.

Dareioti, M. A., Dokianakis, S. N., Stamatelatou, K., Zafiri, C., & Kornaros, M. (2009). Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. *Desalination*, 248(1-3). 891-906.

Davies, L. C., Novais, J. M., & Martins-Dias, S. (2004). Influence of salts and phenolic compounds on olive mill wastewater detoxification using superabsorbent polymers. *Bioresource Technology*, 95(3), 259-268.

De Leonardis, A., Macciola, V., Lembo, G., Aretini, A., & Nag, A. (2007). Studies on oxidative stabilization of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chemistry*, 100(3), 998-1004.

De Leonardis, A., Macciola, V., & Nag, A. (2009). Antioxidant activity of various phenol extracts of olive-oil mill wastewaters. *Acta Alimentaria*, 38(1), 77-86.

De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104(2), 858-867.

De Santana, M. D. S., & Gasparetto, C. A. (2009). Microstructure of dietary fiber from orange albedo: a study by microscopy and physical techniques. *Ciencia e Technologia de Alimentos*, 29(1), 124-134.

De Stefano, G., & Sciancalepore, V. (1993). Polyphenol oxidase and peroxidase in 5 olive varieties. *Industrie Alimentari*, 32(317), 731-733.

Deiana, M., Aruoma, O. I., Bianchi, M. D. P., Spencer, J. P. E., Kaur, H., Halliwell, B., Aeschbach, R., Banni, S., Dessi, M. A., & Corongiu, F. P. (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5-6), 762-769.

Delincee, H., & Radola B. J. (1970). Some size and charge properties of tomato pectin methylesterase. *Biochemical and Biophysical Acta*, 214(1), 178-189.

Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., & Temussi, F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(3), 352-359.

DellaGreca, M., Previtera, L., Temussi, F., & Zarrelli, A. (2004). Low-moelcular-weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*, 15(3), 184-188.

Diaz, J. V., Anthon, G. E., & Barret, D. M. (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effect of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5131-5136.

Díaz-Reinoso, B. Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2009). Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 587-593.

Drouiche, M., Le Mignot, V., Lounici, H., Belhocine, D., Grib, H., Pausse, A., & Mameri, N. (2004). *Desalination*, 169(1), 81-88.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Dunaif, G., & Schneeman, B. O. (1981). The effect of dietary fibre on human pancreatic enzyme activity *invitro*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34(6), 1034-1035.

El Hajjouji, H., Fakharedine, N., Ait Baddi, G., Winterton, P., Bailly, J. R., Revel, J. C., & Hafidi, M. (2007). Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, 98(18), 3513-3520.

Eroglou, E., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L., & Eroglu, I. (2004). Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewaters as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 163-171.

Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119-127.

Evans, L. V., Simpson, M., & Callow, M. E. (1973). Sulfated polysaccharide synthesis in brown algae. *Planta*, 110(3), 237-252.

Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., & Guillèn, A. (2000). Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(1), 15-22.

Femenia, A., Levebvre, A. C., Thebaudin, J. Y., Robertson, J. A., & Bourgeois, C. M. (1997). Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. *Journal of Food Science*, 62(4), 635-639.

Femenia, A., Selvendran, R. R., Ring, S. G., Robertson, J. A. (1999). Effects of heat treatment and dehydration on properties of cauliflower fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 728-732.

Fernández-Bolaños, J., Fernandez-Díez, M. J., Morreno, M. R., Serrano, A. G., & Romero, T. P. (1983). A sucares y polioles en aceitunas verdes III. *Gracas y Aceites*, 34(3), 168-171.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillén, R., Jiménez, A., & Rodríguez, R. (2004). Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5849-5855.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., & Jiménez, A. (2002). Production in large quantitiew of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6804-6811.

Fernández-Díez M. J. (1979). Texture of table olives and pimentos. *Journal of Texture Studies* 10(2), 103-116.

Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J. M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4), 176-185.

Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., & Pérez-Alvarez, J. A. (2007). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 1-6.

Fernández-Martín, F., Guerra, M. A., López, E., Solas, M. T., Carballo, J., & Jiménez-Colmonero, F. (2000). Characteristics of pressurised pork meat batters as affected by addition of plasma proteins, apple fibre and potato starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1230-1236.

Ferreira, J.A., Mafra, I., Soares, M.R., Evtuguin, D.V., & Coimbra, M.A. (2006). Dimeric calcium complexes of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Olea europaea* L. cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 535-543.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1957). Alpechines. *Gracas y Aceites*, 9(1), 126-135.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A., & Borja-Padilla, R. (1996). Biomethanization. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 145-153.

Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.

Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Monaco, P., Nardelli, A., Parrella, A., & Temussi, F. (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity comparison of low-molecular-weight-phenol components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1005-1009.

Firuzi, O., Giansanti, L., Vento, R., Seibert, C., Petrucci, R., Marrosu, G., Agostino, R., & Sasol, L. (2003). Hypochlorite scavenging activity of hydroxycinnamic acids evaluated by a rapid microplate method based on the measurement of chloramines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(7), 1021-1027.

Folin, O., & Ciocalteau, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biology and Chemistry*, 73, 627-650.

Fraeye, I., De Roeck, A., Duvetter, T., Verlent, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2007). Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry*, *105*(2), 555-563.

Fraeye, I., Knockaert, G., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2010). Enzyme infusion prior to thermal/high pressure processing of strawberries: Mechanistic insight into firmness evolution. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 23-31.

Frølich, W., & Nyman, M. (1988). Minerals, phytate and dietary fiber in different fractions of oat-grain. *Journal of Cereal Science*, 7(1), 73-82.

Fuentes-Alventosa, J. M., Rodríguez-Guitiérrez G., Jaramillo-Carmona, S., Espejo-Calvo, J. A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Bolaños, J., Guillèn-Bejarano, R., & Jiménez-Araujo, A. (2009). Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fibre powders obtained from asparagus by-products. *Food Chemistry*, 113(2), 665-671.

Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010a). A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT-Food Science and Technology*. Article in Press.

Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010b) Clarification of high-added value products recovered from olive mill wastewater. Journal of Food Engineering, 99(2), 190-197.

Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010c). Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs. *LWT-Food Science and Technology*. Article in Press.

Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010d). Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Article in Press.

Galanakis, C. M., Tornberg, E., & Gekas, V. (2010e). The effect of heat processing on the functional properties of pectin contained in olive mill wastewater. *LWT-Food Science and Technology*. Article in Press.

Gallaher, D. D., Locket, P. L., & Gallaher, C. M. (1992). Bile acid metabolism in rats fed two levels of corn oil and brans of oat, rye, and barley and sugar beet fiber. *Journal of Nutrition*, 122(3), 473-481.

Galiatsatou, P., Metaxas, M., Arapoglou, D., & Kasselouri-Rigopoulou, V. (2002). Treatment of olive mill waste water with activated carbons from agricultural by-products. *Waste Management*, 22(7), 803-812.

Galili, E., & Sharvit, J. (1998). 20,000 Olives under the sea. *Archaeological and Historical Israel Discover*, 19(5), 16.

Gao, L., & Mazza, G. (1996). Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science*, 61(3), 600-603.

García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2007). Utilisation of fruit fibres in conventional and reduced-fat cooked-meat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 624-631.

Gekas, V., Baralla, G., & Flores, V. (1998). Applications of membrane technology in the food industry. *Food Science and Technology*, 4(5), 311-328.

Gekas, V., Trägårdh, G., & Hallström, B. (1993). *Ultrafiltration membrane performance fundamentals* (pp. 45-51). Lund University and The Swedish Foundation for Membrane Technology, Lund.

Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Christopoulou, N., & Goumenaki, M. (2007). Optimization of biogas production from olive-oil wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure. *Applied Energy*, 84(6), 646-663.

Georgacakis, D., & Dalis, D. (1993). Controlled-anaerobic digestion of settled olive oil wastewater. *Bioresource Technology*, 46(3). 221-226.

Georget, D., M., R. (2001). Effect of ripening on the mechanical properties of Portuguese and Spanish varieties of olive (*Olea europaea* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 448-454.

Gernjak, W., Krutzler, T., Glaser, A., Malato, S., Caceres, J., Bauer, R., & Fernández-Alba, A. R. (2003). *Chemosphere*, 50(1), 71-78.

Gerrard, J. A. (2006). The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead-conference report from the Eighth International Symposium on the Maillard reaction. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 324-330.

Gertenbach, D. D. (2001). Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In J., Shi, G. Mazza, M. Le Maguer (Eds). Functional Foods Biochemical and processing aspects. Vol. 2. (pp. 331-366). Boca Raton, Fla.: CRC Press Inc.

Giannakas, K., Tran, K. C. & Tzouvelekas, V. (2000). Efficiency, technological change and output growth in Greek olive growing farms: a Box-Cox approach.

Gil-Serrano, A., Mateos-Matos, M. I., & Tejero-Mateo, M. P. (1986). Acidic xylan from olive pulp. *Phytochemistry*, 25(11), 2653-2654.

Gil-Serrano, A., & Tejero-Mateo, P. (1988). A xyloglucan from olive pulp. *Carbohydrate Research*, 181(1), 278-281.

Giovane, A., Quagliuolo, L., Servillo, L., Balestrieri, C., Laratta, B., Loiudice, R., & Castaldo, D. (1993). Purification and characterization of three isozymes of pectin methylesterase from tomato fruit. *Journal of Food Biochemistry*, 17(5), 339-349.

Glore, S., van Treeck, D., Knehans, A., & Guild, M. (1994). Soluble fiber and serum-lipids - A literature review. *Journal of American Dietetic Association*, 94(4), 425-436.

Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J. R., Kahn, V. (1984). Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 177, 437-456.

Gonzáles, R., Johns, M. R., Greenfield, P. F., & Pace, G. W. (1989). Xanthan gum precipitation using ethanol. *Process Biochemistry*, 24(6), 200-203.

Gonzalez-Lopez, J., Pozo, C., Martinez-Toledo, V., Rodelas, B., & Salmeron, V. (1996). Production of polyhydroxyalkanoates by Azotobacter chroococcum H23 in wastewater from olive oil mills (alpechin). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 271.

Gortzi, O., Lalas, S., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Papaconstandinou, S., & Dourtoglou, E. (2008). Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X08). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(2), 133-140.

Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 615-622.

Greco, G., Toscanoa, G., Gianfreda, L., & Sannino, F. (1999). Dephenolisation of olive-mill waste-waters by olive husk. *Water Research*, 33(13), 3046-3050.

Gökmen, V., Acar, J., & Kahraman, N. (2003). Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of golden delicious apple juice. *Journal of Food Quality*, 26(3), 257-266.

Grigelmo-Miguel, N., & Martín-Belloso, O. (1998). Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International*, 31(5), 355.

Grigelmo-Miguel, N., & Martín-Belloso, O. (1999a). Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32(8), 503-508.

Grigelmo-Miguel, N., Abadias-Seros, M. I., & Martín-Belloso, O. (1999b). Characterisation of low-fat high dietary fibre frankfurters. *Meat Science*, 52(3), 247-256.

Guillen R., Heredia, A., Felizon, B., Jimenez, A., Montano A., & Fernandez-Bolanos, J. (1992). Fibre fraction carbohydrates in *Olea Europaea* (Gordal and Manzanilla var.). *Food Chemistry*, 44(2), 173-178.

Gunasekaran, S., & Ak M. M. (2000). Dynamic oscillatory shear testing foods-selected applications. *Trends in Food Science and Technology*, 11(3), 115-127.

Haagensen, F., Skiadas, I. V., Gavala, H. N., & Ahring, B. K. (2009). Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass and Bioenergy*, 33(11), 1643-1651.

Hamdi, M. (1992). Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 37(2), 155-163.

Hao, X. G., Pritzker, M., & Feng, X. S. (2009). Use of pervaporation for the separation of phenol from dilute aqueous solutions. *Journal of Membrane Science*, 335(1-2), 96-102.

Hayes, J. E., Stepanya, V., Allen, P., O'Grady, M. N., O'Brien, N. M., & Kerry, J. P. (2009). The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Science*, 83(2), 201-208.

Hearing, V. J., & Himénez, M. (1987). Mammalian tyrosinase – The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *International Journal of Biochemistry*, 19(12), 1141-1147.

Heredia, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Vioque, B., & Fernández, J.-C. (1990). Cellulases in cell wall-degrading extracts of *Olea europaea arolensis*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 190(1), 22-24.

Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., & Fernández-Bolaños, J. (1993). Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 196(2), 147-151.

Heredia, A., Jiménez, A., & Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 200(1), 24-31.

Heredia, A., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (1996). Effect of the temperature of extraction on the composition of cell wall polysaccharides in olives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 202(3), 228-232.

Hewedi, M. M., Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1985). Recovery of milk protein by ethanol precipitation. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 9(1), 11-23.

Hoffmann-Ribani, R., Huber, L. S., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2009). Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 263-268.

Hotchkiss, A., T., Savary, B. J., Cameron, R. G., Chau, H. K., Brouillette, J., Luzio, G. A., & Fishman, M. L. (2002). Enzymatic modification of pectin to increase its calcium sensitivity while preserving its molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2931-2937.

Howe, G. R. (1992). Benito, E., Castelleto, R., Cornee, J., Esteve, J., Gallagher, R. P., Iscovich, J. M., Jiao, D. A., Kaas, R., Kune, G. A., Kune, S., Labbe, K. A., Lee, H. P., Lee, M., Miller, A. B., Peters, R. K., Potter, J. D., Riboli, E., Slattery, M. L., Trichopoulos, D., Tuyns, A., Tzonou, A., Whittemore, A. S., Wuwilliams, A. H., & Zheng, S. Dietary intake of fibre and decreased risk of cancers of the colon and rectum: Evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. Journal of National Cancer Institute, 84(24), 1887-1896.

Hsu, P-. K., Chien, P-. J., Chen, C-. H., & Chau, C-. F. (2006). Carrot insoluble fiber-rich fraction lowers lipid and cholesterol absorption in hamsters. *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 337-342.

Huang, S. C., Shiau, C. Y., Liu, T. E., Chu, C. L., & Hwang, D. F. (2005). Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Science*, 70(4), 613-619.

Huisman, M. M. H., Schols, H. A., & Voragen A. G. J. (1996). Changes in cell wall polysaccharides from ripening olive fruits, *Carbohydrate Polymers*, 31(3), 123-133.

Hunt, M., & Mancini, R. A. (2009). Colour stability of fresh meat. 55th International Conference of Meat Science and Technology, 16-21 August. Copenhagen, Denmark.

Ihl, M., Astete, G., & Bifani, V. (1992). Precipitation of pectins from apple pomace of the araucania region by ethanol and aluminum-chloride. *Revista Espanola De Ciencia y TEchnologia De Alimentos*, 32(2), 185-197.

Inan, H., Dimoglo, A., Simsek, H., & Karpuzku, M. (2003). Olive oil mill wastewater treatment by means of electrocoagulation. *Separation and Purification Technology*, 36(), 23-31.

Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931–2944.

Japon-Lujan, R., & de Castro, M. D. L. (2007). Static-dynamic superheated lquid extraction of hydroxytyrosol and other biophenols from alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3629-3634.

Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M., & Luque de Castro, M. D. (2006). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(4), 753-759.

Jiao, B., Cassano, A., & Drioli, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of Food Engineering*, 63(3), 303-324.

Jiménez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Vanrobaeys, F., Golay, P. A., Cotring, C., Lardeau, A., & Keely, B. J. (2008). High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3470-3477.

Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, & Heredia, A. (1994). Cell Wall Composition of olives. *Journal of Food Science*, 59(6), 1192-1201.

Jiménez, A., Guillén, R., Sánchez, C., Fernández-Bolaños, J., & Heredia, A. (1995). Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during "Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2240-2246.

Jiménez, A., Guillén, R., Sánchez, C., Fernández-Bolaños, J., & Heredia, A. (1996). Molecular weight and ionic characteristics of olive cell wall polysaccharides during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 913-918.

Jiménez, A., Heredia, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (1997). Correlation between soaking conditions, cation content of cell wall, and olive firmness during "Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1653-1658.

Jiménez, A., Rodriguez, R., Fernando-Caro, I. R., Guillen, J., Fernandez-Bolanos, & Heredia A. (2000). Dietary fibre content of table olives processed under different European styles: of physico-chemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1903-1908.

Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., & Heredia, A. (2001a). Olive fruit cell wall: Degradation of cellulosic and hemicellulosic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1008-2013.

Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., & Heredia, A. (2001b). Olive fruit cell wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 409-415.

Jiménez-Escribano, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489-5493.

Justino, C., Marques, A. G., Duarte, K. R., Duarte, A. C., Pereira, R., Rocha-Santos, T., & Freitas, A. C. (2010). *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 650-656.

Kallel M., Belaid, C., Boussahel, R., Ksibi, M., Montiel, A., & Elleuch, B. (2009). Olive mill wastewater degradation by Fenton oxidation with zero-valent iron and hydrogen peroxide. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 550-554.

Kamide, K., Okajima, K., Matsui, T., & Kowsaka, K. (1984). Study on the solubility of cellulose in aqueous alkali solution by deuteration IR and C-13 NMR. *Polymer Journal*, 16(12), 857-866.

Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, 36(1-2), 169-189.

Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., Avramaki, C., & Angelakis, A. N. (2006). Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management*, 82(3), 354-370.

Kar, F., & Arslan, N. (1999). Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*, 40(4), 277-284.

Kay, R. M. (1982). Dietary fiber. *Journal of Lipid Research*, 23(2), 221-242.

Keally, T. (2006). Application of liquid and solid rheological technologies to the textural characterisation of semi-solid foods. *Food Research International*, 39(3), 265–276.

Keijbets M. J. H., & Pilnik, W. (1974). *β*-elimination of pectin in the presence of anions and cations. *Carbohydrate Research*, 33(2), 359-362.

Kestioglou, K., Yonar, T., & Azbar, N. (2005). Feasibility of physic-chemical treatment and advanced oxidation processes (AOPs) as a means of pretreatment of olive mill effluent (OME). *Process Biochemistry*, 40(7), 2409-2416.

King, K. (1991). Characteristics of pectinesterase isolated from Bramley apple waste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57 (1), 43-48.

Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(1), 78-93.

Kirtchev, N., Panchev, I., & Kratchanov, C. (1989). Pectin extraction in the presence of alcohols. *Carbohydrate Polymers*, 11(4), 257-263.

Knupp, G., Rucker, G., Ramos-Cormenzana, A., Hoyos, S. G., Neugebauer, M., & Ossenkop, T. (1996). *International Biodeterioration and Bidoegradation*, 38(3-4), 277-282.

Kosmala, M., Kołodziejczyk, K., Markowski, J., Mieszczakowska, M., Ginies, C., & Renard, C. M. G. C. (2010). Co-products of black-currant and apple juice production: Hydration properties and polysaccharide composition. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 173-180.

Krall, S. M., & McFeeters, R. F. (1998). Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1311-1315.

Kratchanova, M., Slavov, A., & Kratchanov, C. (2004). Interaction of pectin with amino acids and other amino compounds in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 677-683.

Kravtchenko, T. P., Penci, M., Voragen, A. G. J., & Pilnik, W. (1993). Enzymatic and chemical degradation of some industrial pectins. *Carbohydrate Polymers*, 20(3), 195-205.

Ku, Y., Jansen, O., Oles, C. J., Lazar, E. Z., & Rader, J. I. (2003). Precipitation of inulins and oligoglucoses by ethanol and other solvents. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 81(1), 125-132.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633-640.

Kunzek, H., Kabbert, R., & Gloyna, D. (1999). Aspects of material science in food processing: changes in plant cell walls of fruits and vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung Forschung A*, 208(4), 233-250.

Ladikos, D., & Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*, 35(4), 295-314.

Lagoudianaki, E., Manios, T., Geniatakis, M., Frantzeskaki, N., & Manios, V. et al. (2003). Odor control in evaporation ponds treating olive mill wastewater through the use of $Ca(OH)_2$. *Journal of Environmental Science and Health, Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 38(11), 2537-2547.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Review: Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.

Lamb, D. J. (1981). The effect of Karaya gum on tooth enamel. *British Dental Journal*, 150(9), 250-252.

Laratta B., Fasanaro, G. De Sio, F., Castaldo, D., Palmieri, A. Giovane, A., & Servillo, L. (1995). Thermal inactivation of pectin methylesterase in tomato puree: Implications on cloud stability. *Process Biochemistry*, 30(3), 251-259.

Larrauri, J. A. (1999). New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 10(1), 3-8.

Larrauri, J. A., Ruperez, P., Borroto, B., & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: preparation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29(8), 729-733.

Larrauri, J. A., Ruperez, P., Saura-Calixto, F. (1997). Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4028-4031.

Laufenberg, G., Kunz, B., & Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementation. *Bioresource Technology*, 87(2), 167-198.

LeBlanc, J., Nadeau, A., Mercier, I., McKay, C., & Samson, P. (1991). Effect of guar gum on insulinogenic and thermogenic response to glucose. *Nutrition Research*, 11(2-3), 133-139.

Leger, C. L., Kadiri-Hassani, N., & Descomps, B. (2000). Decreased superoxide anoin production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5061-5067.

Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J. L., Asther, M., & Labat., M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.

Lindley, M. G. (1998). The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 9(8-9), 336-340.

Lipnizki, F., Carter, M., & Trägårdh, G. (2006). Applications of membrane processes in the beet and cane sugar production, *Zuckerindustrie*, 131(1), 29-38.

Lo Scalzo R., & Scarpati, M. L. (1993). A new secoiridoid from olive waste-waters. *Journal of Natural Products*, 56(4), 621-623.

Loconti, J. D., & Kertesz, Z. I. (1941). Identification of calcium pectate as the tissue-firming compound formed by treatment of tomatoes with calcium chloride. *Food Research*, 6, 499-508.

Lolos, G., Skordilis, A., & Parissakis, G. (1994). Polluting characteristics and lime precipitation of olive mill wastewater. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxic Hazardous Substance Control*, 29(7), 1349-1356.

Löfgren, C., Guillotin, S., Evenbratt, H., Schols, H., & Hermansson, A-M. (2005). Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pectin gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 646-652.

Lopes da Silva, J. A. L. & Goncalves, M. P. (1994). Rheological study into the aging process of high methoxyl pectin/sucrose aqueous gels. *Carbohydrate Polymers*, 24(4), 235-245.

Lopez, J. A. S., Li, Q., & Thompson, I. P. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 63-69.

Lopez, M. J., & Ramos-Cormenzana, A. (1996). Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 263-270.

Loncin, M., & Merson, R. L. (1979). Food engineering. Principles and selected applications (pp. 494). New York: Academic Press Inc.

Lopez, M. J., Moreno, J., & Ramos-Cormenzana, A. (1996). *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water Research*, 35(7), 1828-1830.

Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, 92(2), 201-208.

Lu, Y., & Foo, L. Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68(1), 81-85.

Macdonald, H. M., & Evans, R. (1996). Purification and properties of apple pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(3), 321-326.

Mafra, I., Barros, A. S., & Coimbra, M. A. (2006a). Effect of black oxidising table olive process on the cell wall polysaccharides of olive pulp (*Olea europaea* L. var. Negrinha do Douro). *Carbohydrate Polymers*, 65(1), 1-8.

Mafra, I., Barros, A. S., Nunes, C., Vitorino, R., Saraiva, J., Smith, A. C., Waldron, K. W., Delgadillo, I., & Coimbra, M. A. (2006b). Ripening-related changes in the cell walls of olive (*Olea europaea* L.) pulp of two consequtive harvests. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 988-998.

Mafra, I., Lanza, B., Reis, A., Marsilio, V., Campestre, C., de Angelis-M., & Coimbra, M. A. (2001). Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiologia Plantarum*, 111(4), 439-447.

Mameri, N., Halet, F., Drouiche, M., Grib, H., Lounici, H., Pauss, A., Piron, D., & Belhocine, D. (2000). Treatment of olive mill washing water by ultrafiltration. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 78(3), 590-595.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Review: current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100-121.

Mangas, J. J., Suárez, B., Picinelli, A., Moreno, J., & Blanco D. (1997). Differentiation by phenolic profile of apple juices prepared according to two membranes techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 477-4784.

Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galleti, P., Chiariello, M., & Zappia, V. (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(8), 461-466.

Mansour, E. H., & Khalil A. H. (1999). Characteristics of low-fat beef burgers as influenced by various types of wheat fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 493-498.

Manthey, J. A., & Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 811-814.

Mantzavinos, D., Hellenbrand, R., Livingston, A. G., & Metcalfe, I. (1996). Catalytic wet oxidation of p-coumaric acid: Partial oxidation intermediates, reaction pathways and catalyst leaching. *Applied Catalysis B-Environmental*, 7(3-4), 379-396.

Mantzavinos, D., Lauer, E., Hellenbrand, R., Livingston, A. G., & Metcalfe, I. (1997). Wet oxidation as a pretreatment method for wastewaters contaminated by bioresistant organics. *Water Science and Technology*, 36(2-3), 109-116.

Marques, I. P. (2001). Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, 137(1-3), 233-239.

Marques, I. P., Teixeira, A., & Rodrigues, L. (1998). Anaerobic treatment of olive mill wastewater with digested piggery effluent. *Water Environment Research*, 70(5), 1056-1061.

Marshall, M. R., Marcy, J. E., & Braddock, R. J. (1985). Effect of Total Solids Level on heat inactivation of Pectinesterase in Orange Juice. *Journal of Food Science*, 50(1), 220-222.

Marsilio, V., Campestre, C., & Lanza, B. (2001). Sugar and polyol composition of some European olive fruit varieties (Olea europaea L., cv Kalamata) in different ripening stages. *Food Chemistry*, 72(4), 485-490.

Marsilio, V., Lanza, B., & De Angelis, M. (1996). Olive cell wall components: Physical and biochemical changes during processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 35-43.

Martin-Cabrejas, M. A., Esteban, R. M., Lopez-Andreu, F. J., Waldron, K., & Selvendran, R. R. (1995). Dietary fiber content of pear and kiwi pomaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 662-666.

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9-10), 364-373.

Massadeh, M. I., & Modallal, N. (2008). Ethanol production from olive mill wastewater (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Energy and Fuels*, 22(1), 150-154.

Matia-Merino, L., Lau, K., & Dickinson E. (2004). Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 271-281.

Mateos, R., Esparteto, J., Trujillo, M., Rios, J. J., Leon-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.

May, C. D. (1990). Industrial Pectins – Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), 79-99.

Mayer, A. M. (1992). Polyphenol oxidases in plants – Recent progress. 2. *Phytochemistry*, 26(1), 11-20.

Mayer, A. M., & Harel, E. (1992). Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In P. F. Fox (Eds), Food Enzymology, (pp. 373-397). London: Elsevier Applied Science.

McDonald, D., Prenzler, P. D., Antolovich, M., & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1), 73-84.

McDougall, G.J., Morrison, I.M., Stewart, D., & Hillman, J.R. (1996). Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 133-150.

McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3), 253-273.

McKee, L. H., & Latner T. A. (2000). Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55 (4), 285-304.

McNeil, M., Darvill, A., & Albersheim, P. (1980). Structure of plant cell walls X. Rhamnogalacturonan I a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension cultured sycamore cells acer-pseudoplatanus cells. Plant Physiology, 66(6), 1128.

Mercadè, M. E., & Manresa, M. A. (1994). The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 71(1), 61-64.

Mercadè, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., Deandres, C., & Guinea, J. (1993). Olive oil mill effluent (OOME) – new substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, 43(1), 1-6.

Meyer, A. S., Heinonen, M., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetion, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61(1-2), 71-75.

Michel, F., Thibault, J. F., Barry, J. L., & Debaynast, R. (1988). Preparation and characterization of dietary fiber from sugar-beet pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42(1), 77-85.

Mínguez-Mosquera, M., Gallardo-Guerrero, L., & Roca, M. (2002). Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79(1), 93-99.

Mohammad, A. W., Basha, R. K., & Leo, C. P. (2010). Nanofiltration of glucose solution containing salts: Effects of membrane characteristics, organic component and salts on retention. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 510-518.

Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. In D. Barton, K., Nakanishi, & O. Meth-Cohn (Eds). Comprehensive natural products chemistry (pp. 497-527). Amsterdam: Elsevier Science B. V.

Morozova, O.V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V. & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523-535.

Morra, M. C., Cassineli, C., Cascado, G., Nagel, M. D., Della Volpe, C., Siboni, S., Maniglio, D., Brugnara, M., Ceccone, G., Schols, H. A., & Ulvskov, P. (2004). Effects on interfacial properties and cell adhesion of surface modification by pectic hairy regions. *Biomacremolecules*, 5(6), 2094-2104.

Morris, G. A., Foster, T. J., & Harding, S. E. (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 361-367.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M., J., & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2),145-171.

Moure, F., Rendueles, M., & Díaz M. (2003). Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. *Meat Science*, 64(4), 391-398.

Mulder, M. (1996). Basic principles of membrane technology (pp. 280-308). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agriucltural and Food Chemistry*, 49(8), 3509-3514.

Mylonaki , S., Kiassos, E., Makris D. P., & Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (Olea europaea) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(5), 977-985.

Nardini, M., Daquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Difelice, M., & Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density-lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid-derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5), 541-552.

Nedeltschewa, M., Drafanowa, R., & Gelew, S. (1977). Influence of carbonyl-group content on solubility of lignine and polysaccharides during sulfate pulping of pre-hydrolized poplar wood. *Papier*, 31(3), 106-109.

Nguyen, B. L., Van Loey, A., Fachin, D., Verlent, I., & Hendrickx, I. M. (2002). Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, 78(6), 683-690.

Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2004). Introduction. In G. Dardanos. Olive-Mill waste management. Literature Review and Patent Survey (pp. 3-12). Athens: Typothito.

Nilsson, M., Trägårdh, G., & Östergren, K. (2006). The influence of different kinds of pre-treatment on the performance of a polyamide nanofiltration membrane. *Desalination*, 195(1-3), 160-168.

Nilsson, M. (2007). Nanofiltration at elevated temperatures: Influence of the combined effects of temperature, salts, pH and cleaning. PhD Thesis (pp. 1-2). Lund University: Lund.

O'Neill, M. A., Alberdheim, P., & Darvill, A. G. (1990). The pectic polysaccharides in primary cell walls. In P. M. Dey (Eds). Methods in plant biochemistry (pp. 415-441). London: Academic Press.

O'Neill, M. A., Ishii, T., Alberdheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 109-139.

Obeirne, S. F., & Flynn, J. R. (1975). Potato as a source of dietary fiber. *Irish Journal of Medical Science*, 144(2), 76-77.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2005a). Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9911-9920.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005b). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823-837.

Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007a). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.

Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007b). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 603(2), 176-189.

Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2008). Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and

antioxidant activity of olive mill waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(11), 3925-2932.

Obied, H. K., Karuso, P., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007c). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2848-2853.

Obied, H. K., Prenzler, P. D., Konczak, I., Rehman, A. U., & Robards, K. (2009). Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassays. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 227-234.

Olguin, M. C., Posadas, M. D., Revelant, G. C., Labourdette, V. B., Elias, H. D., & Venezia, M. R. (2010). Evaluation of soy hulls as a potential ingredient of functional foods for the prevention of obesity. *Ecology of Food and Nutrition*, 49(2), 98-109,

Olson, A., Gray, G. M., & Chiu, M. C. (1987). Chemistry and analysis of soluble dietary fiber. *Food Technology*, 41(2), 71-80.

Oreopoulou, V., & Tzia, C. (2006). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In V. Oreopoulou and W. Russ. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry (pp. 209-232). Springer Science and Business Media: New York.

Oroszvári, B. K., Bayod, E., Sjöholm I., & Tornberg, E. (2005a). The mechanisms controlling heat and mass transfer on frying of beefburgers. Part 2: The influence of the pan temperature and patty diameter. *Journal of Food Engineering*, 71(1), 18-27.

Oroszvári, B. K., Bayod, E., Sjöholm, I. & Tornberg, E. (2006). The mechanisms controlling heat and mass transfer on frying of beefburgers. III. Mass transfer evolution during frying. *Journal of Food Engineering*, 76(2), 169-178.

Oroszvári, B. K., Sjöholm I., & Tornberg, E. (2005b). The mechanisms controlling heat and mass transfer on frying of beefburgers. I. The influence of the composition and comminution of meat raw material. *Journal of Food Engineering*, 67(4), 499-506.

Oszmianski, J., & Wojdyło, A. (2007). Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology*, 224(6), 755-762.

Pagan, J., Ibarz, A., Llorca, M., & Coll, L. (1999). Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(7), 1038-1042.

Pagan, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagan, A., & Barbosa-Canovas, G. V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, 34(7), 605-612.

Paraskeva, C. A., Papadakis, V. G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D. G., & Koutsoukos, P. G. (2007). Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination*, 213(1-3), 218-229.

Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(9), 1475-1485.

Paredes, C., Bernal, M. P., Roig, A. & Cegarra, J., (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. *Biodegradation*, 12(4), 225-234.

Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sanchez-Monedero, M. A., & Bernal, M. P. (1999). Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology*, 67(2), 111-115.

Paredes, M. J., Moreno, E., Ramos-Cormenzana, A., & Martínez, J. (1987). Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 16(7), 1557-1564.

Peng, F., Ren, J. –L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., & Sun, R. –C. (2009). Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugar bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14). 6305-6317.

Pérez, J., D., Esteban, E., Gómez. M., & Gallardo-Lara, F. (1986). Effects of waste-water from olive processing on seed germination and early plant-growth of different vegetable species. *Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 21(4), 349-357.

Pérez, J., de la Rubia, T., Moreno, J., & Martínez J. (1992). Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste-waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(4), 489-495.

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17(11), 579-590.

Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642.

Pokorný, J. (2006). Impact of food processing on antioxidant plant phenols. In D. Boskou Eds., Natural antioxidant phenols (pp. 175-194). Kerala: Research Signpost.

Pokorný, J., & Korczak, J. (2001). Part4. Practical applications. In J. Pokorný, N. Yanishleva, & M. Gordon (Eds), Antioxidants in Food (pp 311-400). Cambridge: Woodhead Publishing.

Pompei, C., & Codovilli, F. (1974). Preliminary results concerning the depuration treatment of olive vegetation waters by reverse osmosis. *Science & Technology Alimenti*, IV, 363-366.

Ptitchkina, N. M., Danilova, I. A., Doxastakis, G., Kasapis, S., & Morris E. R. (1994). Pumpkin pectin: gel formation at unusually low concentration. *Carbohydrate Polymers*, 23(4), 265-273.

Puri, A., Solomos, T., & Kramer, A. (1982). Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chemistry*, 8(3), 203-213.

Qi, B. X., Moore, K. G., & Orchard, J. (2000). A comparison of two methods and the effect of cooking time on the extractability of pectin from the cell walls of cooking banana. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology-Food Science and Technology*, 33(5), 369-373.

Quiles, J. L., Farquharson, A. J., Simpson, D. K., Grant, I., & Wahle, K. W. J. (2002). Olive oil phenolics: Effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *British Journal of Nutrition*, 88(3), 225-234.

Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jiménez, B., & García-Pareja, M. P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 283-290.

Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., & López, M. J. (1995). Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35(1-3), 249.

Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., & Hendrickx, M. (2005). Thermal and high-pressure inactivation kinetics of polyphenol oxidase in Victoria grape must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2988-2994.

Redondo-Cuenca, A., Villanueava-Suarez, M. J., Rodriguez-Sevilla, M. D., & Heredia-Moreno, A. (1997). Changes in insoluble and soluble dietary fiber of white asparagus (Asparagus officinalis L.) during different conditions of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3228-3232.

Reis, A., Domingues, M.R.M., Ferrer-Correia, A.J., & Coimbra, M.A. (2003). Structural characterization by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 53(1), 101-107.

Reis, M. T. A., de Freitas, O. M. F., Ferreira, L. M., & Carvalho, J. M. R. (2006). Extraction of 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol from aqueous solution by emulsion liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, 269(1-2), 161-170.

Renard, C. & Thibault, J. F. (1996). Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. *Carbohydrate Research*, 286(1), 139-150.

Rexova-Benkova, L., & Markovic, O. (1976). Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 33(pp. iii-x), 323-385.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.

Rinaldi, M., Rana, G., & Imona, M. (2003). Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Fields Crops Research*, 84(3), 319-326.

Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596-601.

Rodrigues de Sotillo, D., Hadley, M., & Wolf-Hall, C. (1998). Potato peel waste: stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *Journal of Food Science*, 59(5), 1031-1033.

Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Esparteto, J. L., & Fernández-Bolaños, J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from Olea europaea fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 483-490.

Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 17(1), 3-15.

Rojas, C. M., & Brewer, S. (2008). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *Journal of quality*, 31(2), 173-188.

Romani, A., Lapucci, C., Cantini, C., Ieri, F., Mulinaci, N., & Visioli, F. (2007). Evolution of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1315-1320.

Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., & Garrido, A. (2002). Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(13), 3835-3839.

Ross-Murphy, S. B. (1995). Rheological characterisation of gels. *Journal of Texture Studies*, 26(4), 391-400.

Rossi, A., & Malpei, F. (1996). Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 135-144.

Rozzi, A., Passino, R., & Limoni, N. (1989). Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactor. *Process Biochemistry*, 24(2), 68-74.

Roozen, J. P. (1987). Effects of types I, II and III antioxidants on phospholipid oxidation in a meat model from wormed over flavor. *Food Chemistry*, 24(3), 167-185.

Ruiz-Gutierrez, V., Muriana, F. J. G., Maestro, R., & Graciani, E. (1995). Oleuropein on lipid and fatty-acid composition of rat-heart. *Nutrition Research*, 15(1), 37-51.

Russo, C. (2007). A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *Journal of Membrane Science*, 288(1-2), 239-246.

Ryan, D., & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123(5), 31R-44R.

S'habou, R., Zairi, M., Kallel, A., Aydi, A., & Ben Dhia, H. (2009). Assesing the effect of an olive mill wastewater evaporation pond in Sousse, Tunisia. *Environmental Geology*, 58(3), 679-686.

Sabbah, I., Yazbak, A., Haj, J., Saliba, A., & Basheer, S. (2005). Biomass selection for optimal anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Environmental Technology*, 26(1), 47-54.

Sajjanantakul, T., Van Buren, J. P., & Downing, D. L. (1993). Effect of cations on heat degradation of chelator-soluble carrot pectin. *Carbohydrate Polymers*, *20*(3), 207-214.

Sánchez-Arias, V., Fernández, F. J., Villaseñor, J., & Rodríguez, L. (2008). Enhancing the co-composting of olive mill wastes and sewage sludge by the addition of an industrial waste. *Bioresource Technology*, 99(14), 6346-6353.

Sanjust, E., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A., & Ballero, M. (1991). Olive milling waste-water as a medium for growth of 4 *Pleurotus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31(3), 223-235.

Santos, G. A., & Doty, M. S. (1983). Agar from some Hawaiian red algae. *Aquatic Botany*, 16(4), 385-389.

Sarika, R., Kalogerakis, N., & Mantzavinos, D. (2005). Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with polyelectrolytes. *Environment International*, 31(2), 297-304.

Sarkar, B., DasGupta, S., & De, S. (2009). Flux decline electric field-assisted cross-flow ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice. *Journal of Membrane Science*, 331(1-2), 75-83.

Sato, H., Uraki, Y., Kishimoto, T., & Sano, Y. (2003). New process for producing cellulose acetate from wood in concentrated acetic acid. *Cellulose*, 10(4), 397-404.

Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442–447.

Saura-Calixto F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.

Sayadi, S., & Ellouz, R. (1995). Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1098-1103.

Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreb, H. U., Rentschler, C., & Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 99-107.

Sciancalepore, V., & Longone, V. (1984). Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2), 320-321.

Schmidt, S. & Pokorný, J. (2005). Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 23(3), 93-102.

Schneeman, B. O. (1986). Dietary fibre: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technology*, 40(2), 104-110.

Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12(11), 401-413.

Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (1996). Complex pectins: structure elucidation using enzymes. In J. Visser, & A. G. J. Voragen. Pectins and pectinases (pp. 3-19). Amsterdam: Elsevier Science B. V.

Schols, H. A., Coenen, G.,-J., & Voragen, A. G. J. (2009). Revealing pectin's structure. In H. A., Schols, R. G. F., Visser, A. G. J., Voragen (Eds). Pectins and pectinases (pp. 19-31). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Schwartzberg, H. G., & Chao, R. Y. (1982). Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technology*, 2(1), 73-86.

Scott, R. W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*, 51(7), 936-941.

Seetharaman, K., Waniska, R. D., & Dexter, L. (1994). An approach to increasing fiber content of wheat tortillas. Journal of American Association of Cereal Chemistry, 39(6), 444-447.

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., & Montedoro, G. (1999). Phenolic compounds of olive fruit: One- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 12-18.

Sheabar, F. Z., Neeman, I. (1988). Separation and concentration of natural antioxidants from rape olives. *Journal of the American Oil Chemists So*ciety, 65(6), 990-993.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry a total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology*, 16(2), 144-158.

Sierra, J., Marti, E., Montserrat, G., Cruapas, R., & Garau, M. A. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive mill wastewater disposal. *Science of the Total Environment*, 279(1-3), 207-214.

Sila, D. N., Smout, C., Elliot, F., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2006). Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *Journal of Food Science*, 71(1), E1-E9.

Silva, E. M., Rogez, H. & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387.

Singh, N., & Rajini, P. S. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry*, 85(4), 611-616.

Slavov, A., Garnier, C., Crépeau, M. -J., Durand, S., Thibault, J. -F., & Bonnin, E. (2009). Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers*, *77*(4), 876-884.

Soukoulis, C., Lebesi, D., & Tzia, C. (2009). Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallization and glass transition phenomena. *Food Chemistry*, 115(2), 665-671.

Soysal, C. (2008). Kinetics and thermal activation/inactivation of starking apple polyphenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(6), 1034-1036.

Staffolo, M. D., Martino, M., & Bevilacqua, A. (2007). Texture and sensory properties of dairy desserts with dietary fibres of different sources. *Acta Alimentaria*, 36(3), 343-354.

Staniforth, D. H., Baird, I. M., Fowler, J., & Lister, R. E. (1991). The effects of dietary fibre on upper and lower gastrointestinal transit times and fecal bulking. *Journal of International Medical Research*, 19(3), 228-233.

Stephen, A. M., & Cummings, J. H. (1980). Microbial contribution to human fecal mass. *Journal of Medical Microbiology*, 13(1), 45-56.

Stoforos N. G., Crelier, S., Robert, M. C., & Taoukis P. S. (2002). Kinetics of tomato pectin methylesterase. Inactivation by temperature and high pressure. *Food Engineering and Physical Properties*, 67 (3), 1026-1031.

Stoller, M., & Chianese, A. (2006). Technical optimization of a batch olive wash wastewater treatment membrane plant. *Desalination*, 200(1-3), 734-736.

Suárez, M., Romero, M.-P., Ramo, T., Maciá, A., & Motilva, M.-J. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1463-1472.

Suh, H. J., Lee, J. M., Cho, J. S., Kim, Y. S., & Chung, S. H. (1999). Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Research International*, 32(10), 659-664.

Susanto, H., Feng, Y., & Ulbricht, M. (2009). Fouling behavior of aqueous solutions of polyphenolic compounds during ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 334-340.

Swennen, K., Courtin, C. M., van den Bruggen, B., Vandecasteele, C., & Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydrate Polymers*, 62(3), 283-292.

Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Słydk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.

Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathé G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(4), 200-207.

Theander, O. P., Aman, E., Westerlund, R., Andersson, R., & Petterson D. (1995). Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues and Klason lignin (The Uppsala Method): Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 78(4), 1030-1044.

Thebaudin, J. Y., Lefevbvre, A. C., Harrington, M., & Bourgeois, C. M. (1997). Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Trends in Food Science and Technology*, 8(2), 41-48.

Tijskens, L. M. M., Waldron, K. W., Ingham, A. L., & Van Dijk, C. (1997). The kinetics of pectin methyl esterase in potatoes and carrots during blanching. *Journal of Food Engineering*, 34(4), 371-385.

Tijskens, L. M. M., Rodis, P. S., Hertog, M. L. A. T. M., Proxenia, N. C. G., & Van Dijk., C. (1999). Activity of pectin methyl esterase during blanching of peaches: a generic model. *Journal of Food Engineering*, 39(2), 167-177.

Tomati, U., Galli, E., Forelli, F., & Pasetti, L. (1996). Fertilizers from composting of olive mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 155-162.

Tornberg, E., & Sjöholm I. (2005). Vegetable fat replacement in meat products. *World Intellectual Property Organisation, WO2005/107500*, A1.

Tornberg, E. & Galanakis, C. M. (2008). Olive waste recovery. *World Intellectual Property Organization*, WO2008/082343.

Trevisan, M., Schisterman, E., Mennoti, A., Farchi, G., & Conti S. (2001). Drinking pattern and mortality: The Italian risk factor and life expectancy pooling project. *Annals of Epidemiology*, 11(5), 312-319.

Tsagaraki, E., Lazarides, H. N., & Petrotos, K. B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In V. Oreopoulou and W. Russ. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry (pp. 133-158). Springer Science and Business Media: New York.

Tsimogiannis, D.I., & Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(1-2), 140-146.

Turano, E., Curcio, S., De Paola, M. G., Calabro, V., & Iorio, G. (2002). An integrated centrifugation-ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 209(2), 519-531.

Van Dokkum, W., Wesstra, A., Luyken, R., & Hermus, R. J., S., (1988). The effects of a high-animal-protein and high-vegetable-protein diet on mineral balance and bowel function on young men. *British Journal of Nutrition*, 56(2), 341-345.

Vásquez-Roncero, A., Maestro-Durán, R., & Constante, E. G. (1974). Componentes fenólicos de la aceituna. ii. Polifenols del alpechin. *Grasas y Aceites*, 25(6), 341-345.

Velioĝlou, S. G., Curi, K., & Camillar, S. R. (1987). Laboratory experiments on the physical treatment of olive oil wastewater. *International Journal of Developmental Technology*, 5(1), 49-57.

Velioĝlou, S. G., Curi, K., & Camillar, S. R. (1992). Activated sludge treatability of olive oil-bearing wastewater. *Water Research*, 26(10), 1415-140.

Ventanas, S., Estevez, M., Delgado, L. C., & Ruiz, J. (2007). Phospholipid oxidation, nonenzymatic browning development and volatile compounds generation in model systems containing liposomes from porcine *Longissimus dorsi* and selected amino acids. *European Food Research and Technology*, 225(5-6), 665-675.

Vierhuis, E., Korver, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2003). Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea* cv maraiolo) in relation to processing for oil extraction. *Carbohydrate Polymers*, 51(2), 135-148.

Vierhuis, E., Schols, H. A., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (2000). Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different stages. *Carbohydrate Polymers*, 43(1), 11-21.

Vierhuis, E., Schols, H. A., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (2001a). Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 51-62.

Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Montedoro, G. F. (2001b). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1218-1223.

Vierhuis, E., York, W., Kolli, V. S. K., Vincken, J. -P., Schols, H. A., Van Alebeek, G. -J. W. M., & Voragen, A.G. J. (2001c). Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydrate Research*, 332(3), 285-297.

Vigo, F., Avalle, L., & De Paz, M. (1983a). Ultrafiltration of vegetation waters coming from olives mills. *Rivista Iitaliana Sostanze Grasse*, LX, 125-132.

Vigo, F., De Paz, M., & Avalle, L. (1983b). Ultrafiltration of vegetation waters coming from olives mills: experiments on a semi-pilot plant. *Rivista Iitaliana Sostanze Grasse*, LX, 267-272.

Vigo, F., Giordani, M., & Capannelli, G. (1981). Treatment of vegetation waters coming from olives mills: study of the electrochemical oxidation process. *Rivista Iitaliana Sostanze Grasse*, LVIII, 70-73.

Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Gacs-Baitz, E., & Delle-Monache, G. (1997). Biotransformation of tyrosol by whole-cell and cell-free preparation of *Lentinus edodes*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3(5), 213-220.

Virk, B. S., & Sogi, D. S. (2004). Extraction and characterization of pectin from apple (Malus Pumila. Cv Amri) peel waste. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 693-703.

Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G., & Galli, C. (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radical Research*, 34(3), 301-305.

Visioli, F., Galli, G., & Caruso, D. (2002). Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10). 677-684

Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F. F., & Galli, C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3397-3401.

Visioli, F., Vinceri, F. F., & Galli, C. (1995). Waste-waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51(1), 32-34.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. A. (2009). Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 655-660.

Vlyssides, A. G., Loizidou, M., Gimouhopoulos, K., & Zorpas, A. (1998). Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7(5-6), 308-313.

Vourch, M., Balannec, B., Chaufer, B., & Dorange, G. (2005). Nanofiltration and reverse osmosis of model process waters from the dairy industry to produce water for reuse. *Desalination*, 172(3), 245-256.

Vu, T. S., Smout, C., Sila, D. N., & Van Loey, A. M. L., & Hendrickx M. E. G. (2006). The effect of brine ingredients on carrot texture during thermal processing in relation to pectin depolymerization due to the β-elimination reaction. *Journal of Food Science*, 71(9), E370-E375.

Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1990). Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum*, 80(4), 568-575.

Waldron, K. W., Parker, M. L., & Smith, A. C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(4), 128-146.

Wang, T. S. C., Tang, T. K., & Chuang, T. T. (1967). Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Science*, 103(2), 239-246.

Weemaes, C. A., Ludikhuyze, L. R., Broeck, I. V., & Hendrickx, M. E. (1998). Effect of pH on pressure and thermal inactivation of avocado polyphenol oxidase: A kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2785-2792.

Widsten, P., & Kandelbauer, A. (2008). Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 293-307.

Wilcockson, J. (1975). The differential precipitation of nucleic acids and proteins from aqueous solutions by ethanol. *Analytical Biochemistry*, 66(1), 64-68.

Willet, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A. & Speizer, F. E. (1990). Relation of meat, fat and fibre intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *New England Journal of Medicine*, 323(24), 1664-1672.

Willet, W. C., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G., Manson, J. E., Spiegelman, D., Ronser, B., Hennekens, C. H., & Speizer, F. E. (1992). Dietary fat and fiber in relation to risk of breast cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 268(15), 2037-2044.

Wright, S. J. L. (1975). Simple agar plate method, using micro-algae, for herbicide bioassay or detection. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 14(1), 65-70.

Xu, Y., Li, K., & Zhang, M. (2007). Lignin precipitation on the pulp fibers in the ethanol-based organosolv pulping. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 301(1-3), 255-263.

Yapo, B. M., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007). Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 245-255.

Yazdanshenas, M., Tabatabaeenezhad, A. R., Roostaazad, R., & Khoshfetrat, A. B. (2005). Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. *Separation and Purification Technology*, 47(1-2), 52-57.

Yemenicioglou, A. (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *European Food Research and Technology*, 214(4), 313-319.

Yilmaz, I. (2004). Effects of rye bran addition on fatty acid composition and quality characteristics of low-fat meatballs. *Meat Science*, 67(2), 245-249.

Yoo, S. H., Fishman, M. L., Savary, B. J., & Hotchkiss, A. T. (2003). Monovalent salt-induced gelation of enzymatically deesterified pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7410-7417.

Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.

Ziogas, V., Tanou, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G., & Vasilakakis, M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. Food Chemistry, 120(4), 1097-1103.

Zykwinska, A., Gaillard, C., Boiffard, M.-H., Thibault, J.-F., & Bonnin, E., (2009). “Green labelled” pectins with gelling and emulsifying properties can be extracted by enzymatic way from unexploited sources. *Food Hydrocolloids*, *23*(8), 2468-2477.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γκέκας, Β., & Μπαλτά, Κ. Π. (2005). Βιομηχανία τροφίμων και περιβάλλον (Σελ. 26-37). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα.

Γκέκας, Β., & Πρωιμάκη, Σ. Γ. (2001). Φυσικοχημικές Διεργασίες Διαχωρισμών (Σελ. 3-9). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα.

Γκέκας, Β., Φραντζεσκάκη, Ν., & Κατσίβελα, Ε. (2002). Τεχνολογίες Επεξεργασίας Τοξικών – επικίνδυνων αποβλήτων (Σελ. 181-191). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα.

Καλφόγλου, Ν. (1979). Φυσικές Διεργασίες Χημικής Τεχνολογίας (Σελ 1-48, 138-201). Αθήνα: Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων.

Κυριτσάκης, Α. (1989). Το ελαιόλαδο (Σελ. 35). Δεύτερη Έκδοση. Θεσσαλονίκη: Αγροτικές Συνεταιριστικές εκδόσεις Α.Ε.

Τσάκωνα, Σ. (2010). Βελτιστοποίηση εκχύλισης φαινολών από τοπικά φυτά και δέντρα της Κρήτης: μεταπτυχιακή διατριβή (Σελ. 50-53). Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.

Χατζησυμεών, Ε. (2009). Επεξεργασία υγρών αποβλήτων κατεργασίας ελιάς με εφαρμογή χημικών και βιολογικών διεργασιών: διδακτορική διατριβή (Σελ. 11-12). Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης.

I

II

III

IV

V