



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ II: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ &
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Αξιοποίηση παραπροϊόντων της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας

Ανδρομάχη Υφαντή

Υπεύθυνη καθηγήτρια

ΚΡΟΚΙΔΑ Μ.

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, στη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2016 – 2017, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Μαγδαληνής Κροκίδα. Σκοπός της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, είναι η αξιοποίηση παραπροϊόντων τομάτας από βιομηχανίες επεξεργασίας της, με τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων για την παραγωγή εκχυλίσματος λυκοπενίου και οξικού οξέος (ξύδι τομάτας), που αποτελούν προϊόντας υψηλής διατροφικής και σημαντικής αγοραστικής αξίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την υπεύθυνη καθηγήτρια, κα Μαγδαληνή Κροκίδα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την υποστήριξη και τη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου και στη Διδάκτορα Πένυ Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια και συνεχή καθοδήγησή της στην οργάνωση και εκτέλεση των πειραματικών δοκιμών και αναλύσεων, καθώς και τη συμβολή της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Κυρίως όμως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές της, τη συνολική στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, η οποία στάθηκε καθοριστική για την ολοκλήρωση της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χρήστο Μπουκουβάλα για τη βοήθεια που προσέφερε και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας και τις σημαντικές παρατηρήσεις και συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω ειλικρινά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών για την υπομονή τους και τη βοήθεια τους σε επιστημονικό επίπεδο, αλλά και για την καλή τους διάθεση και συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου εκεί.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης ιδιαίτερα τον κ. Ευάγγελο Τόπακα και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών, για τη διάθεση του βακτηρίου *Acetobacter pasteurianus* για την παρούσα διπλωματική και τη βοήθεια και τις υποδείξεις τους κατά την καλλιέργεια του.

Οκτώβριος, 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η αξιοποίηση παραπροϊόντων της βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας για την ανάκτηση της βιοδραστικής ένωσης του λυκοπενίου και την παραγωγή οξικού οξέος. Τα προϊόντα που παράγονται από αυτή τη διεργασία, μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων ή να πωληθούν στην αγορά ως καινοτόμα και λειτουργικά τρόφιμα υψηλής διατροφικής και αγοραστικής αξίας.

Στις μέρες μας το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, όπως αυτά που προκύπτουν από τις βιομηχανίες επεξεργασίας τομάτας, είναι αυξημένο. Η μέχρι τώρα προβλεπόμενη πρακτική αξιοποίησης των παραπροϊόντων τομάτας, περιλάμβανε τη χρήση τους ως λίπασμα ή ζωοτροφή. Ωστόσο, έρευνες αποδεικνύουν ότι το φρούτο της τομάτας αποτελεί πολύτιμη πηγή βιοδραστικών και άλλων πολύτιμων ενώσεων. Συγκεκριμένα το λυκοπένιο έχει αποδειχθεί ως ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά καροτενοειδή που βρίσκονται στον καρπό της τομάτας, σε αυξημένα επίπεδα συγκεντρώσεων ειδικά στο δέρμα της. Ακόμη οι πολλαπλές ευεργετικές ιδιότητες του συστατικού αυτού για την υγεία των ανθρώπων το καθιστούν πολύτιμο και απαραίτητο για τη διατροφή τους.

Έτσι, στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα ανάκτησης λυκοπενίου από το παραπροϊόν του δέρματος, με χρήση καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης με υπερήχους (MAE) και μικροκύματα (UAE) και έγινε προσπάθεια αριστοποίησης των συνθηκών εκχύλισης με αυτές τις μεθόδους. Η αριστοποίηση διερευνήθηκε ως προς την απόδοση ανάκτησης του βιοδραστικού αυτού συστατικού και για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της έντασης των μικροκυμάτων, της έντασης των υπερήχων και της αναλογίας ξηρού παραπροϊόντος : διαλύτη εκχύλισης στην απόδοση της διεργασίας. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν στη συνέχεια με τη μέθοδο HPLC-DAD. Ακόμη αξιοποιήθηκε ο χυμός από τη συμπίεση των παραπροϊόντων και τις ελαττωματικές τομάτες που δεν χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία για την παραγωγή οξικού οξέος μέσω της ζύμωσης δύο σταδίων, η οποία περιλαμβάνει τα στάδια της αλκοολικής και οξικής ζύμωσης. Σε κάθε περίπτωση αξιοποίησης των παραπροϊόντων αυτών χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες και μέθοδοι φιλικούς ως προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό, οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση γαλακτικού αιθυλεστέρα, που αποτελεί έναν οικολογικό και μη τοξικό διαλύτη, αντίθετα με τους συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση, με πολύ καλές αποδόσεις ως προς την ανάκτηση των καροτενοειδών.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων, προέκυψε ότι η βέλτιστη απόδοση που μπορεί να επιτευχθεί είναι 91.2% σε συνθήκες 500 W ένταση μικροκυμάτων, 600 W ένταση υπερήχων και 1:30 (w/v) αναλογία στερεού με διαλύτη. Σε ότι αφορά την παραγωγή του οξικού οξέος, το τελικό προϊόν που παράχθηκε αποδείχθηκε πλούσιο σε λυκοπένιο με συγκέντρωση 9.2 mg/ 100g, ενώ είχε pH 2.85 και 5.42% περιεκτικότητα σε οξικό οξύ.

Λέξεις Κλειδιά

Λυκοπένιο, Εκχύλιση, Μικροκύματα, Υπέρηχοι, Ζύμωση.

ABSTRACT

The aim of the present research is to exploit by-products of the tomato processing industry for the recovery of lycopene, a bioactive compound, and the production of acetic acid. The products produced by these processes can be later used as natural, value-added additives in the food industry, or sold on the market as novel and functional foods of high nutritional and purchasing value.

Nowadays, there is a high interest in exploiting various residues coming from the food industry, such as the by-products of the tomato processing industry. The current applying practices regarding the treatment of tomato processing by-products, include mainly the usage as animal feed and fertilizers. Many studies have shown that tomato is a valuable source of many bioactive ingredients and the main source of lycopene, which is an important carotenoid for the human dietary. Lycopene has been proven to be one of the predominant antioxidant compounds present in the skin part of tomato. Other than that, lycopene is a valuable compound with many benefits for the human health according to many studies.

The objective of the present thesis is to study and optimize the recovery methods of lycopene from tomato skin by-products, by using Microwave (MAE) and Ultrasound Assisted Extractions (UAE). The criteria for optimizing the extraction process is the efficiency of recovering the bioactive compound, thus microwave power, ultrasound power and solid to solvent ratio, were studied. The extracts were then analyzed with HPLC-DAD. The tomato juice coming from surplus tomatoes and by-products was utilized for the production of acetic acid through a two-stage fermentation process, including alcoholic and acetic fermentation. In all cases, environmentally and human friendly solvents and methods were used. For this reason, the extractions were carried out using ethyl lactate as a solvent, which is an ecological and non-toxic solvent, unlike the usual solvents used in extraction, with very good yields for the recovery of carotenoids.

From the comparison of the extraction results, it emerged that the optimal yield that can be achieved is 91.2% for 500 W microwave power, 600 W ultrasonic power and 1:30 (w / v) solid to solvent ratio. The acetic acid produced from the fermentation was found to be rich in lycopene at a concentration of 9.2 mg / 100g with pH 2.85 and 5.42% acetic acid concentration.

Key Words

Lycopene, Extraction, Microwave, Ultrasound, Fermentation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	xv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αντικείμενο και Στόχοι	1
1.2. Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση	1
1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά.....	2
1.4 Διάρθρωση.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
2.1 Βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας	5
2.1.1 Προϊόντα βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας	6
2.1.2 Στάδια βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας.....	6
2.1.3 Παραπροϊόντα βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας και διαχείρισή τους	9
2.1.4 Σύσταση παραπροϊόντων βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας.....	12
2.2 Βιοδραστικά συστατικά στη τομάτα	15
2.2.1 Καροτενοειδή	16
2.3 Ανάκτηση και ανάλυση Λυκοπενίου.....	22
2.3.1 Εκχύλιση Λυκοπενίου	22
2.3.1.1 Μέθοδοι Εκχύλισης	24

2.3.1.2 Παράμετροι Εκχύλισης και Αριστοποίηση.....	37
2.3.2 Ανάλυση εκχυλίσματος Λυκοπενίου	42
2.4 Χρήσεις των καρτενοειδών.....	45
2.4.1 Βιομηχανία Τροφίμων.....	45
2.5 Ζύμωση για παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού) από παραπροϊόντα επεξεργασμένης τομάτας.	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	51
3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός	51
3.1.1 Αξιοποίηση δέρματος - Ανάκτηση Λυκοπενίου	51
3.1.2 Αξιοποίηση συμπυκνωμένου χυμού παραπροϊόντων τομάτας- Παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού).....	54
3.2 Υλικά.....	55
3.2.1 Πρώτες Ύλες.....	56
3.2.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια	57
3.2.3 Μικροοργανισμοί.....	57
3.3 Μέθοδοι – Όργανα και Συσκευές	59
3.3.1 Προ κατεργασία Νωπού παραπροϊόντος τομάτας.....	60
3.3.1.1 Απομάκρυνση χυμού τομάτας και πούλπας.....	60
3.3.1.2 Διαχωρισμός δέρματος και σπόρων	60
3.3.1.3 Ξήρανση υπό κατάψυξη φλοιών	60
3.3.2 Ανάκτηση Λυκοπενίου.....	62
3.3.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα.....	62
3.3.2.2 Εκχύλιση Soxhlet.....	65
3.3.3 Παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού)	66
3.3.3.1 Προκαλλιέργεια - διατήρηση μικροοργανισμών.....	66
3.3.3.2 Παραγωγή Αιθανόλης – Α' στάδιο Ζύμωσης (αλκοολική ζύμωση)	67
3.3.3.3 Παραγωγή Οξικού Οξέος – Β' στάδιο Ζύμωσης (Οξική ζύμωση).....	68

3.3.4 Μέτρηση χαρακτηριστικών Α' ύλης, εκχυλισμάτων και τελικών προϊόντων.....	69
3.3.4.1 Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός Λυκοπενίου.....	69
3.3.4.2 Μέτρηση Σακχάρων και Αλκοόλης.....	70
3.3.4.3 Μέτρηση pH.....	71
3.3.4.4 Μέτρηση ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας.....	72
3.3.4.5 Μέτρηση των ολικών διαλυμένων στερεών.....	73
3.3.4.6 Υπολογισμός Σύστασης.....	73
3.3.4.7 Μέτρηση Υγρασίας.....	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	75
4.1 Χαρακτηρισμός Α' ύλης.....	75
4.1.1.Σύνθεση και υγρασία παραπροϊόντος	75
4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου	75
4.3 Αριστοποίηση Εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους.....	79
4.3.1 Επίδραση της αναλογίας στερεού : διαλύτη στην απόδοση της εκχύλισης	81
4.3.2 Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων και υπερήχων στην απόδοση της εκχύλισης	84
4.3.3 Συνδυαστική επίδραση των τριών παραμέτρων.....	88
4.4 Διεργασία ζύμωσης και χαρακτηρισμός προϊόντων	90
4.4.1 Α' στάδιο ζύμωσης - αλκοολική ζύμωση.....	91
4.4.2 Χαρακτηρισμός προϊόντος αλκοολικής ζύμωσης (κρασί τομάτας).....	92
4.4.3 Β' στάδιο ζύμωσης - Οξική ζύμωση.....	92
4.4.2 Χαρακτηρισμός προϊόντος οξικής ζύμωσης (ξύδι τομάτας).....	94
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	95
5.1 Σημαντικές Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα.....	95
5.1.1 Ανάκτηση Λυκοπενίου.....	95
5.1.2 Παραγωγή Ξυδιού τομάτας.....	100

5.2 Προοπτικές για το μέλλον	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	113

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη μετατροπή του μετρούμενου δείκτη διάθλασης σε °Brix	71
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς για το Λυκοπένιο	77
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα επίδρασης της έντασης MW και US σε σχέση με την αναλογία στερεού : διαλύτη στα δείγματα.....	83
Διάγραμμα 4: Επίδραση της αύξησης της έντασης του MW στην απόδοση της εκχύλισης για πέντε περιπτώσεις μελετώμενων συνθηκών.....	85
Διάγραμμα 5: Επίδραση της αύξησης της έντασης του US στην απόδοση της εκχύλισης για τέσσερις περιπτώσεις μελετώμενων συνθηκών.....	87
Διάγραμμα 6: Πρώτο στάδιο παραγωγής οξικού οξέος. Μεταβολές στην περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αλκοόλη κατά το στάδιο αλκοολικής ζύμωσης.....	91
Διάγραμμα 7: Δεύτερο στάδιο παραγωγής οξικού οξέος. Μεταβολές στην περιεκτικότητα σε αλκοόλη και οξικό οξύ κατά το δεύτερο στάδιο οξικής ζύμωσης	93

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύσταση της τομάτας και των παραπροϊόντων της σε νερό, λιπίδια και άλλες βασικές βιοδραστικές ενώσεις	13
Πίνακας 2: Σύσταση τομάτας και προϊόντων αυτής σε καροτενοειδή σε mg/100g σε νωπή βάση	20
Πίνακας 3: Βασικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των τεχνικών εκχύλισης SE, MAE και UAE	36
Πίνακας 4: Κωδικοποίηση των τιμών των μεταβλητών για την αριστοποίηση	53
Πίνακας 5: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσεων	53
Πίνακας 6: Εύρος διακύμανσης της θερμοκρασίας ανάπτυξης για τα επιλεγμένα μικρόβια	54
Πίνακας 7: Εύρος διακύμανσης του pH ανάπτυξης για τα επιλεγμένα μικρόβια	55
Πίνακας 8: Συνθήκες λειτουργίας του κάθε σταδίου ζύμωσης	55
Πίνακας 9: Αναλογίες στερεού : διαλύτη και ακριβείς ποσότητες ξηρής σκόνης δέρματος που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα	62
Πίνακας 10: Σύσταση του παραπροϊόντος σε δέρμα και σπόρους (σε νωπή βάση)	75
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για το λυκοπένιο για κάθε δείγμα	76
Πίνακας 12: Συγκέντρωση λυκοπενίου στα μετρούμενα δείγματα (μg / mL)	78
Πίνακας 13: Απόδοση των εκχυλίσεων ως προς την ανάκτηση λυκοπενίου από το δείγμα	79
Πίνακας 14: Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης λυκοπενίου	80
Πίνακας 15: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 200 W και US 300 W	81
Πίνακας 16: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 500 W και US 0 W	81
Πίνακας 17: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 0 W και US 600 W	82
Πίνακας 18: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 500 W και US 600 W	82
Πίνακας 19: Αποτελέσματα αποδόσεων για εντάσεις MW 0 και 500W και μεταβλητές τιμές έντασης US και αναλογίας στερεού : διαλύτη	84
Πίνακας 20: Αποτελέσματα αποδόσεων για εντάσεις US 0 και 600W και μεταβλητές τιμές έντασης MW και αναλογίας στερεού : διαλύτη	86

Πίνακας 21: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:30 (w/v) και μεταβλητές εντάσεις MW και US	88
Πίνακας 22: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:10 (w/v) και μεταβλητές εντάσεις MW και US	88
Πίνακας 23: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:30 (w/v), και υψηλές εντάσεις μικροκυμάτων και υπερήχων	89
Πίνακας 24: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:10 (w/v), και υψηλές εντάσεις μικροκυμάτων και υπερήχων	89
Πίνακας 25: Αποτελέσματα αποδόσεων για απλή συμβατική εκχύλιση	90
Πίνακας 26: Μετρούμενες ιδιότητες του προϊόντος αλκοολικής ζύμωσης (κρασί τομάτας).....	92
Πίνακας 27: Μετρούμενες ιδιότητες του τελικού προϊόντος (ξύδι τομάτας).....	94

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Στάδια επεξεργασίας για την παραγωγή προϊόντων τομάτας.....	8
Εικόνα 2: Κατηγορίες ταξινόμησης των καροτενοειδών	17
Εικόνα 3: Ειδική αρίθμηση ανθράκων που εφαρμόζεται στα καροτενοειδή για το μόριο του λυκοπενίου. [46]	18
Εικόνα 4: Γεωμετρικά ισομερή του λυκοπενίου [11].....	19
Εικόνα 5: All-trans μορφή του λυκοπενίου	21
Εικόνα 6: Διαχωριστικό χωνί για απλή εκχύλιση [57].....	25
Εικόνα 7: Διάταξη εκχύλισης Soxhlet, όπου Α: σφαιρική φιάλη, Β: θάλαμος εκχύλισης και Γ: ψυκτήρας [61]	27
Εικόνα 8: Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς μάζας και θερμότητας στην ΜΑΕ και τη συμβατική εκχύλιση φυσικών προϊόντων [69].....	30
Εικόνα 9: Συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα [71]	31
Εικόνα 10: Κατάρρευση φυσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαίωση και απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα [75]	33
Εικόνα 11: Μηχανισμός λύσης του κυτταρικού τοιχώματος (α) λύση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της δημιουργίας ρωγμής στην κοιλότητα (β) διάχυση του διαλύτη μέσα στη δομή του κυττάρου	34
Εικόνα 12: Συνδυασμένη συσκευή εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UΜΑΕ) [78].....	37
Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής ΗΡLС Χρωματογράφου [92].....	43
Εικόνα 14: Οξειδωση της αιθανόλης από τα οξικά βακτήρια [106].....	49
Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα των σταδίων παραγωγής οξικού οξέος από χυμό τομάτας [108-114]	50
Εικόνα 16: Νωπό παραπροϊόν δέρματος και σπόρων	56
Εικόνα 17: Παραπροϊόν δέρματος μετά από ξήρανση και ομογενοποίηση.....	56
Εικόνα 18: Διάγραμμα πειραματικής διαδικασίας. Οι πρώτες ύλες, που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα, οι διεργασίες με τις οποίες ανακτήθηκε το λυκοπένιο και παρήχθη	

το οξικό οξύ, καθώς και οι διεργασίες προ κατεργασίας των Α' Υλών με μπλε χρώμα, και τέλος οι μεθοδολογίες χαρακτηρισμού με μωβ χρώμα	59
Εικόνα 19: Καταψύκτης Panasonic, MDF-U3386S, -80 °C	61
Εικόνα 20: Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (I) και υπό κενό (II)	61
Εικόνα 21: Διάταξη εκχύλισης UMAE, I) Συσκευή MAE, II) Συσκευή UAE.....	63
Εικόνα 22: Διάταξη συσκευής εξάτμισης υπό κενό	64
Εικόνα 23: Διάταξη της εκχύλισης Soxhlet για την εκχύλιση λυκοπενίου, όπου 1: Θερμαντικός μανδύας, 2: Εκχύλισμα πριν από κάθε σιφωνισμό, 3: Συμπυκνωτήρας, 4: Θάλαμος εκχύλισης και 5: Σφαιρική φιάλη με το μίγμα των διαλυτών της εκχύλισης	66
Εικόνα 24: Στάδια καλλιέργειας του βακτηρίου <i>Acetobacter pasteurianus</i>	67
Εικόνα 25: Στάδια ζυμώσεων στον βιοαντιδραστήρα, I) 1 ^ο Στάδιο Αλκοολικής Ζύμωσης, II) 2 ^ο Στάδιο Οξικής Ζύμωσης	68
Εικόνα 26: Συσκευή HPLC-DAD	70
Εικόνα 27: Συσκευή Multiparameter Bench Meter για τη μέτρηση του pH των δειγμάτων	72
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα πειράματος E-111.....	113
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα πειράματος E010	113
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα πειράματος E000	114
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα πειράματος E0-10.....	114
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα πειράματος E-1-1-1	115
Εικόνα 33: Χρωματογράφημα πειράματος E001	115
Εικόνα 34: Χρωματογράφημα πειράματος E100	116
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα πειράματος E11-1.....	116
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα πειράματος E000	117
Εικόνα 37: Χρωματογράφημα πειράματος E00-1.....	117
Εικόνα 38: Χρωματογράφημα πειράματος E-11-1	118
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα πειράματος E-100.....	118

Εικόνα 40: Χρωματογράφημα πειράματος E1-11.....	119
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα πειράματος E1-1-1	119
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πειράματος E111	120
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα πειράματος E-1-11	120
Εικόνα 44: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (χλωριούχο μεθυλένιο).....	121
Εικόνα 45: Χρωματογράφημα εκχύλισης Soxhlet.....	121
Εικόνα 46: Χρωματογράφημα χυμού τομάτας πριν τη ζύμωση	122
Εικόνα 47: Χρωματογράφημα κρασιού τομάτας μετά το 1 ^ο Στάδιο Ζύμωσης	122
Εικόνα 48: Χρωματογράφημα οξικού οξέος (ξύδι τομάτας) μετά το 2 ^ο Στάδιο Ζύμωσης.....	123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η αξιοποίηση παραπροϊόντων βιομηχανιών επεξεργασίας τομάτας, με χρήση φιλικών ως προς το περιβάλλον μεθόδων και διεργασιών. Για τον λόγο αυτό αξιοποιείται αρχικά το δέρμα του φρούτου, από το οποίο ανακτάται το λυκοπένιο με εκχύλιση, μιας και αποτελεί σημαντική βιοδραστική ένωση που υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα σε αυτό το τμήμα της τομάτας, ενώ ο χυμός που προκύπτει από τη συμπίεση των αρχικών παραπροϊόντων και άλλων υπολειμματικών τοματών, αξιοποιείται για την παραγωγή οξικού οξέος (ξύδι τομάτας), ένα υψηλής διατροφικής αξίας και καινοτόμο τρόφιμο.

Συνεπώς, η παρούσα διπλωματική εστιάζει στην ολιστική αξιοποίηση των παραπροϊόντων της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας. Συγκεκριμένα **στόχος** της είναι η μελέτη και αριστοποίηση της ανάκτησης λυκοπενίου, προκειμένου το εκχύλισμα που προκύπτει να αξιοποιηθεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό ή πρόσθετο τροφίμων για τη σύνθεση λειτουργικών προϊόντων, καθώς επίσης και την παραγωγή οξικού οξέος (ξύδι) αυξημένης προστιθέμενης αξίας.

Η μεγάλη σημασία και το επιστημονικό ενδιαφέρον έγκειται στην αξιοποίηση των παραπροϊόντων ενός τροφίμου χαμηλής οικονομικής αξίας, προς την παραγωγή νέων προϊόντων και βιοδραστικών συστατικών. Η ισχύουσα πρακτική προβλέπει στην αξιοποίηση αυτών των παραπροϊόντων ως ζωοτροφές και λιπάσματα. Ακόμη, η προτεινόμενη προσέγγιση αξιοποίησης αυτών των παραπροϊόντων θα δώσει νέες λύσεις οικονομικής αξιοποίησης με την εμπορική διάθεση του νέου προϊόντος ξυδιού και του εκχυλίσματος λυκοπενίου καθώς και προοπτική βελτίωσης των ήδη παραγόμενων προϊόντων της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας, με πιθανή προσθήκη του λυκοπενίου σε αυτά. Τέλος, η πρακτική ανάκτησης παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς εξετάζεται η χρήση «πράσινων» μεθόδων εκχύλισης με την εφαρμογή μικροκυμάτων και υπερήχων και χρήση «πράσινου» διαλύτη, ο οποίος θεωρείται ταυτόχρονα ασφαλής για χρήση σε τρόφιμα. Επιπρόσθετα, η προτεινόμενη παραγωγή οξικού οξέος περιλαμβάνει ζύμωση σε δύο στάδια με χρήση κοινών μικροοργανισμών σε σύντομο χρονικό διάστημα.

1.2. Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας – Μεθοδολογική προσέγγιση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ολιστική και περιβαλλοντικά βιώσιμη εκμετάλλευση των παραπροϊόντων βιομηχανίας τομάτας, για την παραγωγή δύο προϊόντων αυξημένης

διατροφικής και προστιθέμενης αξίας, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων ή να διατεθούν προς πώληση στην αγορά.

Η μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν αποτέλεσμα ενδελεχούς βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε μία καινοτόμος μέθοδος εκχύλισης, με μικροκύματα και υπερήχους και χρήση μη τοξικού διαλύτη για την ανάκτηση του λυκοπενίου και μελετήθηκαν οι βασικές της παράμετροι με σκοπό την αριστοποίησή της. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε δύο στάδια για την παραγωγή του οξικού οξέος. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες μετρήσεις για τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων και του οξικού οξέος.

1.3 Επιμέρους στόχοι – Αναμενόμενη συνεισφορά

Οι **επιμέρους στόχοι** της παρούσας εργασίας συνοψίζονται στα εξής:

- Μετατροπή ενός παραπροϊόντος χαμηλής υπολειμματικής αξίας σε χρήσιμα λειτουργικά προϊόντα.
- Αριστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα για την ανάκτηση της μέγιστης δυνατής ποσότητας λυκοπενίου από τη διαθέσιμη πρώτη ύλη.
- Εφαρμογή περιβαλλοντικά βιώσιμων λύσεων μέσω της χρήσης αρχών πράσινης χημείας για την εκχύλιση της επιλεγμένης βιοδραστικής ένωσης.

Καθώς όλοι οι προαναφερθέντες στόχοι ολοκληρώθηκαν με επιτυχία στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, **η αναμενόμενη συνεισφορά της** θα μπορούσε να αποτελείται σαφώς από τις μεθοδολογίες και την παροχή εξειδικευμένης γνώσης για αντίστοιχα πειράματα από άλλους ερευνητές. Ωστόσο πολύ σημαντικά είναι και τα επιστημονικά ευρήματα καθώς επιτεύχθηκε η πρώτη παραγωγή ενός προϊόντος αυξημένης διατροφικής και σημαντικής αγοραστικής αξίας, και ενός βιοδραστικού συστατικού το οποίο θα μπορούσε να εκμεταλλευτεί η εκάστοτε επιχείρηση είτε ως εκχύλισμα σε βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, κλπ. είτε για χρήση μέσα στα ήδη υπάρχοντα προϊόντα της.

1.4 Διάρθρωση

Στο πρώτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται αρχικά το αντικείμενο και οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακολούθως, αναφέρεται η μεθοδολογική προσέγγιση που ακολουθήθηκε, οι επιμέρους στόχοι και η αναμενόμενη συνεισφορά της. Τέλος, παρουσιάζεται η διάρθρωσή της.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αρχικά, αναφορά στον κλάδο των βιομηχανιών επεξεργασίας τομάτας, τα προϊόντα που παράγει, τις τεχνικές επεξεργασίας που ακολουθεί και το είδος και τη σύσταση των

παραπροϊόντων που προκύπτουν από αυτές. Στη συνέχεια αναλύονται τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχονται στην τομάτα, με έμφαση στο λυκοπένιο που μας ενδιαφέρει, για το οποίο περιγράφονται οι μέθοδοι ανάκτησης και ανάλυσης του. Τέλος, αφού γίνει αναφορά σε ορισμένες χρήσεις των καροτενοειδών στη βιομηχανία των τροφίμων, περιγράφεται η διαδικασία της ζύμωσης δύο σταδίων για την παραγωγή οξικού οξέος από παραπροϊόντα τομάτας.

Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία, που ακολουθήθηκε.

Στο τέταρτο κεφάλαιο, παρουσιάζονται, αναλύονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, τέλος συντελείται η εξαγωγή των συμπερασμάτων και προτείνονται μελλοντικές προοπτικές για την εξέλιξη του μελετώμενου θέματος.

Συμβολισμοί-Συντμήσεις

HPLC: High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

CE: Conventional Extraction – Συμβατική Εκχύλιση

SE: Soxhlet Extraction – Εκχύλιση Soxhlet

MAE: Microwave-Assisted Extraction – Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

MW: Microwave –Μικροκύματα

UAE: Ultrasound-Assisted Extraction – Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους

US: Ultrasound – Υπέρηχοι

UMAE: Ultrasonic/Microwave-Assisted Extraction – Συνδυασμένη εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα

d.w.: dry weight – ξηρή μάζα

rpm: rounds per minute – στροφές /λεπτό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας

Η ευρωπαϊκή βιομηχανία μεταποίησης λαχανικών και φρούτων περιλαμβάνει περισσότερες από 20,000 εταιρείες και κατέχει σημαντικό μερίδιο στην ευρωπαϊκή αγροτική βιομηχανία, η οποία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες βιομηχανίες της Ευρώπης. Από αυτές τις βιομηχανίες, περισσότερες από 3,000 ασχολούνται με την επεξεργασία της τομάτας για την παραγωγή προϊόντων από αυτήν, ενώ η καλλιέργεια και η μεταποίηση τομάτας αποτελεί τη μεγαλύτερη γεωργική δραστηριότητα για τις νότιες ευρωπαϊκές χώρες. Όλα αυτά καθιστούν την τομάτα ένα από τα πιο σημαντικά φρούτα παγκοσμίως στη διατροφή του ανθρώπου και ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα φρούτα στην Ελλάδα [1, 2]. Θεωρείται ακόμη ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργούμενα κηπευτικά στον κόσμο τόσο για άμεση κατανάλωση (φρέσκια ντομάτα), όσο και για την παραγωγή προϊόντων από αυτή (επεξεργασμένη τομάτα) [3]. Μεταξύ πολλών βιομηχανιών τροφίμων, η βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας είναι μία από τις βασικότερες στον τομέα της, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την ευρεία διάδοση καλλιέργειας της, με βάση τα στατιστικά στοιχεία των τελευταίων χρόνων για την παραγωγή της.

Συγκεκριμένα, στοιχεία από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) [4], αναφέρουν ότι, η παραγωγή και η κατανάλωση προϊόντων τομάτας, αυξάνεται τις δύο τελευταίες δεκαετίες κατά μέσο όρο 3% ετησίως σε όλο τον κόσμο, με αποτέλεσμα από 25 εκατομμύρια τόνους το 1995, η παραγωγή έφτασε στους 32 εκατομμύρια τόνους το 2005 και τελικά αυξήθηκε στους 41 εκατομμύρια τόνους το 2015. Από το 2001 μέχρι το 2012, η κατά κεφαλήν κατανάλωση προϊόντων τομάτας αυξήθηκε κατά 60%, επηρεάζοντας και την αύξηση της παραγωγής της βιομηχανικής τομάτας [1, 5, 6].

Ταυτόχρονα το εμπόριο προϊόντων τομάτας σε παγκόσμιο επίπεδο έχει αυξηθεί, διπλασιάζοντας την αξία του από το 2005 μέχρι το 2013 και φτάνοντας τα 6,9 δισεκατομμύρια δολάρια το 2014. Ανάμεσα στους μεγαλύτερους παραγωγούς τομάτας παγκοσμίως συμπεριλαμβάνονται η Καλιφόρνια, η Κίνα, η Ιταλία, η Ισπανία, η Τουρκία και η Πορτογαλία, οι οποίες και αντιπροσωπεύουν περίπου το 87% του συνολικού όγκου τόνων τομάτας που χρησιμοποιούνται για επεξεργασία. Ωστόσο, ενώ σε πολλές χώρες η παραγωγή τομάτας έχει αυξηθεί, στην Ελλάδα έχει παρατηρηθεί μείωση της παραγωγής της, παραμένοντας ωστόσο στους 10 πρώτους εξαγωγείς τοματοπολτού παγκοσμίως. Η μείωση αυτή οφείλεται κυρίως στο κλείσιμο μικρών επιχειρήσεων επεξεργασίας τομάτας, λόγω οικονομικών δυσχερειών τα τελευταία χρόνια [5].

Ως εκ τούτου, προκύπτει ότι η επεξεργασία της τομάτας για την παραγωγή προϊόντων από αυτήν, αποτελεί μία βιομηχανική δραστηριότητα με αυξανόμενη σημασία σε παγκόσμια κλίμακα. Σε αυτό το πλαίσιο, το θέμα της διαχείρισης των παραπροϊόντων που παράγονται από τις βιομηχανικές δραστηριότητες αξίζει να μελετηθεί ενδελεχώς και να προταθούν καινούριες λύσεις.

2.1.1 Προϊόντα βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας

Η τομάτα αποτελεί μία σχετικά εύκολη για επεξεργασία πρώτη ύλη, με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί πλέον πολλές διεργασίες επεξεργασίας της, παρέχοντας πληθώρα προϊόντων για κατανάλωση στην αγορά. Η βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας έχει πραγματοποιήσει τεράστια πρόοδο τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσοντας πολλά διαφορετικά τρόφιμα με βάση την τομάτα, όπως σάλτσες, κέτσαπ, πολτό, πάστες, σούπες, χυμούς, μίγματα χυμών και κονσέρβες τομάτας σε διάφορες μορφές. Το ελκυστικό χρώμα, η γεύση της τομάτας και τα οφέλη της για την υγεία την έχουν καταστήσει ως βασικό κομμάτι της διατροφής σε πολλά μέρη του κόσμου [7].

Όπως είναι γνωστό, οι τομάτες μπορούν να καταναλωθούν είτε ως φρέσκα φρούτα είτε σε επεξεργασμένες μορφές -ως κονσέρβες τομάτας, αποξηραμένες τομάτες και άλλα τρόφιμα με βάση την τομάτα. Η πούλπα από την τομάτα αποτελεί συνήθως το κλάσμα μεγαλύτερου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, από το οποίο και εξάγεται ο χυμός για την παραγωγή πολτού, που αποτελεί και την βάση για την παραγωγή όλων των άλλων προϊόντων.

Παρακάτω, παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα βασικότερα προϊόντα τομάτας που παράγονται και πωλούνται από τις βιομηχανίες στην Ελλάδα [8]:

- ✓ Τοματοπολτός με διαφορετικά ποσοστά συμπίκνωσης σε ολικά στερεά (7%, 11%, 28-30%)
- ✓ Αποφλοιωμένες τομάτες -ολόκληρες ή σε μορφή τεμαχίων- κονσερβοποιημένες
- ✓ Κονσερβοποιημένος χυμός τομάτας
- ✓ Κέτσαπ
- ✓ Σάλτσα πίτσας
- ✓ Τριμμένες τομάτες σε συσκευασία, κλπ.

2.1.2 Στάδια βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας

Παρόλο που η πλειοψηφία των παραγόμενων τοματών πωλούνται φρέσκιες, σχεδόν το ένα τρίτο της παραγωγής μεταποιείται για την παραγωγή τροφίμων από τις αντίστοιχες βιομηχανίες, με αποτέλεσμα

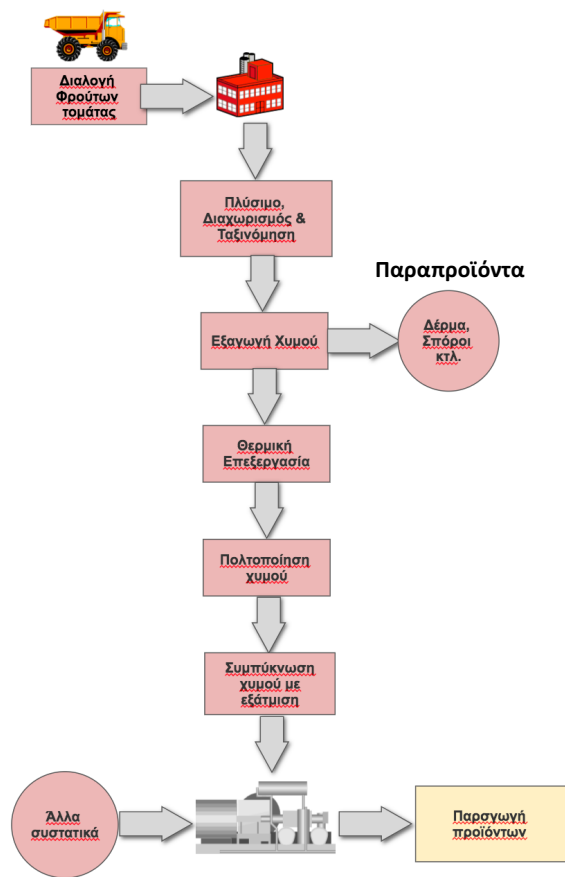
να παράγονται μεγάλες ποσότητες στερεών παραπροϊόντων, κυρίως από το δέρμα, τη σάρκα και τους σπόρους [9].

Κάθε βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας, ακολουθεί μία διαδικασία για την επεξεργασία της πρώτης ύλης και την παραγωγή προϊόντων, η οποία αν και μπορεί να διαφέρει σε ορισμένα σημεία, παρουσιάζει γενικά κάποια κοινά βασικά στοιχεία για όλες τις βιομηχανίες.

Έτσι για κάθε επιχείρηση, το πρώτο βήμα αποτελεί η σωστή διαλογή της πρώτης ύλης. Οι πιο άγουρες τομάτες πράσινου χρώματος διαχωρίζονται και φυλάσσονται σε κιβώτια για λίγες ημέρες, ενώ αυτές που έχουν σαπίσει απορρίπτονται. Ακόμη οι τομάτες που είναι μικρές, παραμορφωμένες και τραχιές και δεν μπορούν να ξεφλουδιστούν καλά, αφαιρούνται για να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά για την παραγωγή πολτού. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με σκοπό τη μείωση των αποβλήτων της βιομηχανίας.

Μετά τον διαχωρισμό οι τομάτες πλένονται σε ειδική συσκευή. Το πλύσιμο θα πρέπει να είναι εξονυχιστικό και να γίνεται χωρίς να τραυματίζει ή να συνθλίβει το φρούτο. Στη συνέχεια, οι τομάτες ζεματίζονται, περνώντας αργά από δεξαμενή ή θάλαμο ατμού, με τη συνεχή δράση ζεστού νερού ή ατμού αντίστοιχα. Αυτό γίνεται προκειμένου να χαλαρώσει το δέρμα της και έτσι με τον ψεκασμό στη συνέχεια με κρύο νερό, το δέρμα του φρούτου να μπορεί να απομακρυνθεί ευκολότερα. Η απομάκρυνση του δέρματος της τομάτας γίνεται σε επόμενο στάδιο με ειδικούς αποφλοιωτές. Στη συνέχεια ο καρπός της τομάτας είναι έτοιμος για περαιτέρω επεξεργασία ανάλογα με το τελικό επιθυμητό προϊόν [10].

Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται σχηματικά η πορεία μιας γενικής διεργασίας παραγωγής πολτού τομάτας από τη βιομηχανία.



Εικόνα 1: Στάδια επεξεργασίας για την παραγωγή προϊόντων τομάτας

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, το στάδιο βιομηχανικής επεξεργασίας από το οποίο αναμένεται να προκύψει ο μεγαλύτερος όγκος στερεών αποβλήτων, είναι το στάδιο εξαγωγής του χυμού από το φρούτο. Τα βασικά παραπροϊόντα που προκύπτουν από το στάδιο αυτό είναι το δέρμα και οι σπόροι της τομάτας, καθώς και ποσότητα από την πούλπα που παραμένει πάνω σε αυτά, τα οποία αποκαλούνται διαφορετικά τσίπουρο τομάτας (tomato romace). Το τσίπουρο της τομάτας αποτελεί σύμφωνα με μελέτες, το κύριο υπόλειμμα που προκύπτει από τις βιομηχανίες μεταποίησης αυτής.

Οι ποικιλίες τομάτας που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες για επεξεργασία διαφέρουν σε σχέση με τις υπόλοιπες που κυκλοφορούν στην αγορά, καθώς απαιτείται να διαθέτουν συγκεκριμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Πρέπει να έχουν δηλαδή, υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά στερεά, υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, έντονο κόκκινο χρώμα, αντοχή στις ασθένειες, χαμηλή οξύτητα, καθορισμένο ρυθμό ανάπτυξης, μικρό μέγεθος, συμπυκνωμένο και ομοιογενή καρπό και καθορισμένο ρυθμό ωρίμανσης. Είναι επίσης σημαντικό να μπορούν να συγκομιστούν μηχανικά χωρίς να καταστρέφονται. Οι ποικιλίες τομάτας που υπάρχουν στην αγορά είναι αρκετές και διαφέρουν συνήθως

στο μέγεθος, τη μορφή, το χρώμα, το άρωμα, τη γεύση και το χρόνο ζωής τους, καθώς επίσης και στο περιεχόμενό τους σε θρεπτικά και βιοδραστικά συστατικά [1, 11].

Οι βασικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα τελικά ποιοτικά χαρακτηριστικά της τομάτας κατά την καλλιέργεια και την παραγωγή της και τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από τους παραγωγούς, είναι [12]:

- Το κλίμα, η γεωγραφία και η επιλογή του εδάφους
- Η προετοιμασία της γης για καλλιέργεια
- Τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους
- Η οξύτητα του εδάφους
- Η χρήση λιπασμάτων
- Η καλλιέργεια (είδος) της τομάτας
- Η εποχή φύτεψης
- Ο τρόπος και οι πρακτικές καλλιέργειας

2.1.3 Παραπροϊόντα βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας και διαχείρισή τους

Η βιομηχανία τροφίμων παράγει μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων, αποβλήτων και λυμάτων που υπολογίζονται περίπου σε 300 εκατομμύρια τόνοι / έτος για την ΕΕ και αποτελούν κατά μέσο όρο 2-3% του όγκου των προϊόντων σε ξηρή βάση και το 7-10% της πρώτης ύλης. Προκύπτει έτσι ότι η αύξηση των ποσοτήτων των παραπροϊόντων και των αποβλήτων από τη βιομηχανία μεταποίησης τομάτας αποτελεί σημαντικό οικολογικό και οικονομικό πρόβλημα.

Τα στερεά υπολείμματα από τις βιομηχανίες μεταποίησης τομάτας, προέρχονται τόσο από την παραγωγή όσο και από την επεξεργασία της. Τα παραπροϊόντα από τη γραμμή παραγωγής οφείλονται σε ελαττώματα της εισερχόμενης πρώτης ύλης, όπως είναι ανώριμες τομάτες, σοβαρά ελαττωματικοί χρωματισμοί, κατεστραμμένες από μηχανικά αίτια τομάτες ή λόγω εμφάνισης μικροβιακής δράσης. Από την άλλη πλευρά, και η βιομηχανική επεξεργασία της τομάτας δημιουργεί υπολείμματα με πολλούς τρόπους και κυρίως κατά την εξαγωγή χυμού από αυτές. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα υπολείμματα των βιομηχανιών μπορούν να μεταφραστούν σαν ένα πρόσθετο κόστος για τις βιομηχανίες, λόγω των απαιτούμενων διαδικασιών απόρριψής τους. Για το λόγο αυτό πολλές φορές πωλούνται ή παραδίδονται δωρεάν ή επί πληρωμή σε άλλες εταιρείες για άλλη χρήση [3]. Συγκεκριμένα,

τα παραπροϊόντα από την επεξεργασία της τομάτας συνήθως δίνονται για περαιτέρω αξιοποίηση τους ως ζωοτροφές ή λιπάσματα.

Κάθε χρόνο χρησιμοποιούνται εκατομμύρια τόνοι τομάτας για επεξεργασία, με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων να παράγονται, τα οποία αν και δεν θεωρούνται από τη βιομηχανία απόβλητα αποτελούν μεγάλο πρόβλημα και όπως αναφέρθηκε, συνήθως διατίθενται για ζωοτροφές ή λιπάσματα [3].

Τα παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας περιλαμβάνουν τους σπόρους, τους φλοιούς, την υπολειμματική σάρκα και τους ελαττωματικούς καρπούς που δεν χρησιμοποιούνται στην παραγωγή [13]. Η αξιοποίηση αυτών των παραπροϊόντων που έχει καθιερωθεί να αποκαλούνται τσίπουρο τομάτας (tomato pomace), παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν με βάση πρόσφατες μελέτες, σημαντική πηγή θρεπτικών και πολύτιμων για τον άνθρωπο συστατικών και τόσο το δέρμα όσο και οι σπόροι, αποτελούν με βάση σχετικές έρευνες παραπροϊόντα πλούσια σε καροτενοειδή. Συνεπώς, το λεγόμενο τσίπουρο τομάτας, αποτελεί ένα νωπό παραπροϊόν της βιομηχανίας που αποτελείται κυρίως από το υλικό που προκύπτει από το ξεφλούδισμα της τομάτας (δέρμα/φλούδα), και ότι προκύπτει ως αποτέλεσμα της αφαίρεσης των σπόρων από αυτήν μαζί με το τμήμα της σάρκας που παραμένει [14]. Στο τσίπουρο μπορούν ακόμη να συμπεριληφθούν, όπως αναφέρεται και οι ελαττωματικές τομάτες που δεν χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες [15, 16].

Τα παραπροϊόντα της βιομηχανικά επεξεργασμένης τομάτας εκτιμάται ότι είναι περίπου 20-50 g/kg του αρχικού βάρους της τομάτας ή διαφορετικά κυμαίνεται στο 5-25% της πρώτης ύλης [13, 16, 17]. Λαμβάνοντας υπόψη την παγκόσμια ετήσια παραγωγή τόνων τομάτας για επεξεργασία το 2015 που υπολογίζεται ότι είναι περίπου 41 εκατομμύρια τόνοι [18], το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε 615.000 έως 200.000 τόνους τσίπουρου τομάτας ετησίως. Το ποσοστό αυτό, καθώς και η σύσταση του τσίπουρου σε δέρμα και σπόρους, διαφοροποιείται, ανάλογα με τις πρακτικές και τις συνθήκες επεξεργασίας που υιοθετεί η κάθε επιχείρηση και τον βαθμό που αξιοποιεί την πρώτη ύλη της, καθώς και την ίδια την σύσταση της πρώτης ύλης. Με άλλα λόγια, η ποσότητα του τσίπουρου που παράγεται από την κάθε βιομηχανία, υποδεικνύει κατά πόσο οι συνθήκες επεξεργασίας που εφαρμόζονται από αυτήν είναι αποτελεσματικές στην παραλαβή του πολτού από την τομάτα και για το λόγο αυτό το ποσοστό του υπολείμματος από το αρχικό βάρος μπορεί σε άλλες βιβλιογραφίες να εμφανίζεται μεγαλύτερο ή μικρότερο, ανάλογα με αυτές τις παραμέτρους [16, 17].

Διαχείριση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τομάτας από τις αντίστοιχες βιομηχανίες, το κύριο παραπροϊόν που προκύπτει είναι το τσίπουρο της τομάτας (tomato romace), αφού παράγεται σε ποσότητες μεγαλύτερες από το 5% του αρχικού βάρους της τομάτας. Τα ρεύματα υπολειμμάτων που παράγονται από την επεξεργασία τομάτας, χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες κυρίως είτε ως πρώτη ύλη για ζωοτροφές, είτε για την τροποποίηση του εδάφους στη γεωργία [3, 13]. Οι υπόλοιπες ποσότητες των παραπροϊόντων και λοιπών αποβλήτων που δεν αξιοποιούνται απορρίπτονται συνήθως σε χώρους υγειονομικής ταφής [19], αυξάνοντας το κόστος και την περιβαλλοντική ανησυχία για τις βιομηχανίες επεξεργασίας τομάτας.

Οι πρόσφατες προτεινόμενες λύσεις στη βιβλιογραφία για την πρακτική αξιοποίηση αυτών των βιολογικών παραπροϊόντων, περιλαμβάνουν την παραλαβή ενζύμων ή βιοδραστικών ενώσεων. Αρκετοί συγγραφείς έχουν τονίσει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των παραπροϊόντων της επεξεργασίας τομάτας, ιδίως των φλοιών, ως πηγή ανάκτησης καροτενοειδών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τον εμπλουτισμό ζωοτροφών [16, 20, 21]. Προωθείται ακόμη η χρήση των υπολειμμάτων τομάτας για την ανάκτηση βιοπολυμερών, τα οποία μπορούν επίσης να επαναχρησιμοποιηθούν στην ίδια βιομηχανία [22], ή σε διάφορους άλλους τομείς, όπως η γεωργία και η βιομηχανία φαρμάκων. Μια περαιτέρω χρήση αυτής της υπολειμματικής βιομάζας, θεωρείται η ενεργειακή της εκμετάλλευση για την παραγωγή βιοκαυσίμων ή την παραγωγή ηλεκτρισμού, με πολλά περιβαλλοντικά οφέλη, όπως επισημαίνεται και από πολλούς συγγραφείς [23]. Αυτό το είδος βιομάζας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ειδικούς σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας [24]. Κάποιες έρευνες έχουν ακόμα προτείνει τον διαχωρισμό των σπόρων από τον πολτό και το δέρμα, με ένα σύστημα καθίζησης και τη χρήση των σπόρων για την εξαγωγή και πώληση ενός βρώσιμου ελαίου τομάτας, που αποτελεί σημαντική πηγή πρωτεϊνών [1, 3].

Ακόμη, πρόσφατα, πολλοί ερευνητές εξέτασαν τη δυνατότητα χρήσης του τσίπουρου τομάτας ως νέου συστατικού σε διάφορα τρόφιμα [25], ενώ άλλοι διαπίστωσαν ότι η πούλπα της τομάτας μπορεί να αντικαταστήσει τα υδροκολλοειδή σε προϊόντα κέτσαπ και να βελτιώσει ή και να διατηρήσει το χρώμα και την υφή του προϊόντος [26]. Επίσης, οι Altan, McCarthy K. L. και Maskan, ερεύνησαν την προσθήκη του τσίπουρου τομάτας σε σνακ με βάση το κριθάρι και διαπίστωσαν πως το τελικό προϊόν εξαρτιόταν από την ποσότητα του προστιθέμενου τσίπουρου [27].

Έχει αναφερθεί επίσης, η χρησιμοποίηση του τσίπουρου ως υπόστρωμα για την παραγωγή κυτταρικής πρωτεΐνης και κυτταρινασών από μύκητες [28]. Μια άλλη διαφορετική προσέγγιση στην αξιοποίηση του παραπροϊόντος αυτού είναι η αναερόβια χώνευσή του για παραγωγή μεθανίου [29]. Ωστόσο, οι περισσότερες από τις έρευνες που αφορούν την αξιοποίηση παραπροϊόντων από βιομηχανίες

μεταποίησης τομάτας, υποστηρίζουν τη δυνατότητα ανάκτησης πολύτιμων χημικών ουσιών από αυτά, όπως για παράδειγμα φαινόλες, λυκοπένιο και ασκορβικό οξύ, με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων απομόνωσης για την παραλαβή τους [2, 3, 7].

Συγκεκριμένα, από σχετικές μελέτες για τις ευεργετικές ιδιότητες της τομάτας, έχει προκύψει ότι το δέρμα και οι σπόροι της αποτελούν μια πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά συστατικά και η ενσωμάτωση του τμήματος του δέρματος και των σπόρων του φρούτου κατά την κατανάλωση ή την επεξεργασία, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της τάξης του 40-53% όλων των κύριων αντιοξειδωτικών στο τελικό προς κατανάλωση προϊόν. Η ζήτηση των καταναλωτών για υγιεινά προϊόντα διατροφής προσφέρει την ευκαιρία να αναπτυχθούν τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά και βιοδραστικά συστατικά ως νέα λειτουργικά τρόφιμα. Με την υιοθέτηση μικρών αλλαγών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, η αντιοξειδωτική και θρεπτική σύνθεση των τελικών προϊόντων μπορεί να αυξηθεί και ένα πολύτιμο απόθεμα αντιοξειδωτικών μπορεί να αξιοποιηθεί στον βέλτιστο βαθμό [30].

Έτσι, η ανακύκλωση των παραπροϊόντων επεξεργασίας και ειδικότερα του τσίπουρο τομάτας, παρουσιάζει σημαντικά οικονομικά οφέλη για τις αντίστοιχες βιομηχανίες καθώς και οφέλη για την υγεία των καταναλωτών, που απορρέουν από τις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτά. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκχυλίσματα ή να απομονωθούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή καινοτόμων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη ότι ενώ το τσίπουρο της τομάτας αποτελεί σημαντική πηγή συστατικών υψηλής διατροφικής αξίας συχνά αντιμετωπίζεται ως απόβλητο για τις βιομηχανίες τροφίμων ή δεν αξιοποιείται στον καλύτερο δυνατό βαθμό, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθούν τρόποι αξιοποίησης και καλύτερης χρήσης του από αυτές [31].

2.1.4 Σύσταση παραπροϊόντων βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το τσίπουρο αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας μεταποίησης τομάτας. Ωστόσο η σύσταση του σε δέρμα, σπόρους και πολτό μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με την πρώτη ύλη και τις συνθήκες επεξεργασίας της εκάστοτε επιχείρησης. Με βάση κάποιους ερευνητές, τα παραπροϊόντα της τομάτας αποτελούνται από 40% πολτό ντομάτας, 27% δέρμα και το υπόλοιπο 33% είναι σπόροι. Σύμφωνα με άλλη πηγή, κατά μέσο όρο το νωπό τσίπουρο της τομάτας περιλαμβάνει 33% σπόρους, 27% δέρμα και 40% πολτό τομάτας σε κλάσματα μάζας, ενώ σε ξηρή μορφή, αποτελείται από 44% σπόρους, με το υπόλοιπο 56% να αποτελείται από πολτό και δέρμα [3, 32].

Το τσίπουρο της τομάτας αποτελεί νωπό παραπροϊόν με πολύ μεγάλο ποσοστό υγρασίας και για το λόγο αυτό συχνά απαιτείται η ξήρανση του πριν τη χρήση του για την πιο οικονομική αποθήκευση και την

αποφυγή αλλοίωσης λόγω φυσικοχημικής και μικροβιολογικής υποβάθμισης, πριν την αξιοποίηση του. Με βάση τη βιβλιογραφία το ποσοστό αυτό της υγρασίας κυμαίνεται κοντά στο 60-70% σε υγρή βάση πρώτης ύλης. Παρόμοια ή ακόμη και υψηλότερα ποσοστά για την περιεκτικότητα σε υγρασία αναφέρονται και σε άλλες μελέτες. Σύμφωνα με τον Del Valle και τους συνεργάτες του, οι διαφορές υγρασίας μεταξύ των δειγμάτων τσίπουρου ντομάτας μπορεί να οφείλονται στις συνθήκες επεξεργασίας και τις πρακτικές που εφαρμόζει η κάθε βιομηχανία [16, 17, 33, 34].

Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα τομάτας περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών φυτοχημικών ενώσεων, οι οποίες παραμένουν σχεδόν αναλλοίωτες μέχρι την απομάκρυνσή του παραπροϊόντος από τη βιομηχανία. Τα περισσότερα από αυτά τα φυτοχημικά συστατικά είναι καροτενοειδή, τοκοφερόλες, πολυφαινόλες, φαινολικά οξέα, μερικά τερπένια και στερόλες, που είναι γνωστά για την αντιοξειδωτική τους δράση και τη θετική τους επίδραση στην υγεία των ανθρώπων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές τιμές για τη σύσταση της τομάτας και των παραπροϊόντων της σε νερό, λιπίδια, βασικά καροτενοειδή και άλλες φυτοχημικές ενώσεις [33]. Οι τιμές αυτές μπορεί να είναι διαφορετικές σε άλλες βιβλιογραφίες, καθώς εξαρτώνται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, από την ποικιλία της τομάτας, τη μέθοδο καλλιέργειάς της, την περίοδο συγκομιδής της και τις μεθόδους επεξεργασίας από τις βιομηχανίες.

Πίνακας 1: Σύσταση της τομάτας και των παραπροϊόντων της σε νερό, λιπίδια και άλλες βασικές βιοδραστικές ενώσεις

<i>Συστατικό</i>	<i>Παραπροϊόντα</i>	<i>Σύνολο Τομάτας</i>
<i>Περιεκτικότητα σε νερό (g/kg)</i>	738.5	946.90
<i>Περιεκτικότητα σε λιπίδια (g/kg ξ.β.)</i>	68.8	31.40
<i>Καροτενοειδή (mg/kg ξ.β.)</i>	563.5	1099.30
<i>Λυκοπένιο</i>	413.7	1013.20
<i>β-καροτένιο</i>	149.8	86.10
<i>Τοκοφερόλες (mg/kg ξ.β.)</i>	177.93	92.62
<i>Στερόλες (mg/kg ξ.β.)</i>	833.5	208.02
<i>Τερπένια (mg/kg ξ.β.)</i>	312.2	89.70
<i>Φλαβονοειδή (mg/kg ξ.β.)</i>	378.7	51.8

Από τον Πίνακα 1 παρατηρείται ότι από το λυκοπένιο που υπάρχει στο σύνολο του φρούτου της τομάτας, μια πολύ σημαντική ποσότητα (413.7 mg/kg ξ.β) εντοπίζεται στα παραπροϊόντα που παράγονται από τις βιομηχανίες. Έτσι δεδομένου ότι όλη αυτή η ποσότητα λυκοπενίου που εντοπίζεται στα παραπροϊόντα δεν αξιοποιείται επαρκώς από τις βιομηχανίες και καταλήγει κυρίως ως ζωοτροφή, αξίζει να διερευνηθούν τρόποι ανάκτησης του από αυτά για την καλύτερη χρήση του [33].

Άλλα καροτενοειδή που υπάρχουν στα παραπροϊόντα του δέρματος και των σπόρων είναι η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, το α-καροτένιο και το cis-β-καροτένιο. Ωστόσο από όλα τα καροτενοειδή, μεγαλύτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το λυκοπένιο. Συγκεκριμένα από τη χωριστή ανάλυση των παραπροϊόντων (δέρματος και σπόρων) σε καροτενοειδή, προκύπτει ότι το δέρμα της τομάτας αποτελεί την πιο πλούσια πηγή λυκοπενίου από το σύνολο του φρούτου, ενώ έχει αποδειχθεί ότι περιέχει και σημαντικές ποσότητες λουτεΐνης, β-καροτενίου και cis-β-καροτένιο. Αντίθετα το α-καροτένιο είναι ανύπαρκτο στο δέρμα της τομάτας, ενώ πολύ μικρή ποσότητα του εντοπίζεται στους σπόρους. Όλα τα υπόλοιπα καροτενοειδή εμφανίζουν περίπου δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δέρμα της τομάτας από ότι στους σπόρους. Συνεπώς προκύπτει ότι το παραπροϊόν του δέρματος παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανάκτηση του λυκοπενίου από όλα τα υπόλοιπα παραπροϊόντα [16, 30].

Τα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λυκοπενίου, συνολικών φαινολικών, ολικών φλαβονοειδών, ασκορβικού οξέος και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στο κλάσμα του δέρματος και των σπόρων σε σύγκριση με το σύνολο της τομάτας επιβεβαιώνονται και από πλήθος άλλων μελετών. Συγκεκριμένα για το σύνολο του παραπροϊόντος έχει υπολογισθεί ότι το κλάσμα του δέρματος και των σπόρων της τομάτας συνεισφέρουν κατά μέσο όρο σε ποσοστό 48% στο συνολικό λυκοπένιο, 53% στα συνολικά φαινολικά, 52% στα συνολικά φλαβονοειδή, 43% στο ολικό ασκορβικό οξύ και 52% στη συνολική αντιοξειδωτική δράση που υπάρχει στις τομάτες. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η απομάκρυνση του δέρματος και των σπόρων της τομάτας κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος και της επεξεργασίας στο σπίτι και τις αντίστοιχες βιομηχανίες, οδηγεί σε σημαντική απώλεια των κυριότερων αντιοξειδωτικών για τον άνθρωπο. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να γίνει αξιοποίηση αυτών των παραπροϊόντων με πολλαπλά οφέλη για την υγεία των καταναλωτών [30].

Σε ότι αφορά την ορυκτολογική σύσταση των παραπροϊόντων τομάτας, έχει μετρηθεί ότι το δέρμα είναι κυρίως πλούσιο σε νάτριο από μακροστοιχεία και σίδηρο από μικροστοιχεία με συγκεντρώσεις 83.8 g/kg και 75.5 mg/kg σε ξηρή βάση αντίστοιχα, ενώ στους σπόρους το κύριο μακροστοιχείο είναι το κάλιο με 15.3 g/kg σε ξηρή βάση και το βασικό μικροστοιχείο ο σίδηρος με 242.6 mg/kg ξηρού παραπροϊόντος [16].

Οι αντιοξειδωτικές και λοιπές ευεργετικές ιδιότητες των βιοδραστικών συστατικών που έχουν προσδιοριστεί στην τομάτα και τα παραπροϊόντα της, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία ως πρώτη ύλη για την παραγωγή λειτουργικών τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και θρεπτικά συστατικά. Ως εκ τούτου, δεδομένου ότι τα παραπροϊόντα τομάτας αποτελούν βιολογικά υλικά και με βάση την τάση για βιωσιμότητα και ανακύκλωση ή επαναχρησιμοποίηση που επικρατεί τα τελευταία χρόνια, τα συστατικά προστιθέμενης αξίας που περιέχουν θα μπορούσαν είτε να ανακτηθούν και να απομονωθούν με σκοπό τη χρήση τους ως φυσικά αντιοξειδωτικά για τη διαμόρφωση λειτουργικών τροφίμων, είτε να χρησιμεύσουν ως πρόσθετα στα προϊόντα τροφίμων με σκοπό να επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής τους [33].

Με βάση τα παραπάνω, αν ληφθούν υπόψη τα δεδομένα για την καλλιέργεια και την επεξεργασία τομάτας στην Δυτική Ελλάδα -όπου και βρίσκονται οι μεγαλύτερες μονάδες επεξεργασίας τομάτας στη χώρα- σύμφωνα με τα οποία επεξεργάζονται κάθε χρόνο κατά μέσο όρο 80,000 τόνοι τομάτας, υπολογίζεται ότι από αυτούς τους τόνους μπορούν να εξαχθούν 259.64 kg λυκοπένιο, με βάση τα στοιχεία και τη σύσταση των παραπροϊόντων σε λυκοπένιο που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 1. Οι ποσότητες αυτές δεν είναι πλήρως ανακτήσιμες και εξαρτώνται από την απόδοση της επιλεγόμενης εκχύλισης και τις συνθήκες. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η αξιοποίηση των παραπροϊόντων αυτών, όχι μόνο μέσω της ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών αλλά και προς την παραγωγή νέων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, αποτελεί ιδανική εναλλακτική επιλογή από τη σημερινή πρακτική όπου τα εν λόγω προϊόντα καταλήγουν συνήθως ως ζωοτροφές και λιπάσματα [35].

2.2 Βιοδραστικά συστατικά στη τομάτα

Η τομάτα αναγνωρίζεται παγκοσμίως ως ένα φρούτο που προάγει την υγεία. Τα οφέλη του συνδέονται κυρίως με την πλούσια σύνθεση του σε βιοδραστικές ενώσεις όπως το λυκοπένιο, το ασκορβικό οξύ, οι τοκοφερόλες και οι πολυφαινόλες [36]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση αυτών των βιοδραστικών ενώσεων στη φρέσκια ντομάτα, εξαρτάται από παράγοντες όπως η καλλιέργεια [37], η ποικιλία του εδάφους και οι κλιματικές συνθήκες, ο βαθμός ωρίμανσης και οι συνθήκες αποθήκευσης μετά τη συγκομιδή [38, 39]. Άλλοι παράγοντες που αναμένεται να έχουν μεγάλη επίδραση στην θρεπτική αξία των καρπών τομάτας είναι το κόψιμο και η επεξεργασία. Ο πρώτος μπορεί να οφείλεται σε μια άνιση κατανομή των θρεπτικών ουσιών στον καρπό, και ο τελευταίος λόγω της θρεπτικής αποικοδόμησης που επάγεται από τη θερμική επεξεργασία [40].

Ωστόσο, η πιο σημαντική βιοδραστική ένωση που συνδέεται με τις ντομάτες και εντοπίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το λυκοπένιο, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό καροτενοειδές που πιστεύεται

ότι έχει πολλές ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο. Μία από αυτές είναι ότι προστατεύει από τον καρκίνο του προστάτη και άλλες μορφές καρκίνου, αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Η τομάτα περιέχει ακόμη σημαντικές ποσότητες από άλλα βιοδραστικά συστατικά, όπως φαινολικές ενώσεις, των οποίων οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες πιστεύεται ότι προστατεύουν από θρομβώσεις και ογκογένεση, βιταμίνη C, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με ουσιαστικό ρόλο κατά του οξειδωτικού στρες και β-καροτένιο ή προβιταμίνη A, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην όραση, την επούλωση τραυμάτων, την αύξηση της αντίστασης του οργανισμού σε τοξίνες και την πρόληψη μορφών καρκίνου [40].

2.2.1 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια κατηγορία φυτοθεραπευτικών συστατικών ("φυτικά χημικά") που βρίσκονται στα κύτταρα μιας ευρείας ποικιλίας φυτών, φυκών και βακτηρίων και βοηθούν στην απορρόφηση ηλιακής ενέργειας από τα φυτά για τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης. Διαθέτουν επίσης μια σημαντική αντιοξειδωτική λειτουργία απενεργοποίησης των ελεύθερων ριζών, η οποία δρα με απλά/μονήρη άτομα οξυγόνου που μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα αντιδρώντας με άλλα μόρια, σύμφωνα με σχετικές μελέτες. Τα καροτενοειδή λειτουργούν επίσης ως αντιοξειδωτικά στο ανθρώπινο σώμα και συμβάλουν στην καταπολέμηση του καρκίνου και άλλων σημαντικών ασθενειών. Έχουν επίσης αντιφλεγμονώδη οφέλη καθώς και οφέλη για το ανοσοποιητικό σύστημα και μερικές φορές συνδέονται με την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων [41].

Υπάρχουν περισσότερα από 600 είδη καροτενοειδών. Τα φρούτα και τα λαχανικά παρέχουν τα περισσότερα από τα 40 έως 50 καροτενοειδή που βρίσκονται στην ανθρώπινη διατροφή [42]. Τα πιο συνηθισμένα από αυτά στη δυτική διατροφή και τα πιο μελετημένα είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο, η β-κρυπτοξανθίνη, η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το λυκοπένιο, τα οποία αποτελούν και τα πιο κοινά διατροφικά καροτενοειδή [43]. Η ετήσια παραγωγή των καροτενοειδών στη φύση εκτιμάται ότι ανέρχεται στην ποσότητα των 108 τόνων [11]. Τα ζώα και οι άνθρωποι δεν μπορούν να συνθέσουν καροτενοειδή από μόνοι τους και για το λόγο αυτό εξαρτώνται αποκλειστικά από τη διατροφή για την πρόσληψη τους [44].

Κατηγορίες

Τα καροτενοειδή ταξινομούνται σε δύο ευρείες κατηγορίες με βάση τη χημική τους σύσταση, τα *καροτένια* και τις *ξανθοφύλλες*. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων είναι ότι οι ξανθοφύλλες περιέχουν οξυγόνο στην αλυσίδα τους, ενώ τα καροτένια όχι. Το β-καροτένιο, το α-καροτένιο και το λυκοπένιο είναι σημαντικά μέλη της ομάδας των καροτένιων που περιλαμβάνει καροτενοειδή που αποτελούνται μόνο από άτομα άνθρακα και υδρογόνου (υδρογονάνθρακες). Η ζεαξανθίνη, η λουτεΐνη, η α- και β-

κρυπτοξανθίνη, η κανθαξανθίνη και η ασταξανθίνη είναι σημαντικές ξανθοφύλλες και άρα φέρουν τουλάχιστον ένα άτομα οξυγόνου στην αλυσίδα τους [44]. Επίσης, οι δύο κατηγορίες απορροφούν διαφορετικά μήκη κύματος φωτός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας φωτοσύνθεσης του φυτού που τα περιέχει, με αποτέλεσμα οι ξανθοφύλλες να είναι πιο κίτρινες ενώ τα καροτένια έχουν πορτοκαλί απόχρωση.

Διατροφικά, υπάρχει μια άλλη, ενδεχομένως πιο χρήσιμη, διάκριση των καροτενοειδών σε αυτά με *προβιταμίνη Α* και αυτά *χωρίς προβιταμίνη Α*. Τα καροτενοειδή *προβιταμίνης Α* μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη Α (ρετινόλη) στο έντερο ή στο ήπαρ σε αντίθεση με την άλλη κατηγορία. Η βιταμίνη Α αποτελεί σημαντικό συστατικό της ανθρώπινης υγείας και βοηθά στη διατήρηση της υγείας των ματιών, την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη είναι καροτενοειδή *προβιταμίνης Α* και είναι απαραίτητα για την όραση και τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη, ενώ η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το λυκοπένιο δεν είναι. Από τα 600 καροτενοειδή προερχόμενα από φυσικές πηγές που έχουν αναλυθεί, λιγότερα από το 10% χρησιμεύουν ως πρόδρομοι της βιταμίνης Α [43, 45].

Στην Εικόνα 2, φαίνεται σχηματικά η κατηγοριοποίηση των καροτενοειδών στις δύο βασικές κατηγορίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

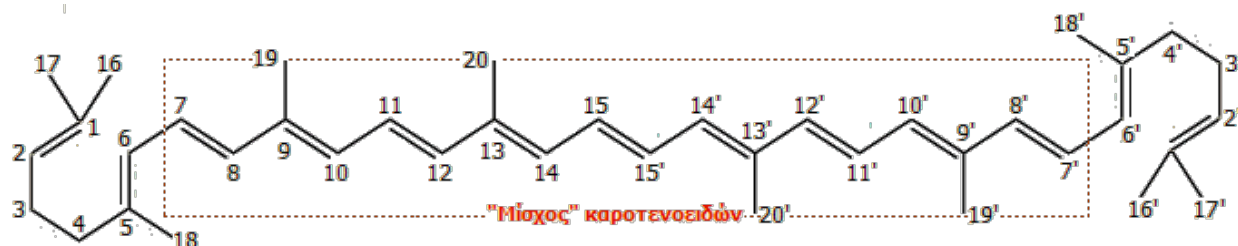


Εικόνα 2: Κατηγορίες ταξινόμησης των καροτενοειδών

Δομή-Διαμορφώσεις

Τα περισσότερα από τα καροτενοειδή αποτελούνται από μια κεντρική αλυσίδα άνθρακα με εναλλασσόμενους μονούς και διπλούς δεσμούς και φέρουν διαφορετικές κυκλικές ή ακυκλικές τελικές

ομάδες. Οι κυριότερες βιοχημικές λειτουργίες τους καθορίζονται από το εκτεταμένο σύστημα συζευγμένων διπλών δεσμών που είναι επίσης υπεύθυνο για το χρώμα τους. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η βασική μορφή ενός καροτενοειδούς για το μόριο του λυκοπενίου. Όπως προκύπτει και από την εικόνα, ο «Μίσχος» έχει την ίδια μορφή για όλα τα καροτενοειδή και αυτό που αλλάζει είναι οι τελικές ομάδες στο μόριο.



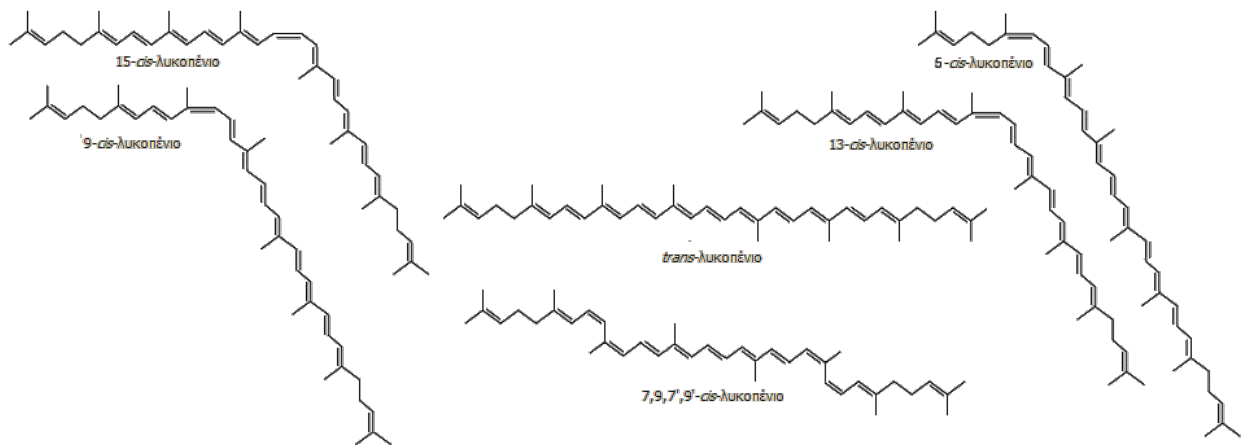
Εικόνα 3: Ειδική αρίθμηση ανθράκων που εφαρμόζεται στα καροτενοειδή για το μόριο του λυκοπενίου. [46]

Τα καροτενοειδή είναι δυνατόν να εμφανιστούν ως μια σειρά cis/trans (E/Z) διαμορφώσεων, ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών τους. Σε ομοιογενή διαλύματα, τα καροτενοειδή τείνουν να ισομερίζονται και να σχηματίζουν ένα μίγμα μονο- και πολυ-cis ισομερών που συνυπάρχουν με την all-trans μορφή τους. Η μορφή του ισομερούς καθορίζεται από ενεργειακούς και στερεοχημικούς παράγοντες. Σε γενικές γραμμές, η all-trans μορφή είναι θερμοδυναμικώς πιο σταθερή και κυρίαρχη στη φύση, ωστόσο πολλά cis ισομερή καροτενοειδών συναντώνται στο αίμα και τους ιστούς [44, 47].

Το λυκοπένιο στις τομάτες και τα προϊόντα αυτής εντοπίζεται κυρίως στην all-trans μορφή του, καταλαμβάνοντας συνολικά το 35-96% της συνολικής περιεκτικότητας σε λυκοπένιο, ενώ τα επίπεδα του cis-λυκοπενίου είναι αρκετά πιο χαμηλά και φτάνουν το 1-22% της συνολικής περιεκτικότητας του λυκοπενίου [48]. Η διαμόρφωση με την οποία θα εμφανιστεί το λυκοπένιο σε ένα τρόφιμο ή προϊόν, εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες και τεχνικές επεξεργασίας και διαχείρισής του.

Συνεπώς για τη χρήση του ως πρόσθετο σε τρόφιμα, το λυκοπένιο έχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί στην πιο σταθερή, trans μορφή του. Αν και η λήψη του, στη φυσική του μορφή (trans-lycopene), παρουσιάζει χαμηλή απορρόφηση από τον ανθρώπινο οργανισμό, ωστόσο μελέτες δείχνουν ότι η θερμική επεξεργασία των τοματών και των προϊόντων τους βελτιώνει τη βιοδιαθεσιμότητα και άρα την απορρόφηση του λυκοπενίου από το ανθρώπινο σώμα. Η θερμική επεξεργασία διασπά το τοίχωμα του κυττάρου, επιτρέποντας την εκχύλιση του συστατικού από τους χρωμοπλάστες και την απορρόφηση του από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς του κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων, γίνεται με τη μετατροπή του all-trans-λυκοπενίου στη cis διαμόρφωσή του [49].

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται σχηματικά η μορφή των διαφόρων γεωμετρικών ισομερών του λυκοπενίου που μπορούν να εντοπισθούν στη φύση.



Εικόνα 4: Γεωμετρικά ισομερή του λυκοπενίου [11]

Πηγές

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα πιο διαδεδομένα καροτενοειδή στη διατροφή του ανθρώπου είναι το λυκοπένιο, το α -καροτένιο, το β -καροτένιο, η β -κρυπτοξανθίνη, η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη. Τα τρόφιμα που περιέχουν καροτενοειδή είναι συνήθως κόκκινα, κίτρινα ή πορτοκαλί, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Έχει βρεθεί ότι τα καρότα, οι γλυκοπατάτες, η παπάγια, , το μάνγκο, το σπανάκι, το καλαμπόκι, οι τομάτες, οι πιπεριές και τα πορτοκάλια είναι από τα φρούτα και τα λαχανικά στα οποία μπορούν να βρεθούν καροτενοειδή [43].

Τα καροτενοειδή της τομάτας:

Το ορατό κόκκινο χρώμα του καρπού της τομάτας οφείλεται κατά κύριο λόγο στο λυκοπένιο που αποτελεί συνήθως το 80-90 % του συνόλου των καροτενοειδών που περιέχει. Ο καρπός της τομάτας περιέχει επίσης άχρωμες πρόδρομες ουσίες καροτενοειδών, όπως φυτοένιο και φυτοφλουένιο (15-30 % επί του συνόλου των καροτενοειδών), ξανθοφύλλες (ελεύθερη και εστεροποιημένη, σε ποσοστό 6 %) και μικρές ποσότητες καροτενίων, όπως β -καροτένιο, γ -καροτένιο, ζ -καροτένιο, α -καροτένιο και δ -καροτένιο [11].

Στον Πίνακα 2 αναλύεται η σύσταση τομάτας και προϊόντων αυτής σε καροτενοειδή σε mg/100g σε υγρή βάση, όπως έχουν προκύψει από σχετικές μελέτες [43, 50]. Οι τιμές αυτές αποτελούν μια μέση τιμή των τιμών που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, δεδομένου ότι οι περιεκτικότητες αυτές μπορεί να μεταβάλλονται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποικιλία της πρώτης ύλης και οι συνθήκες και πρακτικές επεξεργασίας που εφαρμόζει η κάθε επιχείρησης.

Πίνακας 2: Σύσταση τομάτας και προϊόντων αυτής σε καροτενοειδή σε mg/100g σε νωπή βάση

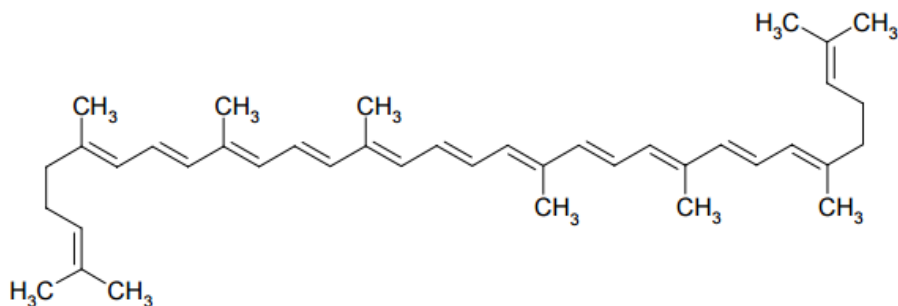
Καροτενοειδή	Ολόκληρες τομάτες	Τοματοπολτός	Πουρές τομάτας	Σάλτσα	Χυμός τομάτας	Κέτσαπ
Λυκοπένιο (mg/100g)	9.27	55.45	16.67	17.98	10.77	17.23
β-καροτένιο (mg/100g)	0.23	1.27	0.41	0.45	0.27	0.59
γ-καροτένιο (mg/100g)	1.50	9.98	2.94	3.17	1.74	3.03
ζ-καροτένιο (mg/100g)	0.21	0.84	0.25	0.29	0.18	0.33
Λουτεΐνη (mg/100g)	0.08	0.34	0.09	<0.05	0.06	≈0
Φυτοένιο (mg/100g)	1.86	8.36	2.40	2.95	1.90	3.39
Φυτοφλουένιο (mg/100g)	0.82	3.63	1.08	1.27	0.83	1.54

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω και παρατηρείται και από τον Πίνακα 2, το πιο σημαντικό καροτενοειδές στην τομάτα, τα προϊόντα αλλά και τα παραπροϊόντα αυτής, είναι το λυκοπένιο, το οποίο και αναλύεται περαιτέρω στη συνέχεια.

Λυκοπένιο

Το λυκοπένιο είναι ένα πολύ σημαντικό βιοδραστικό συστατικό που βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά και ειδικότερα σε μεγάλες ποσότητες στις τομάτες. Αποτελεί ένα από τα πιο βασικά και μελετημένα καροτενοειδή που ανήκει στην ομάδα των καροτενίων. Η πρόσληψη του, είτε φυσικά είτε ως συμπλήρωμα, έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει σημαντικά στην πρόληψη κάποιων σοβαρών ασθενειών και συσχετίζεται με τη μείωση της ευαισθησίας σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμβάλλοντας παράλληλα στη γενική υγεία [51].

Η χημική ονομασία της all-trans μορφής του, είναι (all-E)-2,6,10,14,19,23,27,31-octamethyl-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-dotriacontatridecaene. Άλλες κοινές ονομασίες του περιλαμβάνουν Ψ, Ψ-καροτένιο, all-trans-λυκοπένιο και (all-E) –λυκοπένιο [52]. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται η δομή της all-trans μορφής του.



Εικόνα 5: All-trans μορφή του λυκοπενίου

Το λυκοπένιο αποτελεί ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που συντίθεται από πολλά φυτά και μικροοργανισμούς αλλά όχι από τα ζώα και τους ανθρώπους. Χρησιμεύει ως χρωστική ουσία και προστατεύει από τις δράσεις του οξυγόνου και του φωτός. Η κόκκινη αυτή χρωστική δεν έχει δράση προβιταμίνης Α, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ενώ είναι υπεύθυνη για το χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών [53].

Ένα από αυτά τα φρούτα, που οφείλει το χρώμα του στο λυκοπένιο και αποτελεί σημαντική πηγή πρόσληψής του, είναι και η τομάτα, καθώς και τα προϊόντα αυτής. Συσκευασμένα τρόφιμα όπως κέτσαπ, χυμός τομάτας και πάστα τομάτας αποτελούν πηγή υψηλής ποιότητας λυκοπενίου. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λυκοπένιο ή η ύπαρξη υψηλών επιπέδων της βιοδραστικής αυτής ένωσης στο σώμα, θα μπορούσαν να συμβάλουν στη μείωση του κινδύνου ορισμένων ασθενειών καθώς και στη γενική ευημερία του ανθρώπου [51].

Αυτό που καθιστά σημαντικό το λυκοπένιο είναι πρώτα από όλα η μοριακή του δομή, αφού η ποιότητα ενός βιοδραστικού συστατικού εξαρτάται κυρίως από τη διαμόρφωση και τη σταθερότητα του μορίου του, καθώς και από την ικανότητά του να σχηματίζει πολλούς σταθερούς χημικούς δεσμούς. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, το μόριο του λυκοπενίου αποτελείται από μία μακριά και σταθερή άκυκλη αλυσίδα, με 13 διπλούς δεσμούς –τους περισσότερους από κάθε άλλο μόριο της οικογένειας των καροτενοειδών- από τους οποίους οι 11 είναι συζευγμένοι. Η μοναδική του δομή, του δίνει την ικανότητα να αντιδρά με τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα, προστατεύοντας το έτσι από πιθανές βλάβες που μπορούν να προκληθούν από την οξείδωση. Έτσι, λόγω της παρουσίας των συζευγμένων αυτών διπλών δεσμών στη δομή του, το λυκοπένιο έχει αναφερθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση και θεωρείται ανώτερο από άλλα καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη ή το β-καροτένιο. Επιπλέον, μπορεί ακόμη να εμφανίζει άλλες φυσιολογικές δραστηριότητες όπως καταστολή του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, με πολλά οφέλη για την υγεία των ανθρώπων όπως αναφέρθηκε

και παραπάνω [49]. Το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου μπορεί να απορροφήσει το λυκοπένιο, αλλά προκειμένου να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική απορρόφησή του, θα πρέπει να καταναλωθεί σε συνδυασμό με άλλα υγιή έλαια, φυσικά δηλαδή λίπη, όπως το αβοκάντο, το ελαιόλαδο και οι ξηροί καρποί, που βοηθούν τη διαδικασία της πέψης [51].

2.3 Ανάκτηση και ανάλυση Λυκοπενίου

Κατά καιρούς, πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την ανάκτηση και απομόνωση διαφόρων καροτενοειδών από φρούτα και λαχανικά και διαφορετικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την παραλαβή τους. Με την εξέλιξη των ενόργανων μεθόδων, η ανάλυση των καροτενοειδών γίνεται πιο ακριβής και αξιόπιστη, καθώς οι μέθοδοι παραλαβής τους εξελίσσονται.

Συγκεκριμένα για το λυκοπένιο, οι μέθοδοι ανάκτησης και ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε μερικά βασικά βήματα, τα οποία είναι:

1. η δειγματοληψία και προετοιμασία του δείγματος,
2. η εκχύλιση του επιθυμητού συστατικού,
3. η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση του και αν κριθεί απαραίτητο η απομόνωσή του.

Η διεργασία και οι συνθήκες που επιλέγονται σε κάθε βήμα, διαφοροποιούν την εκάστοτε μέθοδο, καθώς και τα αποτελέσματα που προκύπτουν.

Το πιο βασικό κατά την επεξεργασία ενός δείγματος για την παραλαβή του λυκοπενίου, είναι η αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών και έντονου φωτισμού, που μπορούν να οξειδώσουν τη βιοδραστική ένωση που επιθυμείται να εκχυλιστεί. Για το λόγο αυτό τα πειράματα συνίστανται να γίνονται υπό αμυδρό φωτισμό, τα σκεύη να καλύπτονται με αλουμινοχαρτο και οι θερμοκρασίες κατά την εκχύλιση ή την εξάτμιση των διαλυτών, να μην ξεπερνούν τους 50°C.

Παρακάτω αναλύονται τα βασικά στάδια που ακολουθούνται για την παραλαβή και την ανάλυση εκχυλίσματος λυκοπενίου με «φιλικές» προς το περιβάλλον μεθόδους.

2.3.1 Εκχύλιση Λυκοπενίου

Από τις μελέτες που έχουν γίνει, προκύπτει ότι η καλύτερη μέθοδος για την απομόνωση των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στα παραπροϊόντα της τομάτας είναι η εκχύλιση με κατάλληλους διαλύτες. Δεδομένου ότι το λυκοπένιο, όπως και τα περισσότερα καροτενοειδή που βρίσκονται στην τομάτα και τα παραπροϊόντα της, είναι υδρόφοβες ενώσεις, οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση

τους είναι οργανικοί. Συγκεκριμένα για τα νωπά ή επεξεργασμένα τρόφιμα προτιμώνται υδατο-αναμίξιμοι οργανικοί διαλύτες, ενώ για αποξηραμένα ή λυοφιλιωμένα (freeze-dried) δείγματα χρησιμοποιούνται μη υδατο-αναμίξιμοι οργανικοί διαλύτες [11]. Η επιλογή του βέλτιστου διαλύτη για την εκχύλιση είναι πολλές φορές δύσκολη και εξαρτάται από το είδος του δείγματος και τη σύσταση του στο επιθυμητό συστατικό.

Σε διάφορες βιβλιογραφίες έχει αναφερθεί η χρήση πολλών συστημάτων διαλυτών για την εκχύλιση καρροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο. Τέτοια παραδείγματα είναι η χρήση συστήματος αιθανόλης με εξάνιο σε αναλογία 4:3 (v/v), ακετόνης με εξάνιο 4:6 κατά όγκο (v/v), ή η χρήση καθαρού οξικού αιθυλεστέρα, με πολύ καλές αποδόσεις ως προς το λυκοπένιο [11, 49, 54]. Ωστόσο όλοι οι παραπάνω οργανικοί διαλύτες, δημιουργούν προβλήματα στη διαχείριση τους, ενώ μερικοί από αυτούς είναι τοξικοί και όλοι θεωρούνται ακατάλληλοι για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Δημιουργήθηκε έτσι η ανάγκη σχεδιασμού μιας νέας διεργασίας εκχύλισης, με τη χρήση ενός «πράσινου», μη τοξικού και ασφαλούς για χρήση στα τρόφιμα διαλύτη, προκειμένου το εκχύλισμα που προκύπτει να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα στη βιομηχανία τροφίμων. Αν και η εκχύλιση των καρροτενοειδών για τη βιομηχανία τροφίμων, σαν διεργασία μπορεί να παρουσιάζει δυσκολίες, καθώς οι επιλογές μη τοξικών και ασφαλών για το περιβάλλον διαλυτών είναι πολύ περιορισμένες, ωστόσο η παραλαβή του λυκοπενίου από τα παραπροϊόντα της τομάτας μπορεί να μειώσει το συνολικό κόστος, προσθέτοντας αξία σε ένα αναξιποίητο παραπροϊόν με πολλές δυνατότητες εκμετάλλευσης [55].

Εκτός από την επιλογή διαλυτών, τα τελευταία χρόνια, εμφανίζεται όλο και πιο επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων τεχνικών παραλαβής αντιοξειδωτικών, όπως είναι το λυκοπένιο, από φυσικές πρώτες ύλες, οι οποίες θα μειώσουν σημαντικά το χρόνο εκχύλισης, καθώς και τον όγκο του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, με αποτέλεσμα η διεργασία να γίνει οικονομικά πιο επικερδής για τις βιομηχανίες που την εφαρμόζουν. Έτσι αναπτύχθηκαν δύο προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης με σημαντικά πλεονεκτήματα, η εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction - MAE) και η εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction - UAE). Οι δύο αυτές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν χωριστά ή συνδυαστικά (Ultrasound/Microwave Assisted Extraction - UMAE) για την εκχύλιση επιθυμητών ουσιών από φυσικά προϊόντα και αντικαθιστούν με τον καιρό τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν. Ένα από τα βασικά πλεονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης που απαιτείται και η μικρή επίδραση της θερμοκρασίας και της υδρόλυσης στα δείγματα. Ωστόσο, οι παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση Soxhlet και η συμβατική εκχύλιση με ανάδευση, εξακολουθούν να εφαρμόζονται για την παραλαβή αντιοξειδωτικών σε κάποιες

περιπτώσεις, συνήθως συγκριτικά ή δοκιμαστικά, καθώς είναι αρκετά πιο χρονοβόρες και μη οικονομικά συμφέρουσες για τη βιομηχανία.

2.3.1.1 Μέθοδοι Εκχύλισης

Η εκχύλιση αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος παραλαβής βιοδραστικών ενώσεων από στερεή ή υγρή πρώτη ύλη, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει κάποια διαφορετική φυσική ή χημική ιδιότητα ανάμεσα στο προσδιοριζόμενο συστατικό και τα άλλα συνυπάρχοντα στο δείγμα συστατικά. Για την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου κατά την εκχύλιση, δίνεται έμφαση εκτός των άλλων και στην απόδοση της κάθε μιας από αυτές, καθώς και την καθαρότητα και τη σταθερότητα των παραλαμβανόμενων συστατικών.

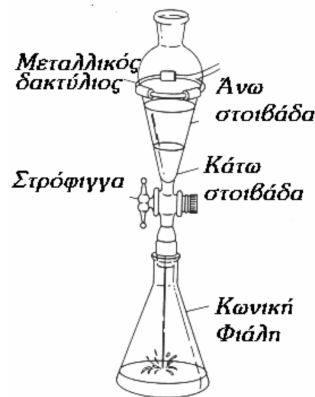
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η εκχύλιση οργανικών ουσιών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Για το λόγο αυτό προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης, συνήθως εφαρμόζονται για την παραλαβή καροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο, από στερεά και ξηρά παραπροϊόντα τομάτας. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι εκχύλισης, παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω και είναι:

- I. η απλή συμβατική μέθοδος εκχύλισης (CE),
 - II. η εκχύλιση Soxhlet (SE),
 - III. η υποβοηθούμενη με μικροκύματα μέθοδος εκχύλιση (MAE),
 - IV. η υποβοηθούμενη με υπερήχους μέθοδος εκχύλιση (UAE),
- καθώς και ο συνδυασμός των δύο τελευταίων (UMAЕ) [56-58].

I. Απλή συμβατική μέθοδος (Conventional Extraction-CE)

Η πιο απλή μέθοδος εκχύλισης περιλαμβάνει την επαφή και ανάδευση της στερεής ουσίας με τον κατάλληλο διαλύτη και την παραλαβή στη συνέχεια του ολικού εκχυλίσματος με φυγοκέντρηση και απόχυση ή διήθηση. Εναλλακτικά μπορεί η ανάδευση να αποφευχθεί και το μίγμα της στερεής ουσίας με τον διαλύτη να παραμείνει πωματισμένο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ή να προτιμηθεί η ανακίνηση του περιέκτη της εκχύλισης. Γενικότερα η ανάδευση του μίγματος που εκχυλίζεται επιταχύνει τη διαδικασία και ευνοεί τη διάχυση των εκχυλισμένων συστατικών, καθώς εξασφαλίζει την καλύτερη διασπορά του υλικού στον διαλύτη. Συνήθως κατά τον απλό αυτό τρόπο εκχύλισης, χρησιμοποιείται και η θέρμανση για να επιταχύνει και να υποβοηθήσει τη διεργασία, η οποία θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλές τιμές θερμοκρασίας για την περίπτωση εκχύλισης θερμοευαίσθητων βιοδραστικών, όπως είναι

το λυκοπένιο. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Ανάλογα με το είδος του διαλύτη και της εκχυλιζόμενης ουσίας και την επιθυμητή απόδοση, διαφοροποιείται και ο χρόνος της εκχύλισης, ο οποίος μπορεί να ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες. Η συμβατική μέθοδος εκχύλισης πραγματοποιείται συνήθως σε διαχωριστικό χωνί, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, από το οποίο μετά από ανακίνηση, διαχωρίζεται η υδατική από την οργανική στιβάδα που περιέχει την εκχυλιζόμενη ουσία.



Εικόνα 6: Διαχωριστικό χωνί για απλή εκχύλιση [57]

Στα βασικότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, περιλαμβάνονται το γεγονός ότι αποτελεί μία απλή και γρήγορη μέθοδος, ευέλικτη ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα, που εφαρμόζεται, τόσο σε δείγματα με μικρές όσο και σε δείγματα με μεγάλες συγκεντρώσεις μίας ουσίας [59].

Ωστόσο, ο τρόπος αυτός εκχύλισης εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα και για το λόγο αυτό τείνει να εγκαταλειφθεί τα τελευταία χρόνια. Ορισμένα από αυτά είναι η ανάγκη για μεγάλη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, με το επακόλουθο κόστος καθαρισμού και συμπύκνωσης, η πιθανή αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων συστατικών σε υψηλές θερμοκρασίες και η σταδιακή μείωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας όσο ο διαλύτης εμπλουτίζεται με την εκχυλισμένη ουσία [57].

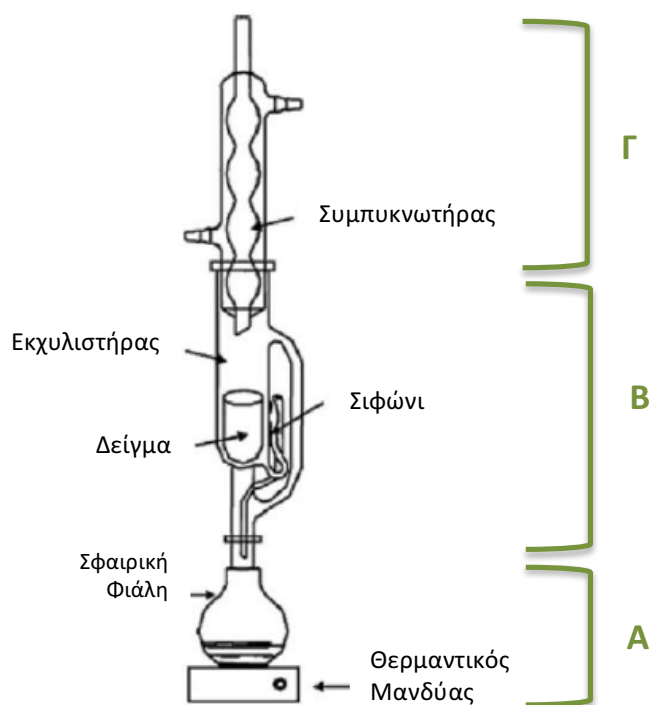
II. Εκχύλιση Soxhlet (Soxhlet Extraction-SE)

Η μέθοδος εκχύλισης με χρήση της διάταξης Soxhlet αποτελεί την κυρίαρχη τεχνική εκχύλισης συστατικών τα τελευταία χρόνια. Θεωρείται η πιο χρονοβόρα από όλες τις υπόλοιπες μεθόδους για την εκχύλιση της ίδιας ποσότητας ενός συστατικού και για το λόγο αυτό είναι πρακτικά αδύνατο να χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές. Ωστόσο αποτελεί την πλέον διαδεδομένη εργαστηριακή ή μικρής κλίμακας τεχνική εκχύλισης που υπερτερεί σε απόδοση έναντι των υπόλοιπων

εργαστηριακών τεχνικών και για το λόγο αυτό εφαρμόζεται συχνά για την αξιολόγηση άλλων μεθόδων εκχύλισης ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Η μέθοδος της επαναλαμβανόμενης εκχύλισης που γίνεται με τη συσκευή Soxhlet, χρησιμοποιείται για την παραλαβή ενός συστατικού από ένα μίγμα στερεών ουσιών με χρήση ενός οργανικού διαλύτη. Η διάταξη Soxhlet για συνεχή εκχύλιση στερεού-υγρού παρουσιάζεται στην Εικόνα 7 και αποτελείται από μία σφαιρική φιάλη (Α), έναν θάλαμο εκχύλισης (Β) και τον ψυκτήρα (Γ). Στη σφαιρική φιάλη τοποθετείται ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση, ο οποίος στη συνέχεια θερμαίνεται με θερμομανδύα μέχρι βρασμού του. Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο υποδοχέα στο θάλαμο της εκχύλισης. Όσο ο διαλύτης στη σφαιρική φιάλη θερμαίνεται, οι ατμοί του ανέρχονται μέσω πλευρικού σωλήνα προς τον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται και επαναρρέουν επί του χάρτινου υποδοχέα του στερεού δείγματος, με αποτέλεσμα να γίνεται η εκχύλιση. Σε κάποια χρονική στιγμή που ο χώρος του θαλάμου εκχύλισης (Β) έχει πληρωθεί με το διαλύτη μέχρι το ύψος του σιφωνίου, πραγματοποιείται αυτόματα σιφωνισμός. Δηλαδή, ο διαλύτης με το εκχυλισμένο πλέον στερεό συστατικό, αναρροφάται στη σφαιρική φιάλη μέσω δεύτερου πλευρικού σωλήνα σιφωνισμού. Με τον τρόπο αυτό το εκχύλισμα μεταφέρεται στην υποκείμενη σφαιρική φιάλη και ο προηγούμενος κύκλος επαναλαμβάνεται από την αρχή. Η 2^η εκχύλιση του δείγματος πραγματοποιείται αυτόματα εάν δεν διακοπεί η λειτουργία της συσκευής, καθώς ο διαλύτης επαναθερμαίνεται. Έτσι, σε κάθε κύκλο γίνεται εμπλουτισμός του διαλύτη της φιάλης με τα εκχυλιζόμενα συστατικά του στερεού δείγματος. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί πολλές φορές και να διαρκέσει πολλές ώρες, ενώ συνήθως διακόπτεται όταν παρατηρηθεί αποχρωματισμός του διαλύτη στον θάλαμο της εκχύλισης και άρα υποδηλώνεται ότι η επιθυμητή ουσία έχει πλέον συγκεντρωθεί στο εκχύλισμα που περιέχεται στη φιάλη. Μετά το τέλος της εκχύλισης η υποκείμενη σφαιρική φιάλη μεταφέρεται σε εξατμιστήρα και αφού απομακρυνθεί ο διαλύτης παραλαμβάνεται το επιθυμητό συστατικό με διάλυση του με μικρή ποσότητα νέου διαλύτη [57, 60].

Η διάταξη της συσκευής Soxhlet, όπως περιγράφεται παραπάνω, φαίνεται στην Εικόνα 7:



Εικόνα 7: Διάταξη εκχύλισης Soxhlet, όπου A: σφαιρική φιάλη, B: θάλαμος εκχύλισης και Γ: ψυκτήρας [61]

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για την εξαγωγή μη πτητικών και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων από στερεά όπως είναι και τα παραπροϊόντα διαφόρων βιομηχανιών. Η διαδικασία εκχύλισης Soxhlet εξασφαλίζει την στενή επαφή του δείγματος με τον διαλύτη της εκχύλισης και εφαρμόζεται για την απομόνωση και τη συγκέντρωση αδιάλυτων ή ελάχιστα διαλυτών στο νερό οργανικών συστατικών, όπως το λυκοπένιο [62].

Στα πλεονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet, περιλαμβάνονται η δυνατότητα συνεχής επαφής του οργανικού διαλύτη με το προς εκχύλιση στερεό και η απουσία του επόμενου σταδίου φυγοκέντρησης ή διήθησης για την απομάκρυνση του στερεού και την παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος. Ακόμη το γεγονός ότι η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές την καθιστά κατάλληλη για την παραλαβή ελάχιστα διαλυτών ουσιών. Ωστόσο η πιθανή μεγάλη χρονική διάρκεια της εκχύλισης, η ανάγκη κατανάλωσης μεγάλης ποσότητας διαλύτη και η απουσία ανάδευσης κατά την εκχύλιση αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα της. Ακόμη κατά την εφαρμογή της σε θερμοευαίσθητα συστατικά, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς, επειδή η εκχύλιση πραγματοποιείται κοντά στο σημείο ζέσεως του διαλύτη για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενδέχεται να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση αυτών των συστατικών. Για το λόγο αυτό σε τέτοιες περιπτώσεις θα πρέπει να προτιμώνται διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού [11, 56].

III. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction-MAE)

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των μικροκυμάτων ως μεθόδου εκχύλισης συστατικών κυρίως από φυτικές ύλες παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και προοπτικές. Η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (MAE), επίσης γνωστή και ως εκχύλιση με μικροκύματα, αποτελεί μία νέα τεχνική εκχύλισης, που συνδυάζει τα μικροκύματα με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης. Είναι μία μέθοδος που έχει αναπτυχθεί και εφαρμόζεται για την παραλαβή φυσικών προϊόντων και την ανάκτηση συστατικών με αντιοξειδωτική δράση, όπως καροτενοειδών και φαινολικών ενώσεων με πολικό χαρακτήρα. Σε αντίθεση με την εκχύλιση Soxhlet, που συνήθως χρειάζεται μερικές ώρες για να ολοκληρωθεί, η εκχύλιση με μικροκύματα χρειάζεται μόνο ορισμένα λεπτά [11, 63, 64].

Η MAE έχει εφαρμοσθεί επιτυχώς για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων όπως το λυκοπένιο, επιφέροντας αποδόσεις αντίστοιχες με αυτές των συμβατικών μεθόδων σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα. Οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει παραλλαγές της MAE, προκειμένου να βελτιώσουν ακόμη περισσότερο την απόδοση της και να μειώσουν τον χρόνο εκχύλισης στο ελάχιστο, διατηρώντας παράλληλα αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Τέτοιες μέθοδοι είναι η δυναμικά υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (Dynamic Microwave Assisted Extraction - DMAE) και η πεπιεσμένη υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (Pressurized Microwave Assisted Extraction - PMAE) [65, 66].

Μηχανισμός

Οι βασικές αρχές λειτουργίας της MAE είναι διαφορετικές από εκείνες των συμβατικών μεθόδων επειδή η εκχύλιση συμβαίνει ως αποτέλεσμα μεταβολών στη κυτταρική δομή του στερεού δείγματος που προκαλούνται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα. Τα μικροκύματα είναι μη ιονισμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας μεταξύ 300 MHz έως 300 GHz και μήκους κύματος 0.001-1.0 m, ενώ στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα τοποθετούνται μεταξύ των ακτινών X και της υπέρυθρης ακτινοβολίας.

Μια βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η εκχύλιση με μικροκύματα είναι η μετατροπή της ενέργειας που μεταφέρουν τα κύματα καθώς διέρχονται από ένα υλικό, σε θερμότητα, λόγω της ιονικής αγωγής και της διπολικής περιστροφής των μορίων του διαλύματος. Η πρώτη παράγει θερμότητα λόγω της αντίστασης που δημιουργείται στο διάλυμα από την κίνηση των ιόντων που περιέχει και συνεπώς είναι άμεση συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και του μεγέθους και του φορτίου των ιόντων του. Η διπολική περιστροφή σχετίζεται με τις κινήσεις των δίπολων μορίων του διαλύματος λόγω της προσπάθειάς τους να ευθυγραμμιστούν με τη φορά του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, που έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος λόγω των περιστροφών και των συγκρούσεων που λαμβάνουν χώρα. Έτσι κατά τη χρήση αυτής της μεθόδου στην εκχύλιση, η ενέργεια

που μεταφέρουν τα μικροκύματα μετατρέπεται σε επιλεκτική θέρμανση στα πιο απορροφητικά τμήματα του φυτικού υλικού, με αποτέλεσμα ο όγκος των κυττάρων και ο ρυθμός διάχυσης να αυξάνονται.

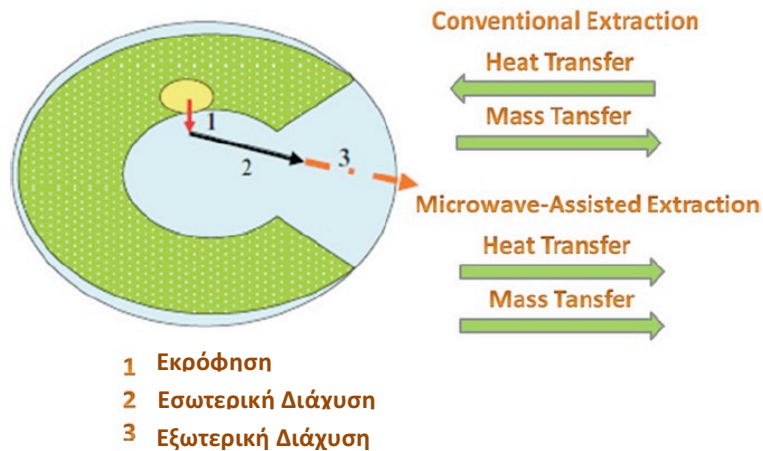
Η θερμότητα αυτή που παράγεται στο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την εξάτμιση της εσωτερικής υγρασίας που περιέχεται στα κύτταρα του δείγματος που εκχυλίζεται και την ανάπτυξη υψηλής πίεσης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Η αύξηση αυτή της πίεσης, μεταβάλλει τις φυσικές ιδιότητες των βιολογικών ιστών (κυτταρικό τοίχωμα και οργανίδια) και βελτιώνει το πορώδες του βιολογικού υλικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διείσδυση του διαλύτη στο στερεό και την ευκολότερη και ταχύτερη ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών από το δείγμα [11, 56].

Ένα βασικό σημείο διαφοροποίησης αυτής της τεχνικής είναι ότι στις περισσότερες μεθόδους εκχύλισης κατά τη θέρμανση (με αγωγή ή συναγωγή), ένα μεγάλο ποσό θερμότητας χάνεται στο περιβάλλον, σε αντίθεση με τα μικροκύματα, όπου η θέρμανση μεταδίδεται με αυτόν τον τρόπο αποκλειστικά στο εκχυλιζόμενο διάλυμα χωρίς απώλειες. Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα κατά την εκχύλιση μεταδίδεται από τη θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα, ενώ στην MAE η θέρμανση ξεκινάει κατευθείαν από το δείγμα, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων [67]. Έτσι με τη χρήση αυτής της τεχνικής, η θέρμανση πραγματοποιείται εκλεκτικά στην ύλη που προορίζεται για εκχύλιση και μεταβαίνει κατευθείαν σε αυτήν, καθώς ο περιέκτης δεν απορροφά θερμότητα, με αποτέλεσμα πρακτικά να μην χάνεται θερμότητα στο περιβάλλον, καθώς το σύστημα είναι κλειστό [64].

Παρόλα αυτά, μια χημική ένωση θα απορροφήσει τη μικροκυματική ενέργεια ανάλογα με τη διηλεκτρική της σταθερά. Αυτό σημαίνει, ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διηλεκτρική σταθερά, τόσο μεγαλύτερο ποσό ενέργειας απορροφάται. Επειδή οι εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες τυπικά περιλαμβάνουν μη πολικούς διαλύτες με πολύ μικρή ή και καθόλου διηλεκτρική σταθερά, για το λόγο αυτό συνήθως πρέπει να προστεθεί μία μικρή ποσότητα πολικού συστατικού στο διαλύτη για να βοηθήσει τη θέρμανση του διαλύματος. Από την άλλη, η χρήση του πολικού συστατικού στο διαλύτη μπορεί να οδηγεί στην εκχύλιση μεγαλύτερου εύρους συστατικών, επιπλέον των συστατικών για τα οποία ενδιαφερόμαστε με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν πιθανά προβλήματα παρεμβολής κατά την ανάλυση [68].

Συνεπώς κατά την MAE, η επιτάχυνση της διαδικασίας και η επίτευξη υψηλών αποδόσεων πραγματοποιείται ως συνδυαστικό αποτέλεσμα δυο φαινομένων μεταφοράς: της *βαθμίδας θερμότητας* και της *βαθμίδας μάζας* που σχηματίζονται και λειτουργούν προς την ίδια κατεύθυνση. Αντίθετα, στις συμβατικές εκχυλίσεις η μεταφορά μάζας γίνεται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό, ενώ η μεταφορά

θερμότητας πραγματοποιείται προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του υποστρώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 [69].



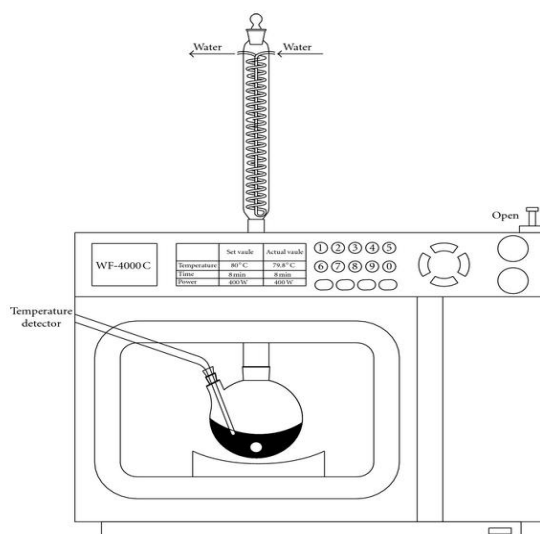
Εικόνα 8: Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς μάζας και θερμότητας στην MAE και τη συμβατική εκχύλιση φυσικών προϊόντων [69]

Προκύπτει λοιπόν ότι κατά τη διάρκεια εφαρμογής της MAE, συμβαίνουν μια σειρά από φαινομενολογικά βήματα, κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των περιεχόμενων σωματιδίων και του διαλύτη που πραγματοποιεί την εκχύλιση, τα οποία είναι:

1. Διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα
2. Διαλυτοποίηση και/ή διάσπαση των εκχυλιζόμενων συστατικών
3. Μεταφορά της διαλυμένης ουσίας έξω από τη στερεή μήτρα
4. Μετανάστευση της εξαγόμενης διαλυμένης ουσίας από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού στην κύρια μάζα του διαλύτη

Καθώς ο διαλύτης διεισδύει στη στερεή μήτρα με διάχυση, η επιθυμητή ουσία διαλύεται μέχρι να φθάσει σε μία συγκέντρωση που περιορίζεται από τα χαρακτηριστικά του διαλύτη και του στερεού. Στη συνέχεια, το διάλυμα που περιέχει τη διαλυμένη ουσία διαχέεται στην επιφάνεια του στερεού και τελικά με φυσική ή εξαναγκασμένη μεταφορά, μεταφέρεται στην κυρία μάζα του διαλύτη [69].

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα, που αποτελείται από έναν περιέκτη με τον διαλύτη και την προς εκχύλιση ουσία, ο οποίος τοποθετείται στον ειδικό χώρο της συσκευής και συνδέεται με συμπυκνωτήρα και θερμόμετρο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 [70].



Εικόνα 9: Συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα [71]

Η ΜΑΕ είναι μία αισθητά ταχύτερη μέθοδος εκχύλισης που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, εναλλακτικά από τις γνωστές παραδοσιακές μεθόδους. Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη συγκεκριμένη μέθοδο έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με άλλες τεχνικές. Μερικά από αυτά τα πλεονεκτήματα είναι [56, 72, 73]:

- ✓ Σημαντική μείωση του όγκου δείγματος και διαλύτη που χρησιμοποιούνται
- ✓ Σημαντικά μειωμένος χρόνος εκχύλισης
- ✓ Ομοιόμορφη εσωτερική και εξωτερική θέρμανση του υλικού
- ✓ Ποιοτικά καλύτερα εκχυλίσματα με υψηλή καθαρότητα και άρα υψηλή απόδοση των απομονωμένων ενώσεων
- ✓ Μικρότερη απαίτηση ενέργειας
- ✓ Μειωμένο κόστος διεργασίας (αν διατίθεται η συσκευή)
- ✓ Αύξηση της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας

Ωστόσο η εκχύλιση με μικροκύματα μειονεκτεί στο ότι δεν αποκλείει τα παραδοσιακά βήματα της διήθησης ή φυγοκέντρησης για τον διαχωρισμό του στερεού υπολείμματος μετά την εκχύλιση και της εξάτμισης του διαλύτη, τα οποία θα πρέπει να γίνουν αναγκαστικά για την παραλαβή της επιθυμητής ουσίας, όπως και στις παραδοσιακές μεθόδους. Ακόμη σε περιπτώσεις που ο διαλύτης ή οι επιθυμητές εκχυλιζόμενες ενώσεις είναι πτητικές ή μη πολικές, παρατηρείται μειωμένη αποτελεσματικότητα και

απόδοση της διεργασίας. Τέλος, για θερμοευαίσθητα βιοδραστικά συστατικά η χρήση υψηλών θερμοκρασιών σε αυτή τη μέθοδο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη βιοαποικοδόμησή τους, λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας που αναπτύσσεται [56].

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης με μικροκύματα είναι πολλοί και διαφορετικοί, όπως η ισχύς, η συχνότητα και ο χρόνος επίδρασης των μικροκυμάτων, το είδος, η σύσταση και τα χαρακτηριστικά του διαλύτη, το ποσοστό υγρασίας και η κοκκομετρία των σωματιδίων του δείγματος, η αναλογία οργανικού διαλύτη προς το στερεό δείγμα, η θερμοκρασία και η πίεση της εκχύλισης. Οι παράγοντες αυτοί, καθώς και ο τρόπος που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης, αναλύονται σε επόμενη παράγραφο [11, 72].

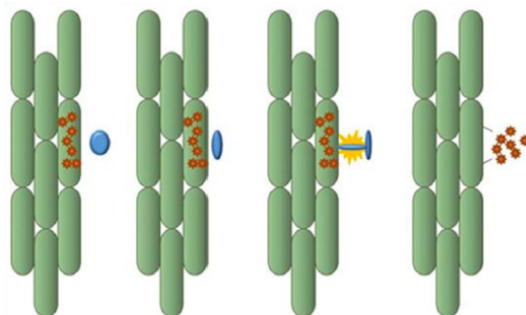
IV. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction-UAE)

Μια άλλη εναλλακτική εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες με σημαντικά πλεονεκτήματα, είναι η εκχύλιση με την χρήση υπερήχων. Οι υπέρηχοι αποτελούν μορφή ενέργειας που μεταδίδεται ως κύματα και έχουν κατώτερο όριο συχνότητας συνήθως τα 20 kHz. Η ανάδειξη της τεχνικής αυτής ως πράσινη καινοτόμο τεχνολογία, έχει προσελκύσει τη προσοχή για το ρόλο της στη περιβαλλοντική βιωσιμότητα. Η UAE έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς σε διάφορες διεργασίες χημικών βιομηχανιών και της βιομηχανίας τροφίμων. Συγκεκριμένα οι υπέρηχοι υψηλής έντασης που χαρακτηρίζονται από συχνότητες μεταξύ 20 έως και 100 kHz, προορίζονται για εφαρμογές επεξεργασίας τροφίμων. Θεωρούνται γενικότερα ως ασφαλείς, μη τοξικοί και φιλικοί προς το περιβάλλον, σε αντίθεση με τα μικροκύματα, τα οποία αντιμετωπίζονται συχνά με καχυποψία από το γενικό πληθυσμό [74]. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία των υπερήχων και τα πιθανά οφέλη από τη χρήση τους κατά την εκχύλιση, έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους σε ένα ευρύτερο φάσμα των χημικών διεργασιών [11].

Μηχανισμός

Ο μηχανισμός που ελέγχει την UAE γενικά αποδίδεται σε μηχανικές και θερμικές επιδράσεις που καταλήγουν στη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και στην ενισχυμένη μεταφορά μάζας μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Δύο είναι τα βασικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την επίδραση των υπερήχων σε ένα διάλυμα κατά την εκχύλιση: μεταβολή της πίεσης και μεταβολή της θερμοκρασίας. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης [11].

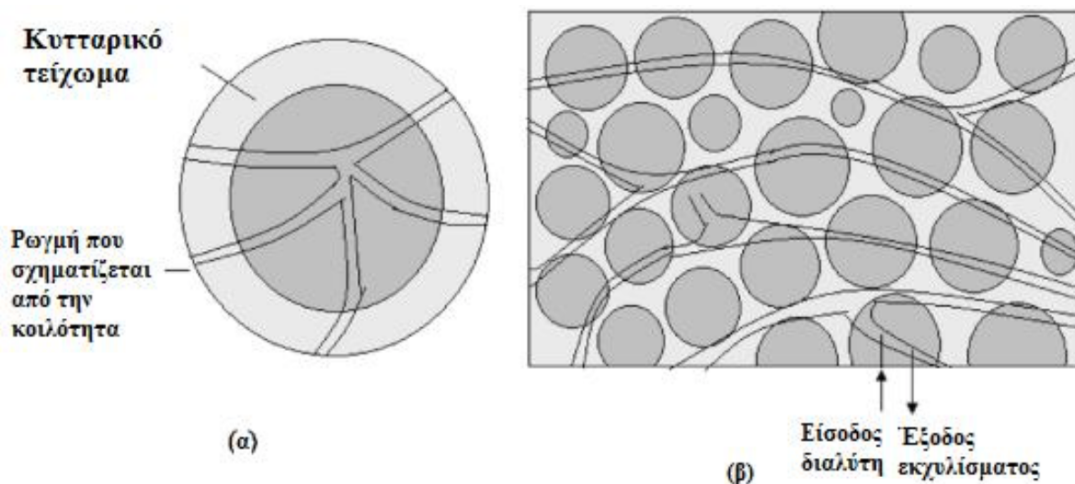
Εξ ορισμού, οι υπέρηχοι συνιστούν κύματα υψηλής συχνότητας που μεταφέρουν πίεση κατά τη διέλευση τους σε ένα μέσο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών χαμηλής και υψηλής πίεσης. Η διακύμανση αυτή της πίεσης που αναφέρεται ως πλάτος πίεσης (amplitude), δημιουργεί κύκλους διαστολής και συμπίεσης και είναι ανάλογο της ποσότητας ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα. Όταν οι διακυμάνσεις πίεσης στο υγρό είναι αρκετά υψηλές (3.000 MPa), τότε δημιουργούνται στο υγρό μέσο κοιλότητες ή μικροφουσαλίδες αερίου ή ατμού. Οι σχηματιζόμενες αυτές φυσαλίδες, απορροφούν την ενέργεια από τα ηχητικά κύματα και αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια των κύκλων διαστολής, ενώ επανασυμπιέζονται κατά τον κύκλο της συμπίεσης. Η συνεχής επανάληψη αυτών των κύκλων επιφέρει αλλαγές στη δομή του μέσου που υφίσταται την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων. Όταν το μέγεθος αυτών των φυσαλίδων φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, αυτές καταρρέουν κατά τη διάρκεια ενός κύκλου συμπίεσης εξαιτίας της επαναλαμβανόμενης σπηλαίωσης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μεταβατικό καυτό σημείο. Το φαινόμενο αυτό που αναφέρεται στο σχηματισμό την ανάπτυξη και την κατάρρευση των φυσαλίδων κατά τη διάρκεια διάδοσης ενός υπερηχητικού κύματος σε ένα υγρό μέσο, είναι γνωστό ως *ακουστική σπηλαίωση*. Στην Εικόνα 10, φαίνεται η διαδικασία κατάρρευσης της φυσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαίωση και η απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα.



Εικόνα 10: Κατάρρευση φυσαλίδας που δημιουργείται από τη σπηλαίωση και απελευθέρωση ουσιών από το δείγμα [75]

Η κατάρρευση των φυσαλίδων σπηλαίωσης δημιουργεί ακραίες τοπικές συνθήκες: καθορισμένες θερμοκρασίες μέχρι περίπου 4500 °C και εκτιμώμενες πιέσεις περίπου 50-1000 atm. Σε καθαρά υγρά, η φυσαλίδα που δημιουργείται κατά τη σπηλαίωση, διατηρεί το σφαιρικό της σχήμα κατά τη διάρκεια της κατάρρευσης, καθώς το περιβάλλον της είναι ομοιόμορφο. Ωστόσο, όταν η φυσαλίδα καταρρέει κοντά σε μια στερεή επιφάνεια, όπως γίνεται κατά την εκχύλιση ενός στερεού, δημιουργείται ασυμμετρία και πραγματοποιούνται διάφορες φυσικές επιδράσεις. Έτσι προκαλείται μακρο-τροβιλισμός, συγκρούσεις υψηλής ταχύτητας μεταξύ των σωματιδίων και διαταραχή σε μικροπορώδη σωματίδια της βιομάζας, φαινόμενα που επιταχύνουν τη στροβιλώδη και την εσωτερική διάχυση. Αυτές οι δέσμες διαλύτη που παράγονται προς τα κυτταρικά τοιχώματα από την κατάρρευση της φυσαλίδας, επιδρούν έντονα στη

στερεή επιφάνεια του δείγματος, αυξάνοντας τη διείσδυση του διαλύτη μέσα στο κύτταρο καθώς και την επιφάνεια επαφής μεταξύ στερεής και υγρής φάσης [76]. Ακόμη, τα ρεύματα υψηλής ταχύτητας υγρών που δημιουργούνται στην επιφάνεια των στερεών και οι ζημιές που προκαλούνται από κρουστικά κύματα, μπορούν να οδηγήσουν σε κατακερματισμό εύθρυπτων υλικών, επιφανειακή αποφλοιώση, διάβρωση σε εκείνο το σημείο και τελικά ακόμα και διάσπαση των σωματιδίων, ασκώντας έτσι ακόμα και μηχανική επίδραση. Από αυτούς τους παράγοντες προκύπτει μια αυξημένη μεταφορά μάζας λόγω της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων και της διάβρωσης της επιφάνειάς τους. Ως αποτέλεσμα, η κατάρρευση των φυσαλίδων που πλήττει την επιφάνεια της στερεάς δομής και διασπά τα κύτταρα, προκαλεί την απελευθέρωση και εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών. Επιπλέον τα υπερηχητικά κύματα επιδρούν στο στερεό υλικό, διευκολύνοντας τη διαστολή και την ενυδάτωση του και διευρύνοντας έτσι τους πόρους του κυτταρικού του τοιχώματος με αποτέλεσμα τη βελτίωση της διαδικασίας διάχυσης του διαλύτη στο στερεό δείγμα και την ενίσχυση της μεταφοράς μάζας ως προς την εκχυλιζόμενη ένωση. Έτσι με την UAE, επιτυγχάνεται η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος του δείγματος και η διαλυτοποίηση των ανακτωμένων συστατικών στο διαλυτή αποτελεσματικά και σε σύντομο χρόνο. Ο μηχανισμός λύσης του κυτταρικού τοιχώματος λόγω της ακουστικής σπηλαίωσης, φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 11. Όπως αναφέρθηκε, η UAE δεν δρα με έναν μηχανισμό, αλλά με διαφορετικούς ή συνδυασμένους μηχανισμούς (π.χ. θρυμματισμός, διάβρωση, σχηματισμός πόρων), όλοι από τους οποίους προκαλούνται από το βασικό φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης στο διάλυμα λόγω της δράσης των υπερήχων [77].



Εικόνα 11: Μηχανισμός λύσης του κυτταρικού τοιχώματος (α) λύση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της δημιουργίας ρωγμής στην κοιλότητα (β) διάχυση του διαλύτη μέσα στη δομή του κυττάρου

Λόγω της δημιουργίας φυσαλίδων/κοιλοτήτων, οι ρωγμές που δημιουργούνται στο κυτταρικό τοίχωμα αυξάνουν τη διαπερατότητα των φυτικών ιστών και διευκολύνουν την είσοδο του διαλυτή στο εσωτερικό του υλικού καθώς και την έκπλυση των εκχυλιζόμενων συστατικών, όπως απεικονίζεται και Εικόνα 11. Πέραν, όμως, ενός ορίου, παρατηρείται απώλεια της ενέργειας των υπερήχων γιατί δεν σημειώνεται περαιτέρω αύξηση της απόδοσης, λόγω αποκατάστασης ισορροπίας στην εκχύλιση.

Γενικότερα οι μεγαλύτερες ηχητικές επιδράσεις, επιτυγχάνονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, αφού με μείωση της πίεσης των ατμών της σπηλαίωσης του μίγματος, εμφανίζεται μια αύξηση στην ένταση κατάρρευσης των φυσαλίδων, αυξάνοντας έτσι την υπερηχητική ενέργεια που παράγεται κατά τη σπηλαίωση [75]. Ακόμη η κατάρρευση της φυσαλίδας γίνεται πιο βίαιη με την αύξηση της έντασης των υπερήχων, η οποία εκφράζεται ως η ενέργεια που μεταδίδεται ανά δευτερόλεπτο και ανά τετραγωνικό μέτρο επιφάνειας εκπομπής. Έχει παρατηρηθεί από πειραματικές μελέτες, ότι σε υψηλότερες συχνότητες η απόδοση της εκχύλισης μειώνεται ενώ απαιτούνται και μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης για την ανάκτηση της ίδιας ποσότητας μιας ουσίας.

Ειδικότερα, έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων με τη δράση υπερήχων και έχει διαπιστωθεί ότι η ανάκτηση καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των εν λόγω ενώσεων επηρεάζονται από παραμέτρους της εκχύλισης, όπως ο χρόνος, η θερμοκρασία και η συχνότητα των υπερήχων, ενώ διατηρείται η σταθερότητα των εκχυλιζόμενων συστατικών [11].

Έτσι τελικά στα πλεονεκτήματα της UAE περιλαμβάνονται [11, 64]:

- ✓ Μειωμένος χρόνος εκχύλισης
- ✓ Κατανάλωση μικρότερων όγκων διαλυτών
- ✓ Υψηλότερες αποδόσεις, καθαρότητα και βελτιωμένη ποιότητα του τελικού προϊόντος
- ✓ Επιλεκτικότητα λόγω δυνατότητας εκλεκτικής εκχύλισης μιας ένωσης
- ✓ Δυνατότητα χρήσης χαμηλότερων θερμοκρασιών εκχύλισης και βελτίωση του ρυθμού εκχύλισης θερμοευαίσθητων συστατικών
- ✓ Μειωμένο κόστος επεξεργασίας
- ✓ Δυνατότητα χρήσης εναλλακτικών διαλυτών εκχύλισης, βελτιώνοντας τις επιδόσεις τους
- ✓ Μικρό μέγεθος εξοπλισμού και αυξημένη παραγωγή

Ακόμη ένα βασικό τους πλεονέκτημα εντοπίζεται στο γεγονός ότι μπορούν να αυξήσουν την παραγωγικότητα και την αποδοτικότητα των διεργασιών μέσω της μείωσης του χρόνου επεξεργασίας,

να ενισχύσουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, να μειώσουν την πιθανότητα φυσικών και χημικών κινδύνων, ενώ θεωρούνται περισσότερο φιλικόι στο περιβάλλον.

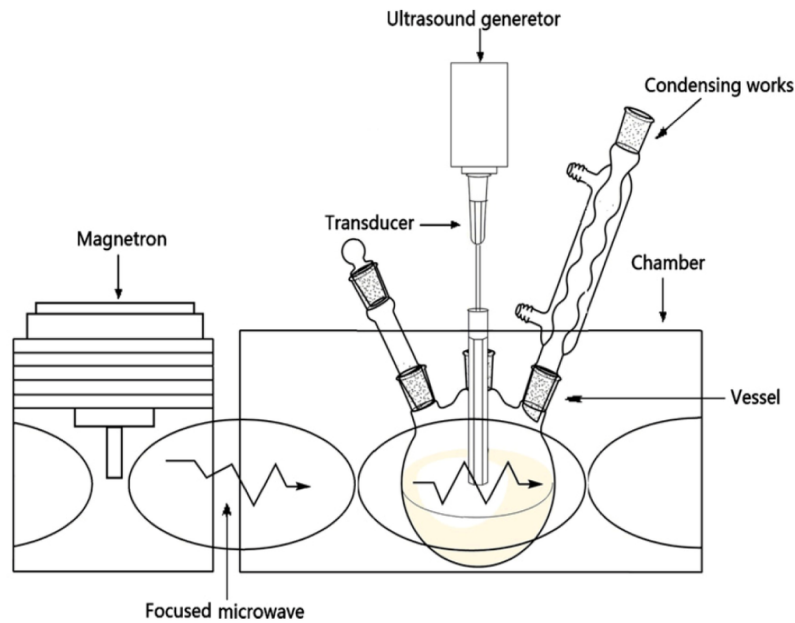
Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τις τρεις βασικές τεχνικές εκχύλισης, έτσι όπως αναλύθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 3: Βασικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των τεχνικών εκχύλισης SE, MAE και UAE

	Τεχνική Εκχύλισης		
	SE	MAE	UAE
<i>Περιγραφή</i>	Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό γυάλινο κύλινδρο εκχύλισης σε εκχυλιστήρα Soxhlet και εκχυλίζεται συνεχόμενα με επανασυμπυκνωμένους ατμούς διαλύτη	Το δείγμα βρίσκεται βυθισμένο σε κατάλληλο διαλύτη που μπορεί να απορροφήσει τα μικροκύματα μέσα σε κλειστό δοχείο και ακτινοβολείται με ενέργεια μικροκυμάτων	Το δείγμα βρίσκεται βυθισμένο σε διαλύτη μέσα σε ένα δοχείο και υπόκειται σε ενέργεια υπερήχων με κατάλληλη διάταξη.
<i>Χρόνος Εκχύλισης</i>	2-48 ώρες	3-30 λεπτά	5-60 λεπτά
<i>Μέγεθος Δείγματος</i>	1-30 g	1-10 g	1-30 g
<i>Επένδυση</i>	Χαμηλή	Μέτρια	Χαμηλή
<i>Πλεονεκτήματα</i>	Εύκολη στη διαχείριση, δεν απαιτείται φυγοκέντρηση, αυξημένη χωρητικότητα υποστρώματος	Ταχεία και επαναλαμβανόμενη εκχύλιση, εύκολη στη διαχείριση, μειωμένη κατανάλωση διαλύτη	Εύκολη στη χρήση, μειωμένος χρόνος εκχύλισης, υψηλές αποδόσεις
<i>Μειονεκτήματα</i>	Αυξημένος χρόνος εκχύλισης, μεγάλες ποσότητες διαλύτη	Ο διαλύτης θα πρέπει να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων, απαιτείται καθαρισμός του εκχυλίσματος	Απαιτείται καθαρισμός του εκχυλίσματος, μεγαλύτεροι όγκοι διαλυτών

Ωστόσο, η πλέον κατάλληλη και καινοτόμος μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του λυκοπενίου και άλλων παρόμοιων αντιοξειδωτικών και καροτενοειδών είναι σύμφωνα και με άλλους ερευνητές, η συνδυασμένη μέθοδος με μικροκύματα και υπερήχους (UMAE). Η ταυτόχρονη χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων προτιμάται σε αυτές τις περιπτώσεις, καθώς έχει αποδειχθεί ότι συνήθως οδηγεί ταχύτερα σε μεγαλύτερες αποδόσεις σε σχέση με την κάθε μέθοδο χωριστά. Κατά την εφαρμογή της ισχύουν οι βασικές αρχές των δύο τεχνικών και η απόδοσή της επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες που

επηρεάζουν και τις ΜΑΕ και UAE χωριστά [69]. Ένα σχηματικό διάγραμμα αναπαράστασης μιας τέτοιας συνδυαστικής συσκευής εκχύλισης φαίνεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12: Συνδυασμένη συσκευή εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) [78]

2.3.1.2 Παράμετροι Εκχύλισης και Αριστοποίηση

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης έχει μελετηθεί σε διάφορες εφαρμογές. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας σχετίζεται άμεσα από τις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας και για την αριστοποίησή τους επιλέγονται συνήθως μία ή περισσότερες παράμετροι ελέγχου. Έτσι, η απόδοση εκχύλισης του λυκοπενίου, εκτός από τη φύση του αρχικού υλικού που χρησιμοποιείται (ποικιλία τομάτας, σύνθεση αποβλήτων, τμήμα καρπού κτλ.), εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται. Οι παράμετροι που ρυθμίζονται κατά την εκχύλιση και μπορούν να επηρεάσουν την απόδοσή της, είναι αρκετές και διαφοροποιούνται σε μικρό βαθμό ανάλογα την μέθοδο και τον τρόπο που αυτή πραγματοποιείται [79].

Ορισμένες παράμετροι αριστοποίησης είναι κοινοί για όλες τις μεθόδους, ενώ άλλες είναι πιο ειδικές και αναφέρονται σε τεχνικές όπως η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων ή υπερήχων. Αυτές οι παράμετροι μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με την επιλεγόμενη τιμή τους. Τα βασικά κριτήρια ως προς τα οποία γίνεται συνήθως η αριστοποίηση, είναι η υψηλή απόδοση, η χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση ή η απλότητα της μεθόδου. Μερικές από τις πιο συνήθεις και μελετημένες παραμέτρους αριστοποίησης των τεχνικών εκχύλισης, με βασικό κριτήριο την επίτευξη της

βέλτιστης απόδοσης της διεργασίας για την απομόνωση των επιθυμητών συστατικών, παρουσιάζονται παρακάτω. Οι παράμετροι αυτοί αφορούν τις μεθόδους εκχύλισης που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

❖ Διαμόρφωση κοκκομετρίας [69, 80]

Αυτή η παράμετρος, αφορά τα χαρακτηριστικά του δείγματος και άρα επηρεάζει την απόδοση όλων των μεθόδων εκχύλισης που συζητήθηκαν παραπάνω. Είναι γνωστό ότι όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των κόκκων του εκχυλιζόμενου δείγματος που βρίσκεται σε μορφή σκόνης, τόσο αυξάνεται η επιφάνεια μεταφοράς μάζας με αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της διεργασίας. Με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής τους και μειώνεται η απόσταση διάχυσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο ρυθμός διάχυσης των επιθυμητών συστατικών από την κυτταρική δομή του στερεού. Ωστόσο, η υπερβολική μείωση του μεγέθους δυσκολεύει την κίνηση του υγρού και απαιτεί μεγάλη διαφορά πίεσης στον εκχυλιστήρα με αποτέλεσμα να προκαλούνται τεχνικά προβλήματα. Επίσης τα πολύ μικρά σωματίδια διαχωρίζονται δύσκολα από το υγρό μέσο μετά την εκχύλιση, δημιουργώντας πρόσθετες δυσκολίες στην παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος. Σχετική έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την εκχύλιση λυκοπενίου από παραπροϊόντα τομάτας, επαλήθευσε ότι η απόδοση της διεργασίας μειώθηκε για πολύ μικρά μεγέθη σωματιδίων κοντά στα 0.08 mm [81]. Ένα συνηθισμένο εύρος μεγεθών σωματιδίων για εκχύλιση καρροτενοειδών θεωρείται από 0.1 μέχρι 2 mm. Για να οριστεί η κοκκομετρία του δείγματος πριν την εκχύλιση, το δείγμα αλέθεται και ομογενοποιείται, και στη συνέχεια κοσκινίζεται σε ειδικά κόσκινα πλέγματος, ανάλογα με το εύρος των σωματιδίων που επιθυμείται να παραληφθεί.

❖ Χρήση του κατάλληλου διαλύτη [11, 56, 69]

Η χρήση του κατάλληλου διαλύτη, δηλαδή αυτού που παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τα επιθυμητά συστατικά, εξασφαλίζει μια πιο αποδοτική εκχύλιση ως προς τα συστατικά αυτά. Η επιλογή του βασίζεται στη διαλυτότητα των ενώσεων που επιθυμείται να εκχυλιστούν, τη διηλεκτρική σταθερά τους και τους παράγοντες σκέδασης/συντελεστές απωλειών τους. Τα δύο τελευταία κριτήρια επιλογής κατάλληλου διαλύτη, αφορούν αποκλειστικά την περίπτωση εκχύλισης με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE), υπερήχων (UAE) ή συνδυασμού των δύο τεχνικών (UMAE). Συγκεκριμένα, διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά, π.χ. το νερό και άλλοι πολικοί διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη), είναι ικανοί να απορροφούν μεγάλα ποσά ενέργειας από τα μικροκύματα και θεωρούνται συνήθως αποτελεσματικότεροι από τους μη πολικούς. Ο παράγον σκέδασης/συντελεστής απωλειών του διαλύτη -δηλαδή η αποτελεσματικότητα με την οποία οι διαφορετικοί διαλύτες θερμαίνονται κατά τη δράση των μικροκυμάτων- διαδραματίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο κατά την επιλογή του. Από σχετικές έρευνες

έχει προκύψει ότι είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά και μεγάλο παράγοντα σκέδασης, το οποίο επιτυγχάνεται συνήθως με χρήση μιγμάτων νερού και άλλων διαλυτών, όπως είναι η αιθανόλη ή η μεθανόλη.

Έχει αποδειχθεί ακόμη ότι, ο συνδυασμός πολικών διαλυτών με το μη πολικό εξάνιο ενισχύει τη διαλυτότητα των μη πολικών καροτενοειδών, όπως είναι το λυκοπένιο και β-καροτένιο. Μίγματα πολικών και μη πολικών διαλυτών, όπως ακετόνη/εξάνιο, αιθανόλη/εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο ή ακετόνη/αιθανόλη/εξάνιο, έχουν χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για την εκχύλιση τέτοιων ενώσεων με αρκετά καλές αποδόσεις.

Ωστόσο, παρόλο που οι μη πολικοί οργανικοί διαλύτες θεωρούνται πολύ αποτελεσματικοί για την εκχύλιση των καροτενοειδών, εν τούτοις είναι τοξικοί και η χρήση τους σε πολλές χώρες είτε απαγορεύεται είτε επιτρέπεται σε πολύ χαμηλές υπολειμματικές συγκεντρώσεις. Επομένως, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση εναλλακτικών διαλυτών που είναι εξίσου αποτελεσματικοί για την εκχύλιση των καροτενοειδών. Ένας τέτοιος είναι και ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, ο οποίος έχει προταθεί ως περιβαλλοντικά φιλικός διαλύτης, πλήρως βιοαποικοδομήσιμος σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ άλλοι ερευνητές [82] έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα του για την εκχύλιση trans- και cis-ισομερών λυκοπενίου.

❖ Διάρκεια Εκχύλισης [56, 69]

Η διάρκεια της εκχύλισης είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της διεργασίας εκχύλισης, δεδομένου ότι επηρεάζει σαφώς το κόστος και την απόδοση της. Παράλληλα ενδεχομένως να επηρεάζει και την ποιότητα του εκχυλίσματος μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, λόγω της έκθεσης του σε συνθήκες που είναι ικανές να υποβαθμίσουν τη δομή και τα αρχικά χαρακτηριστικά του. Η διάρκεια της εκχύλισης στις τεχνικές με μικροκύματα και υπερήχους δεν είναι ανεξάρτητη μεταβλητή δεδομένου ότι οι εντάσεις των μικροκυμάτων και των υπερήχων επηρεάζουν με τη σειρά τους την απόδοση σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης του δείγματος σε αυτές.

Μία ακόμη παράμετρος που επηρεάζει τη μέγιστη χρονική διάρκεια της εκχύλισης, κυρίως για θερμοευαίσθητες ενώσεις, είναι η αύξηση της θερμοκρασίας σε ορισμένες μεθόδους. Για παράδειγμα, η διάρκεια της εκχύλισης θερμοευαίσθητων ενώσεων, όπως το λυκοπένιο, με μικροκύματα, είναι μικρότερη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους και ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι μερικές ώρες. Έτσι αποφεύγεται μια πιθανή αλλοίωση ή οξείδωση των θερμοευαίσθητων αυτών συστατικών, λόγω της θερμότητας που αναπτύσσεται [83]. Συνεπώς, η διάρκεια της εκχύλισης για αυτές τις περιπτώσεις, επιλέγεται συνήθως με κριτήριο την εξασφάλιση της σταθερότητας των ενώσεων-στόχων που είναι

θερμοευαίσθητες. Επιπρόσθετα, ύστερα από μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, η περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης έχει μικρό αντίκτυπο στην απόδοση της εκχύλισης.

❖ Αναλογία στερεού-υγρού [11]

Ο παράγοντας αυτός θεωρείται σημαντικός για πολλές εφαρμογές και κυρίως για την εκχύλιση των καροτενοειδών. Έχει αποδειχθεί ότι για την συμβατική εκχύλιση, η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας διαλύτη στην ίδια ποσότητα στερεού, αυξάνει την ανάκτηση της επιθυμητής ουσίας κατά την εκχύλιση. Ωστόσο ο όγκος του διαλύτη είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, επειδή υπερβολικά μεγάλη χρήση διαλύτη εκχύλισης, σημαίνει περισσότερη ενέργεια και χρόνος απαιτούνται για συμπύκνωση του διαλύματος εκχύλισης σε επόμενο στάδιο και πιο χρονοβόρα διαδικασία καθαρισμού. Από την άλλη, μελέτες αναφέρουν ότι το διάλυμα της εκχύλισης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 30-34% (w/v). Μεγάλες τιμές της αναλογίας δηλώνουν υπερκατανάλωση του διαλύτη και παρατηρούνται συνήθως στην εκχύλιση Soxhlet, ενώ οι μικρές τιμές έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκή ανάμιξη του διαλύτη με την πρώτη ύλη. Μια συνήθης αναλογία ανάμιξης στερεού : διαλύτη, που χρησιμοποιείται από αρκετούς ερευνητές για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων εκχύλισης, είναι 1:20 (w/v) [84] ή 1:30 (w/v) [85], ενώ από άλλες εφαρμογές, ο λόγος 1:10 και 1:20 (w/v), βρέθηκε να είναι ο βέλτιστος [69].

❖ Ένταση των υπερήχων [56, 66]

Η παράμετρος αυτή αφορά την εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (UAE) ή τη συνδυασμένη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE) και αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας με αυτές τις τεχνικές. Από πειράματα που έχουν γίνει για την αριστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης καροτενοειδών, έχει προκύψει ότι η αύξηση της έντασης των υπερήχων μέχρι μία συγκεκριμένη τιμή, συνήθως αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου της διεργασίας.

Ειδικότερα, από εκτεταμένες έρευνες που έχουν γίνει για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων με τη δράση των υπερήχων, έχει διαπιστωθεί ότι η ανάκτηση καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των εν λόγω ενώσεων επηρεάζονται εκτός από την ένταση, και από άλλες παραμέτρους που αφορούν τη μορφή και τη χρήση των υπερήχων, όπως ο χρόνος έκθεσης, η θερμοκρασία και η συχνότητα τους, οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνονται επίσης υπόψη όταν επιλέγεται η τιμή της ισχύς τους. Παρόλα αυτά, ο τρόπος που επιδρά η παράμετρος αυτή στην απόδοση της διεργασίας δεν είναι ίδιος για όλα τα δείγματα και εξαρτάται συνήθως και από άλλες παραμέτρους της διεργασίας εκχύλισης (χρόνος έκθεσης, μορφή υπερήχων, υγρασία δείγματος κτλ.).

❖ Ένταση των μικροκυμάτων [56, 73, 86]

Η παράμετρος αυτή αφορά την εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE) ή τη συνδυασμένη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (UMAE). Μαζί με την ένταση των υπερήχων, αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο που επηρεάζει την απόδοση της διεργασίας όταν εφαρμόζονται οι παραπάνω μέθοδοι.

Η ισχύς και η θερμοκρασία των μικροκυμάτων αλληλοσυνδέονται αφού η υψηλή ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση στη θερμοκρασία του συστήματος και αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης μέχρι αυτή να γίνει ασήμαντη ή να μειωθεί. Είναι γνωστό ότι η θερμοκρασία ελέγχεται από την προσπίπτουσα ισχύ των μικροκυμάτων, που ελέγχει την ποσότητα ενέργειας που παρέχεται στο διάλυμα και η οποία μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια στο διηλεκτρικό υλικό. Σε υψηλές θερμοκρασίες, η αποτελεσματικότητα του διαλύτη αυξάνεται εξαιτίας της πτώσης του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, διευκολύνοντας έτσι τη διαλυτοποίηση των ουσιών του δείγματος και βελτιώνοντας την διαβροχή του και τη διείδυση του διαλύτη.

Από τα παραπάνω, θα ήταν αναμενόμενο η αύξηση των μικροκυμάτων να αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, κάτι το οποίο συμβαίνει στην πραγματικότητα, μέχρι όμως κάποια οριακή τιμή, μετά την οποία υπερισχύουν τα φαινόμενα αποικοδόμησης των επιθυμητών θερμοευαίσθητων αντιοξειδωτικών συστατικών στο εκχύλισμα, με αποτέλεσμα τελικά τη μείωση της απόδοσης. Η οριακή αυτή τιμή της έντασης εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά του δείγματος και του διαλύτη, τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση καθώς και τη συχνότητα και το χρόνο επίδρασης των μικροκυμάτων.

Όπως αναφέρθηκε, οι τεχνικές εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα αποτελούν καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης επιθυμητών ουσιών που παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών (UMAE), αποτελεί μία νέα τάση στον τομέα των εκχυλίσεων, που έχει αποδειχθεί μάλιστα ότι αποδίδει πολύ καλύτερα από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, όσον αφορά την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτά. Η ένταση των υπερήχων και των μικροκυμάτων είναι οι βασικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας της εκχύλισης σε αυτή την περίπτωση εκχύλισης. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι συνήθως η αύξηση της έντασης και στις δύο τεχνικές και εν κατακλείδι και του συνδυασμού αυτών υπό κάποιες προϋποθέσεις και συνθήκες, αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης και μειώνει τον χρόνο των πειραμάτων [87].

Άλλες παράμετροι που δεν αναλύονται παραπάνω και μπορεί να επηρεάζουν σε μικρότερο βαθμό την απόδοση εκχύλισης λυκοπενίου είναι η υγρασία της πρώτης ύλης, τα στάδια της εκχύλισης, η ανάδευση και η ομογενοποίηση [11, 75].

Επομένως, η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιείται από ένα σύνολο κριτηρίων, οι τιμές των οποίων θα πρέπει να επιλεγθούν σωστά και να διερευνηθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Έτσι κατά τον σχεδιασμό μιας σειράς πειραμάτων με σκοπό την αριστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης, θα πρέπει να επιλέγονται οι βασικές παράμετροι ως προς τις οποίες θα γίνεται η αριστοποίηση, καθώς και οι διαφορετικές τιμές που θα εξεταστούν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών και την παραλαβή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, με βάση και τη σχετική έρευνα που υπάρχει στη βιβλιογραφία.

2.3.2 Ανάλυση εκχυλίσματος Λυκοπενίου

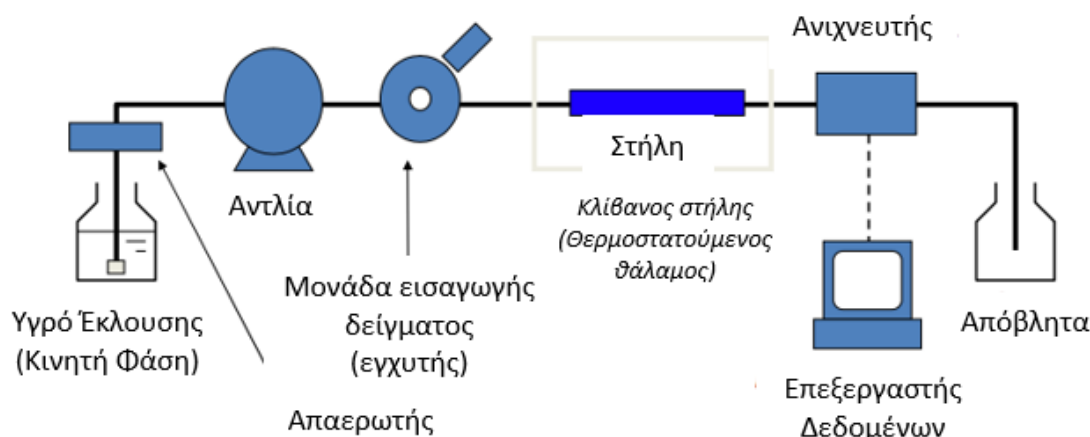
Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι μεταξύ όλων των χρωματογραφικών τεχνικών διαχωρισμού, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), είναι από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των καρτενοειδών, καθώς προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε ότι αφορά το διαχωρισμό, την ταχύτητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια και το κόστος της. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος χρησιμοποιείται στις περισσότερες βιβλιογραφίες ανάλυσης καρτενοειδών, αφού δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης και προσδιορισμού της σύστασης ακόμη και πολύπλοκων μιγμάτων και θεωρείται ως μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους στον τομέα της, προσφέροντας καλύτερη ανάλυση διαχωρισμού και μεγαλύτερη ταχύτητα από κάθε άλλη αντίστοιχη μέθοδο [49, 88, 89].

Σε διάφορες βιβλιογραφίες έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί από ερευνητές, διαφορετικά πρωτόκολλα για την ανάλυση καρτενοειδών στο HPLC, με διαφορετικούς διαλύτες, παραμέτρους λειτουργίας και συνθήκες ανάλυσης. Οι διαφοροποιήσεις αυτές οφείλονται κυρίως στο διαφορετικό σκοπό ανάλυσης του κάθε αναλυτή και το βασικό καρτενοειδές που τον ενδιαφέρει και αφορούν τη στήλη που χρησιμοποιείται και τα χαρακτηριστικά της, την επιλογή της κινητής φάσης και της ταχύτητας ροής, καθώς και την αναλογία των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στη στήλη (κινητή φάση) και την επιλογή του ανιχνευτή. Μερικά τέτοια παραδείγματα διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης με τα χαρακτηριστικά τους (Στήλη HPLC/Κινητή Φάση/Ταχύτητα ροής/Ανιχνευτής) είναι τα εξής:

1. C30 (250 X 4.6 mm i.d., 5 μm), με 1-βουτανόλη/ακετονιτρίλιο (30:70, v/v) (Διαλύτης Α) και διχλωρομεθάνιο (Διαλύτης Β), ταχύτητα ροής: 2 mL/min και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων [49]

2. C18 (250 X 4.6 mm i.d., 5 μm), με μεθανόλη (Α) /ακετόνη (Β) (90:10, v/v), ταχύτητα ροής: 0.8 mL/min και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων [90]
3. C18 (250 X 4.6 mm i.d., 5 μm), με ακετονιτρίλιο (Α) /μεθανόλη (Β) /2-προπανόλη (Γ) (44:54:2, v/v), ταχύτητα ροής: 1 mL/min και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων [91]

Μια τυπική μορφή της διάταξης του HPLC, φαίνεται στην Εικόνα 13 και αποτελείται από το σύστημα παροχής κινητής φάσης (κινητή φάση και αντλία), ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος (εγχυτής), τη στήλη, κατάλληλο ανιχνευτή και τέλος ένα σύστημα επεξεργασίας και παρουσίασης των αποτελεσμάτων (ηλεκτρονικός υπολογιστής).



Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής HPLC Χρωματογράφου [92]

Η σύζευξη του ανιχνευτή στη διάταξη της συσκευής του HPLC, είναι απαραίτητη για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων. Υπάρχουν διάφοροι τύποι και είδη ανιχνευτών, η λειτουργία καθ' ενός από τους οποίους βασίζεται σε ανίχνευση διαφορετικής ιδιότητας, φυσικής ή χημικής του δείγματος [60]. Ένα από αυτά τα είδη είναι και οι φασματομετρικοί ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), που θεωρούνται από τους πιο συνηθισμένους και χρησιμοποιούνται αρκετά τα τελευταία χρόνια. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι φασματοφωτόμετρα υπεριώδους-ορατού στην κυψελίδα των οποίων το δείγμα απορροφά την ακτινοβολία ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η επιλογή αυτού του μήκους κύματος (λ), εξαρτάται από τη φύση των μορίων και τα όρια ανίχνευσης τους κυμαίνονται από 1 μg έως 1 ng. Οι ανιχνευτές υπεριώδους (UV) έχουν φάσμα απορρόφησης 190-340 nm, ενώ αυτοί του ορατού (VIS), έχουν φάσμα απορρόφησης 340-800 nm [11].

Ένας τύπος ανιχνευτή UV-Vis είναι ο ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων (Diode array). Με τον τύπο αυτό μπορεί να γίνει ανίχνευση σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα και επιτρέπεται η λήψη και καταγραφή του πλήρους φάσματος απορρόφησης (350-550 nm) σε κάθε χρονική στιγμή, αντί να

παρακολουθείται ένα μόνο μήκος κύματος κάθε στιγμή, όπως γίνεται με τα κλασικά φασματοφωτόμετρα. Η κυψελίδα του ανιχνευτή φωτίζεται, δηλαδή συγχρόνως με ακτινοβολίες διαφορετικών μηκών κύματος και οι διερχόμενες ακτινοβολίες από το δείγμα διαθλώνται και στη συνέχεια προσπίπτουν σε μια σειρά φωτοδιοδίων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται και μια δέσμη διαφορετικού μήκους κύματος λ και από τη συνεχή σάρωση των φωτοδιοδίων με μικροϋπολογιστή προκύπτει ένα τρισδιάστατο φάσμα και στη συνέχεια το ζητούμενο χρωματογράφημα. Ο ανιχνευτής αυτός υπερέχει από τους υπόλοιπους αυτού του είδους γιατί επιτρέπει να ελεγχθεί αμέσως η καθαρότητα μιας κορυφής ενός συστατικού, δηλαδή εάν πρόκειται για μια και μόνο ουσία ή όχι, από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τον ανιχνευτή συστοιχίας διοδίων, αποτελεί την πιο σύγχρονη εξέλιξη στην ανάλυση των καροτενοειδών, αφού όπως αναφέρθηκε επιτρέπει ταυτοποίηση σε πολύ χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης χωρίς να απαιτούνται τα προηγούμενα στάδια της παραλαβής και του καθαρισμού των ενώσεων [11, 60].

Η **ταυτοποίηση** του λυκοπενίου με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, γίνεται από τις πληροφορίες που λαμβάνονται από την αποτίμηση του φάσματος απορρόφησης και καθίσταται δυνατή λόγω του συζευγμένου ανιχνευτή. Τα περισσότερα καροτενοειδή απορροφούν ενέργεια στην περιοχή των 400-500 nm, αλλά παρατηρούνται μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των φασμάτων διαφορετικών καροτενοειδών, που οφείλονται στη θέση του μέγιστου μήκους κύματος απορρόφησης (λ_{max}) και στο βαθμό της φασματικής δονητικής λεπτής δομής τους. Η ταυτοποίησή τους δεν βασίζεται μόνο στην αντιστοίχιση των καταγεγραμμένων φασμάτων UV-Vis με αυτά των βιβλιοθηκών, αλλά και στην εξέταση των σχέσεων των δομών και των παραγόντων που επηρεάζουν την απορρόφηση της ενέργειας [11].

Η **ποσοτικοποίηση** στο HPLC, δηλαδή ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε λυκοπένιο, γίνεται καθορίζοντας μια σχέση μεταξύ του σήματος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται -και εκφράζεται ως το εμβαδόν της προκύπτουσας για την επιθυμητή ένωση κορυφής- και της συγκέντρωσης της ένωσης στο δείγμα. Η σχέση αυτή είναι γραμμική και προκύπτει έπειτα από την ανάλυση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης σε λυκοπένιο. Αυτό γίνεται με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων λυκοπενίου, τα οποία και αναλύονται στο HPLC, με την ίδια μέθοδο και συνθήκες λειτουργίας με τα υπόλοιπα προς ανάλυση δείγματα. Από τα αποτελέσματα, σχεδιάζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης που συσχετίζει το μετρούμενο εμβαδόν των κορυφών με τις γνωστές τους συγκεντρώσεις σε λυκοπένιο, και τελικά προκύπτει μια γραμμική εξίσωση με την οποία γίνεται εξωτερική ποσοτικοποίηση των εκχυλισμάτων [11].

2.4 Χρήσεις των καροτενοειδών

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα καροτενοειδή είναι μια κατηγορία που αποτελείται από περισσότερες από 600 φυσικώς απαντώμενες χρωστικές, οι οποίες συντίθενται από φυτά, άλγη και φωτοσυνθετικά βακτήρια. Αυτά τα πλούσια χρωματισμένα μόρια είναι οι πηγές του κίτρινου, πορτοκαλί και κόκκινου χρώματος πολλών φυτών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικές χρωστικές για τρόφιμα, ζωοτροφές και καλλυντικά. Είναι επίσης γνωστό ότι κατέχουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και τη φωτοσύνθεση και αποτελούν την κύρια πηγή βιταμίνης Α και άλλων αντιοξειδωτικών για τους ανθρώπους, προσφέροντας πολλές θετικές επιδράσεις στην υγεία τους κατά την κατανάλωσή τους [41, 93].

Συνεπώς, οι μικροοργανισμοί και τα φυτά παράγουν ορισμένες ουσίες που παρουσιάζουν διαφορετικά χρώματα, λόγω της εκλεκτικής απορρόφησης χρώματος, οι οποίες αποτελούν τις χρωστικές ουσίες. Αυτές οι χρωστικές ουσίες εξάγονται από φυσικές πηγές και χρησιμοποιούνται όπως αναφέρθηκε κυρίως στη φαρμακευτική βιομηχανία, σε βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργίας και βαφής, στη βιομηχανία τροφίμων και τη βιομηχανία καλλυντικών. Κάποιες συγκεκριμένες ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή που υπάρχουν και στην τομάτα, χρησιμοποιούνται για άρωμα, γεύση και χρώμα σε διάφορους τύπους τροφίμων εδώ και αρκετά χρόνια. Συγκεκριμένα το λυκοπένιο που εξάγεται από το μικρόβιο *Blakeslea trispora*, χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική για τον χρωματισμό τροφίμων σε κίτρινες έως κόκκινες αποχρώσεις. Ωστόσο, οι φυσικές χρωστικές ουσίες, όπως τα καροτενοειδή, δεν προσθέτουν μόνο χρώμα στα τρόφιμα, άλλα διαθέτουν επίσης και πολυάριθμες φαρμακευτικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, ανοσορρυθμιστικές, αντιπολλαπλασιαστικές, ανοσοκατασταλτικές και άλλες. Το λυκοπένιο είναι μία τέτοια χρωστική που χρησιμοποιείται αρκετά συχνά από τις βιομηχανίες. Θα πρέπει ωστόσο να εξασφαλιστεί ότι αυτό, όπως και άλλες παρόμοιες χρωστικές, παραμένουν αναλλοίωτα μέχρι την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο και θα μπορούν να διατηρήσουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες μέχρι την κατανάλωσή τους. Η παραγωγή φυσικών χρωστικών στην εποχή μας, παρουσιάζει κάποια βασικά μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι και η εξάρτηση των παραγωγών από την προσφορά πρώτης ύλης, καθώς το δυναμικό της είναι αμφίβολο όσον αφορά τη διαθεσιμότητα τους. Έτσι είναι σημαντικό να βρίσκονται και να αξιοποιούνται ως πρώτη ύλη εναλλακτικές πηγές, όπως είναι τα αναξιοποίητα παραπροϊόντα βιομηχανιών επεξεργασίας τομάτας [94].

2.4.1 Βιομηχανία Τροφίμων

Οι βιομηχανίες τροφίμων, σε όλο τον κόσμο, προκειμένου να κάνουν τα τρόφιμα τους ελκυστικά για τους καταναλωτές και να μπορούν να προσφέρουν μία ποικιλία τροφίμων σε αυτούς, χρησιμοποιούν κατά

κύριο λόγο χρωστικές για να το πετύχουν. Με βάση πρόσφατη μελέτη, σήμερα υπάρχουν περίπου 2,500 είδη πρόσθετων τροφίμων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, ενώ ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων (FDA), απαριθμεί περίπου 3,000 συστατικά στη βάση δεδομένων για τα πρόσθετα τροφίμων που διαθέτει. Πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη για την παρακολούθηση των επιπτώσεων κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων συνθετικών πρόσθετων από τον άνθρωπο, αναφέρει ότι αυτά είναι ικανά να οδηγήσουν σε γαστρεντερικά προβλήματα, αναπνευστικές διαταραχές, δερματολογικά προβλήματα και νευρολογικές ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Άλλες έρευνες αποδεικνύουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ υπερευαισθησίας, υπερκινητικότητας κατά την παιδική ηλικία και σωματικών και ψυχικών διαταραχών με τη δυσανεξία σε πρόσθετα τροφίμων. Ως αποτέλεσμα, τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες στρέφονται όλο και περισσότερο σε νέα στελέχη μικροοργανισμών και φυσικά προϊόντα, από τα οποία μπορούν με κατάλληλες μεθόδους να εξαχθούν φυσικές χρωστικές, προκειμένου να ικανοποιηθεί η υψηλή τους ζήτηση ως πρόσθετα τροφίμων και να παράγουν ασφαλέστερα και λιγότερο τοξικά προϊόντα. Παράλληλα, παρατηρείται μία τάση ευαισθητοποίησης του κοινού σχετικά με την υιοθέτηση διεργασιών φιλικών προς το περιβάλλον, βασισμένες στη διασφάλιση της ανθρώπινης ασφάλειας και προτίμηση κατανάλωσης φυσικών έναντι συνθετικών προϊόντων και τροφίμων. Έτσι οι καταναλωτές αποστρέφονται όλο και περισσότερο την εφαρμογή συνθετικών χρωστικών στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα οι φυσικές χρωστικές ουσίες να παρουσιάζουν συνεχώς μεγαλύτερη ζήτηση [95].

Οι πρώτες ύλες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για αυτό το σκοπό, από βιομηχανική ή διατροφική άποψη, είναι τα φρούτα και τα λαχανικά με υψηλό περιεχόμενο καροτενοειδών, λόγω της ικανότητας χρωματισμού, της δράσης της προβιταμίνης Α ή άλλων λειτουργικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε παραπροϊόντα της βιομηχανίας επεξεργασίας τροφίμων και γενικότερα αγροτικών προϊόντων (φλοιοί, υπολείμματα, κ.α.) με χρήση οργανικών διαλυτών.

Μια τέτοια χρωστική ουσία που προσφέρεται ως μία εναλλακτική για τα συνθετικά πρόσθετα τροφίμων είναι και το λυκοπένιο από τα παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας. Η χρήση του λυκοπενίου ως φυσική χρωστική σε τρόφιμα προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς εκτός των άλλων μπορεί να δράσει και ως αντιοξειδωτικό όταν προστεθεί σε προϊόντα διατροφής, λόγω των βιολογικών του λειτουργιών. Μπορεί ακόμα να λειτουργήσει θετικά κατά διαφόρων ασθενειών και να βοηθήσει στην πρόληψη εμφάνισής τους [94, 96]. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα λυκοπενίου από την τομάτα προορίζεται μέχρι τώρα για χρήση κυρίως ως χρωστική για τα τρόφιμα, παρέχοντας σε αυτά αποχρώσεις χρώματος, που κυμαίνονται από κίτρινο έως κόκκινο, όπως και τα φυσικά και συνθετικά λυκοπένια. Το εκχύλισμα λυκοπενίου από ντομάτα χρησιμοποιείται επίσης ως συμπλήρωμα διατροφής σε προϊόντα όπου η παρουσία λυκοπενίου παρέχει μια συγκεκριμένη πρόσθετη αξία (π.χ. αντιοξειδωτικό ή άλλα

σημαντικά οφέλη για την υγεία). Το προϊόν αυτό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό σε συμπληρώματα διατροφής. Οι κατηγορίες τροφίμων για τα οποία προορίζεται κυρίως αυτό το εκχύλισμα είναι: ψητά, δημητριακά, γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως κατεψυγμένα γαλακτοκομικά επιδόρπια, προϊόντα ανάλογα των γαλακτοκομικών προϊόντων, εμφιαλωμένο νερό, ανθρακούχα ποτά, χυμοί φρούτων και λαχανικών, ποτά από σόγια, καραμέλες, σουπες, σάλτσες σαλάτας και άλλα τρόφιμα και ποτά. Τα επίπεδα χρήσης εκχυλίσματος τομάτας, εκφρασμένα σε επίπεδα λυκοπενίου που προστίθενται στα τρόφιμα, εξαρτώνται από την προβλεπόμενη λειτουργία του και μπορεί να κυμαίνονται από 2 mg/l σε εμφιαλωμένο νερό έως 130 mg/kg σε δημητριακά έτοιμα προς κατανάλωση. Τα προϊόντα τροφίμων και ποτών διαμορφώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχουν περίπου 2 mg λυκοπενίου ανά μερίδα [52].

Έτσι τελικά, η προσθήκη των καροτενοειδών στα τρόφιμα μπορεί να αποφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα [11]:

1. Απόδοση χρώματος
2. Αύξηση της θρεπτικής αξίας του τροφίμου
3. Αύξηση της περιεκτικότητας σε λιποδιαλυτές αντιοξειδωτικές ουσίες
4. Αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων, κλπ.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η τάση των οδηγίων και των προδιαγραφών των κυβερνήσεων είναι η αύξηση των περιορισμών στα όρια του υπολειμματικού διαλύτη στο τελικό προϊόν και για αυτό το λόγο προτείνονται εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης για την εξαγωγή των χρωστικών αυτών, καθώς οι σύγχρονες τάσεις στη βιομηχανική παραγωγή κατευθύνονται προς την εφαρμογή περιβαλλοντικά ασφαλέστερων βιοτεχνολογικών διεργασιών.

2.5 Ζύμωση για παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού) από παραπροϊόντα επεξεργασμένης τομάτας

Η ζύμωση είναι μια διαδικασία αποσύνθεσης οργανικών ουσιών που προκαλείται από μικροοργανισμούς ή σύνθετες αζωτούχες ουσίες (ένζυμα) φυτικής ή ζωικής προέλευσης, για τη μετατροπή τους σε ένα οξύ ή μια αλκοόλη [97]. Τα τελευταία χρόνια, η ζύμωση χρησιμοποιείται ιδιαίτερα ως ένα εργαλείο για την ανάπτυξη νέων προϊόντων με τροποποιημένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, βελτιωμένη ποιότητα γεύσης και διατροφική αξία, πέρα από τη θεραπευτική δράση. Έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για την παραγωγή ζυμωμένων ποτών από φρούτα και λαχανικά. Τα ζυμωμένα τρόφιμα είναι πιο θρεπτικά από αυτά που δεν έχουν υποστεί

ζύμωση, λόγω της σύνθεσης ή της απελευθέρωσης θρεπτικών συστατικών από τους χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς [98, 99].

Η ζύμωση αποτελεί μία από τις παλαιότερες μορφές τεχνολογίας συντήρησης τροφίμων στον κόσμο. Ο όρος ζύμωση αρχικά χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την παράγωγή οίνου, αλλά στις μέρες μας αναφέρεται και για τα τρόφιμα που έχουν μετατραπεί με τη χρήση κατάλληλων μικροοργανισμών σε οξύ ή αλκοόλη. Κατά καιρούς έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού) από τη ζύμωση διαφόρων φυσικών πηγών όπως τα κρεμμύδια, τα σταφύλια και τα μήλα. Παρόλα αυτά, ελάχιστες μελέτες υπάρχουν για την παραγωγή ξυδιού από τη ζύμωση τοματών. Αυτό το καινοτόμο και εκλεκτό προϊόν υψηλής διατροφικής αξίας, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί λειτουργική τροφή για την αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων υγείας, όπως η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση, η υπεργλυκαιμία και η δυσλιπιδαιμία και έχει σημαντικές θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους που λάμβαναν δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, αποδείχθηκε ότι με την πρόσληψη συμπληρώματος ξυδιού τομάτας, μειώθηκε αισθητά το σωματικό βάρος του σπλαχνικού τους λίπους, χωρίς να χρειαστεί να αλλάξουν τις θερμίδες που προσλάμβαναν, ενώ μειώθηκαν ακόμη σημαντικά τα επίπεδα ηπατικών τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης τους. Σήμερα, παράγονται διάφορα είδη ξυδιού χρησιμοποιώντας διαφορετικές πρώτες ύλες και τεχνολογίες για διαφορετικές χρήσεις τα οποία και καταναλώνονται ευρέως λόγω των θετικών τους επιδράσεων στην υγεία, που οφείλονται στο κύριο συστατικό τους, που είναι το οξικό οξύ [100-104].

Η παραγωγή του οξικού οξέος γίνεται από τη μετατροπή της αιθυλικής αλκοόλης σε οξικό οξύ με τη βοήθεια ενός κατάλληλου γένους βακτηρίων. Ως εκ τούτου, το ξύδι μπορεί να παραχθεί από οποιοδήποτε αλκοολικό υλικό, είτε αυτό είναι ένα μίγμα αλκοόλης με νερό ή διάφορα κρασιά φρούτων και λαχανικών. Ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την παραγωγή του, διαφοροποιείται το χρώμα και το άρωμα του τελικού προϊόντος [98].

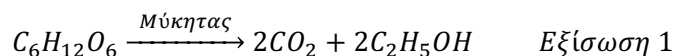
Μέθοδος παραγωγής

Η πιο συνήθης μέθοδος παραγωγής ξυδιού από τη ζύμωση χυμού τομάτας περιλαμβάνει δύο στάδια: το **πρώτο** είναι αυτό της αλκοολικής ζύμωσης παρουσία μύκητα, ενώ το **δεύτερο** είναι το στάδιο της οξικής ζύμωσης, παρουσία κατάλληλου βακτηρίου.

1^ο Στάδιο: Αλκοολική Ζύμωση

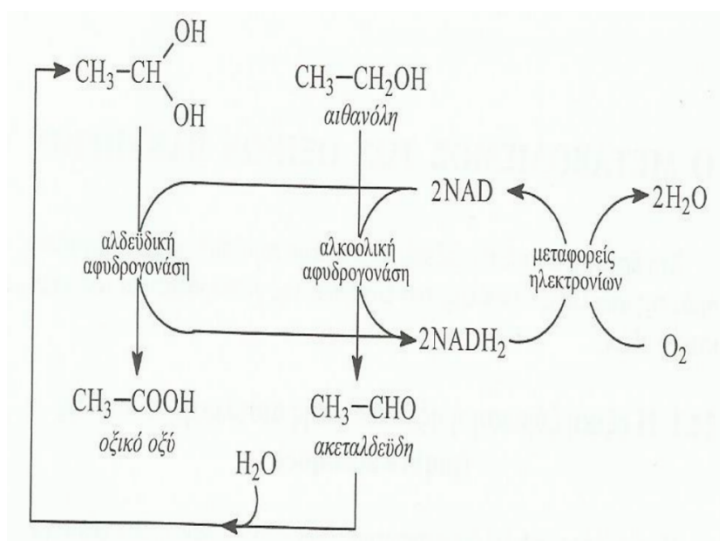
Σε αυτό το πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των υδατανθράκων και συγκεκριμένα των σακχάρων που περιέχονται στο χυμό της τομάτας, σε αιθυλική αλκοόλη, από κατάλληλους μύκητες

απουσία οξυγόνου (αναερόβιες συνθήκες). Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο είναι του γένους *Saccharomyces*, και ειδικότερα τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία ζυμώνουν τα σάκχαρα (γλυκόζη) και τα μετατρέπουν σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, όπως φαίνεται από την αντίδραση της Εξίσωσης 1 [105]:

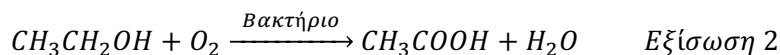


2^ο Στάδιο: Οξική Ζύμωση

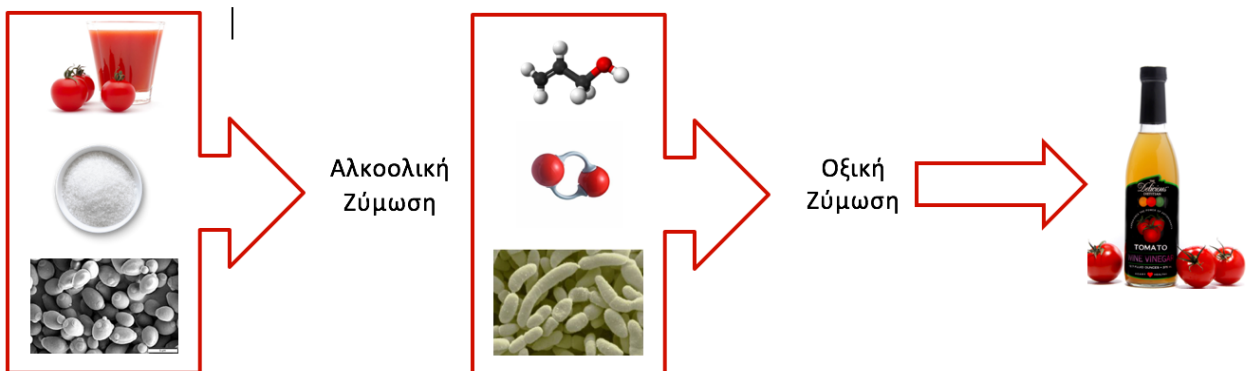
Στο δεύτερο αυτό στάδιο, η αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη) που έχει παραχθεί από το προηγούμενο στάδιο, μετατρέπεται σε οξικό οξύ δίνοντας το τελικό προϊόν. Αυτό γίνεται παρουσία κατάλληλου βακτηρίου, υπό αερόβιες συνθήκες, δηλαδή με κατανάλωση οξυγόνου. Επειδή η αντίδραση είναι υποχρεωτικά αερόβια, ο βαθμός ανάπτυξής τους καθορίζεται σημαντικά από το διαθέσιμο οξυγόνο και συνεπώς για τον έλεγχό της θα πρέπει να ελέγχεται η συγκέντρωση του οξυγόνου στο χώρο της αντίδρασης. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διεργασία είναι γνωστά ως οξικά βακτήρια του γένους *Acetobacter*. Η οξική ζύμωση είναι δύο σταδίων, καθώς πρώτα η αιθανόλη μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη και στη συνέχεια αυτή μετατρέπεται σε οξικό οξύ. Τα επιμέρους αυτά στάδια, καθώς και ο τύπος της αντίδρασης φαίνονται στην Εικόνα 14 και την Εξίσωση 2 αντίστοιχα.



Εικόνα 14: Οξείδωση της αιθανόλης από τα οξικά βακτήρια [106]



Για το στάδιο αυτό, είναι σημαντικό η συγκέντρωση της αλκοόλης στο μίγμα πριν ξεκινήσει η ζύμωση, να μην είναι μικρότερη από 2% ή μεγαλύτερη από 12%, διότι τότε οι μύκητες αδρανοποιούνται και η ζύμωση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, με αποτέλεσμα να μην παράγεται το τελικό επιθυμητό προϊόν [106, 107]. Στην Εικόνα 15 συνοψίζονται τα στάδια παραγωγής του οξικού οξέος από τον χυμό τομάτας, καθώς και οι πρώτες ύλες που απαιτούνται.



Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα των σταδίων παραγωγής οξικού οξέος από χυμό τομάτας [108-114]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η πλήρης εκμετάλλευση των παραπροϊόντων της βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας, για την ανάκτηση λυκοπενίου από το δέρμα της και την παραγωγή ξυδιού από τον πολτό που εξάγεται από τα υπόλοιπα παραπροϊόντα. Οι μέθοδοι και οι διεργασίες που επιλέγονται για την επίτευξη αυτού του στόχου, στηρίζονται σε βιβλιογραφική ανασκόπηση της τρέχουσας επιστημονικής γνώσης και σε άλλες μεθόδους που έχουν εφαρμοσθεί και έχουν ως γνώμονα τη χρήση περιβαλλοντικά βιώσιμων μεθόδων και τεχνικών. Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόσθηκε για τα στάδια εκχύλισης λυκοπενίου και παραγωγής οξικού οξέος από τα επιμέρους παραπροϊόντα βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας.

3.1.1 Αξιοποίηση δέρματος - Ανάκτηση Λυκοπενίου

Για την ανάκτηση του λυκοπενίου από το δέρμα της τομάτας, πραγματοποιείται εκχύλιση με συνδυασμένη μέθοδο με υπερήχους και μικροκύματα με τη χρήση του γαλακτικού αιθυλεστέρα ως διαλύτη. Ο οργανικός αυτός διαλύτης, έχει αποδειχθεί ότι επιφέρει αρκετά καλές αποδόσεις στην ανάκτηση των καροτενοειδών και κυρίως του λυκοπενίου, παρόμοιες με αυτές άλλων οργανικών διαλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν. Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (F.A.O.), θεωρείται ως ένας οικολογικός, μη τοξικός και άρα ασφαλής για κατανάλωση διαλύτης, με αποτέλεσμα το εκχύλισμα που προκύπτει να είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως πρόσθετο στη βιομηχανία τροφίμων [9, 52].

Για τον πειραματικό σχεδιασμό, αρχικά επιλέγονται με βάση την ανασκόπηση της επιστημονικής βιβλιογραφίας και αρχικά δοκιμαστικά πειράματα, οι βασικότερες παράμετροι ως προς τις οποίες θα βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της εκχύλισης, ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν σταθερές. Αναζητούνται οι τρεις κύριες παράμετροι που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την UMAE για την παραλαβή λυκοπενίου. Οι υπόλοιπες παράμετροι λαμβάνουν σταθερές τιμές κατά την εκτέλεση των πειραμάτων βελτιστοποίησης. Οι σταθερές αυτές τιμές προκύπτουν και πάλι βιβλιογραφικά και έπειτα από τη διεξαγωγή δοκιμαστικών πειραμάτων, ως οι πιο αποδοτικές για τη μέθοδο που εφαρμόζεται.

Έτσι επιλέγονται τελικά οι εξής σταθερές και μεταβλητές παράμετροι με τις αντίστοιχες τιμές τους:

1. Σταθερές παράμετροι

- Διάρκεια εκχύλισης: 8 min
- Ανάδευση: 230-280 rpm
- Είδος διαλύτη: 100% Γαλακτικός Αιθυλεστέρας
- Κοκκομετρία: 1000μm
- Θερμοκρασία: 45 - 50°C
- Υγρασία πρώτης ύλης: όλα τα δείγματα υπόκεινται σε ξήρανση υπό κενό και παραμένουν στους 40°C, μέχρι σταθερού βάρους (24 h).

2. Μεταβλητές παράμετροι

- Ένταση των μικροκυμάτων: 0, 200, 500 W
- Ένταση των υπερήχων: 0, 300, 600 W
- Αναλογία Στερεού: Διαλυτή 1:10, 1:20, 1:30 w/v

Να σημειωθεί, ότι επειδή για τη συσκευή των υπερήχων η ένταση μεταφράζεται ως ποσοστό επί τη μέγιστη δυνατή ένταση που μπορεί να εφαρμοσθεί (900 W), οι τιμές 0, 300 και 600 W αντιστοιχούν στις τιμές 0, 33 και 67% στη συσκευή.

Ο αριθμός των συνδυασμών που προκύπτουν για τρεις παραμέτρους αριστοποίησης και τρεις διαφορετικές τιμές για την κάθε παράμετρο –και ουσιαστικά αντιστοιχεί στον αριθμό των απαιτούμενων πειραμάτων- αντιστοιχεί σε 27. Για τη μείωση των πειραμάτων αυτών στον ελάχιστο δυνατό αριθμό και την εξαγωγή ταυτόχρονα, ασφαλών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων, εφαρμόζεται η μέθοδος του *Πειραματικού Σχεδιασμού Κεντρικού Σημείου (Central Composite Design)*. Με τον σχεδιασμό και τη χρήση του στατιστικού εργαλείου JMP 13, ο αριθμός των πειραμάτων μειώνεται τελικά στους 16 συνδυασμούς. Για να γίνει αυτό, το πρόγραμμα αντιστοιχίζει την τιμή της κάθε παραμέτρου με έναν κωδικό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Κωδικοποίηση των τιμών των μεταβλητών για την αριστοποίηση

Μεταβλητές	Κωδικοποίηση Τιμής		
	-1	0	1
<i>MW</i>	0	200	500
<i>US</i>	0	300	600
<i>Αναλογία</i>	1:10	1:20	1:30

Έτσι προκύπτουν οι τελικοί συνδυασμοί των μεταβλητών για τα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Στον πίνακα αναγράφονται οι τιμές αυτών των παραμέτρων με την κωδικοποίηση του πειράματος για τον κάθε συνδυασμό.

Πίνακας 5: Συνδυασμοί τιμών παραμέτρων για τα πειράματα αριστοποίησης των εκχυλίσεων

A/A	<i>MW (W)</i>	<i>US (W)</i>	<i>Αναλογία</i>	<i>Δείγμα</i>
1	0	600	1:30	E-111
2	200	600	1:20	E010
3	200	300	1:20	E000
4	200	0	1:20	E0-10
5	0	0	1:10	E-1-1-1
6	200	300	1:30	E001
7	500	300	1:20	E100
8	500	600	1:10	E11-1
9	200	300	1:20	E000
10	200	300	1:10	E00-1
11	0	600	1:10	E-11-1
12	0	300	1:20	E-100

13	500	0	1:30	E1-11
14	500	0	1:10	E1-1-1
15	500	600	1:30	E111
16	0	0	1:30	E-1-11

3.1.2 Αξιοποίηση συμπυκνωμένου χυμού παραπροϊόντων τομάτας- Παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού)

Ο χυμός και η πούλπα που παραλαμβάνονται από τη συμπίεση των παραπροϊόντων βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας και τις τομάτες που απορρίπτονται στο πρώτο στάδιο συλλογής της πρώτης ύλης, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού) με τη διεργασία της ζύμωσης. Από ανασκόπηση στη βιβλιογραφία [100] προκύπτει ότι η ζύμωση αυτή πραγματοποιείται σε δύο επιμέρους στάδια, το πρώτο της αλκοολικής και το δεύτερο της οξικής ζύμωσης.

Το πείραμα διεξάγεται σε συγκεκριμένες συνθήκες βασισμένες σε προηγούμενες μελέτες και εξετάζεται η δυνατότητα παραλαβής αυτού του προϊόντος σημαντικής διατροφικής και αγοραστικής αξίας, από παραπροϊόντα της τομάτας, καθώς και η περιεκτικότητά του σε λυκοπένιο και τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά (pH, οξύτητα, ολικά διαλυμένα στερεά).

Για το πρώτο στάδιο της ζύμωσης επιλέχθηκε η χρήση του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* που είναι ένας αναερόβιος και ανθεκτικός σε χαμηλές τιμές pH μικροοργανισμός, ενώ για το δεύτερο στάδιο χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus*, με βάση τη βιβλιογραφία. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH, που επιτρέπουν τη βέλτιστη ανάπτυξη και λειτουργία αυτών των μικροοργανισμών είναι αυτές που φαίνονται στους Πίνακες 6 και 7. Τα κύτταρα των μικροοργανισμών πολλαπλασιάζονται σε όλο το εύρος της διακυμάνσεως, μεταξύ των δύο ακραίων τιμών, ο ρυθμός όμως του πολλαπλασιασμού μειώνεται συνεχώς με τη μετακίνηση από το μέσο προς τα δύο άκρα μέχρι που πρακτικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και ο μεταβολισμός μηδενίζονται υπό αντίξοες συνθήκες.

Πίνακας 6: Εύρος διακύμανσης της θερμοκρασίας ανάπτυξης για τα επιλεγμένα μικρόβια

Εύρος διακύμανσης της θερμοκρασίας ανάπτυξης για τα μικρόβια			
Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum

Saccharomyces cerevisiae	0-7	20-35	40
Acetobacter pasteurianus	0-5	25-30	38-40

Πίνακας 7: Εύρος διακύμανσης του pH ανάπτυξης για τα επιλεγμένα μικρόβια

Εύρος διακύμανσης της τιμής του pH για την ανάπτυξη των μικροβίων

Μικροοργανισμοί	pH		
	Minimum	Optimum	Maximum
Saccharomyces cerevisiae	2.0-2.4	4.0-5.0	-
Acetobacter pasteurianus	4.0	5.4-6.3	-

Με βάση τις βέλτιστες αυτές συνθήκες ανάπτυξης και λειτουργίας των μικροοργανισμών και την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, επιλέγονται για το κάθε στάδιο ζύμωσης οι συνθήκες λειτουργίας που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 [115].

Πίνακας 8: Συνθήκες λειτουργίας του κάθε σταδίου ζύμωσης

Συνθήκες	Αλκοολική Ζύμωση	Οξική Ζύμωση
Μικροοργανισμός	Saccharomyces cerevisiae	Acetobacter pasteurianus
Θερμοκρασία (°C)	28-30	30
pH	4-5	5
Ανάδευση (rpm)	200	200
Διάρκεια (ημέρες)	3	9
Παρουσία Οξυγόνου	Όχι	Ναι

3.2 Υλικά

Σε αυτή την παράγραφο αναλύονται οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν.

3.2.1 Πρώτες Ύλες

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για τα πειράματα παράγεται στο εργαστήριο από τομάτες, κατά προτίμηση έντονου κόκκινου χρώματος, που αγοράζονται από μία υπαίθρια αγορά. Από αυτές προκύπτει ένα νωπό προϊόν, παρόμοιας σύστασης με αυτή του παραπροϊόντος τομάτας από τις αντίστοιχες βιομηχανίες επεξεργασίας. Το παραπροϊόν αυτό, μετά τον διαχωρισμό του δέρματος από τα σπόρια (Εικόνα 16), καταψύχεται στους -80°C , και αποψύχεται κάθε φορά η απαιτούμενη για χρήση ποσότητα.



Εικόνα 16: Νωπό παραπροϊόν δέρματος και σπόρων

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για τα πειράματα έχει την τελική μορφή που φαίνεται στην Εικόνα 17 και προκύπτει μετά από ξήρανση του νωπού παραπροϊόντος του δέρματος της τομάτας υπό κενό.



Εικόνα 17: Παραπροϊόν δέρματος μετά από ξήρανση και ομογενοποίηση

3.2.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια

Εκχυλίσεις

Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τις εκχυλίσεις CE, MAE, UAE και UMAE είναι γαλακτικός αιθυλεστερας (-)-Ethyl L- lactate καθαρότητας $\geq 98\%$ του εμπορικού οίκου Sigma-Aldrich. Για την εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet (SE), προτιμήθηκε το σύστημα διαλυτών εξάνιο : ακετόνη σε αναλογία 1:1 v/v, ως το σύστημα με την καλύτερη δυνατή απόδοση ως προς το λυκοπένιο με σχετικά χαμηλό σημείο βρασμού, έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση.

HPLC

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι ακετονιτρίλιο (Acetonitrile), 1-βουτανόλη (Butanol-(1)) και χλωριούχο μεθυλένιο (Dichloromethene), όλοι ποιότητας HPLC (HPLC grade) του εμπορικού οίκου Sigma-Aldrich.

Για τον σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για το λυκοπένιο, χρησιμοποιείται πυκνό εκχύλισμα λυκοπενίου γνωστής συγκέντρωσης, το οποίο υποβλήθηκε σε κατάλληλες αραιώσεις με χλωριούχο μεθυλένιο για την επίτευξη της επιθυμητής κάθε φορά συγκέντρωσης.

Ολική Οξύτητα

Για τον προσδιορισμό της ολικής οξύτητας του παραγόμενου προϊόντος της ζύμωσης, έγινε τιτλοδότηση με χρήση διαλύματος NaOH 0.1N και προσθήκη φαινολοφθαλεΐνης ως δείκτης.

Ζύμωση

Πριν τη ζύμωση χρειάστηκε να γίνει προκαλλιέργεια των μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Έτσι απαιτήθηκαν τα αντιδραστήρια tryptone, Yeast Extract, NaCl και Άγαρ για τη σύνθεση του μέσου LB, καθώς και Yeast Extract, Peptone from Meat και Glucose (D-(+)-Glucose monohydrate) για την παραγωγή YPG μέσου καλλιέργειας. Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια λήφθηκαν από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής και ανήκαν στους εμπορικούς οίκους Sigma-Aldrich και Fluka Analytical.

3.2.3 Μικροοργανισμοί

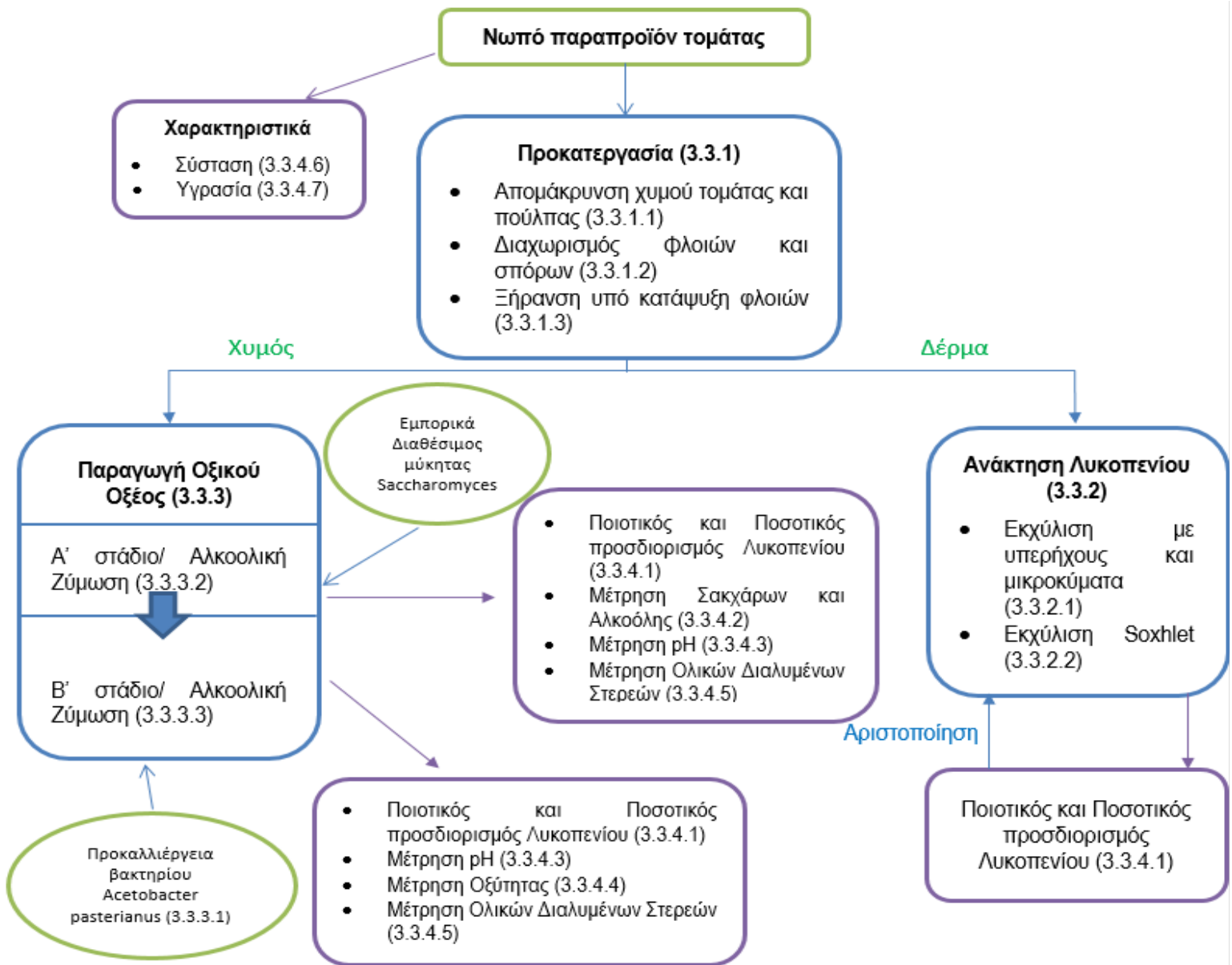
Στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος προμηθεύτηκε από την εταιρία «ΓΙΩΤΗΣ» (ξηρή Μαγιά Στιγμής ΓΙΩΤΗΣ).

Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 από την DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), το οποίο λήφθηκε από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της σχολής, όπου και έγιναν τα πειράματα για την προκαλλιέργεια του.

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν απιονισμένο H₂O, Ακετόνη, συμπιεσμένο O₂, πρότυπα διαλύματα pH 4 και 7 (Buffer) για τη βαθμονόμηση των πεχαμέτρων πριν τη χρήση και διαλύτες μεθανόλης και ισοπροπανόλης για τον καθαρισμό της στήλης.

3.3 Μέθοδοι – Όργανα και Συσκευές

Στην Εικόνα 18, παρουσιάζεται το διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας, η οποία ακολουθήθηκε και αναλύεται λεπτομερώς στη συνέχεια.



Εικόνα 18: Διάγραμμα πειραματικής διαδικασίας. Οι πρώτες ύλες, που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται με **πράσινο** χρώμα, οι διεργασίες με τις οποίες ανακτήθηκε το λυκοπένιο και παρήχθη το οξικό οξύ, καθώς και οι διεργασίες προ κατεργασίας των Α' Υλών με **μπλε** χρώμα, και τέλος οι μεθοδολογίες χαρακτηρισμού με **μωβ** χρώμα

3.3.1 Προ κατεργασία Νωπού παραπροϊόντος τομάτας

3.3.1.1 Απομάκρυνση χυμού τομάτας και πούλπας

Οι τομάτες που αγοράστηκαν, αρχικά διαχωρίστηκαν από αυτές που δεν ήταν αρκετά ώριμες και όσες παρουσίαζαν προχωρημένη σήψη και στη συνέχεια πλύθηκαν προσεκτικά. Για την απομάκρυνση της πούλπας και του χυμού, οι τομάτες αυτές συμπιέστηκαν μέσα από κόσκινο κατάλληλου πλέγματος, για τη συγκράτηση του δέρματος και των σπόρων. Έτσι παράχθηκε το τσίπουρο τομάτας, που αποτελεί το κύριο παραπροϊόν των βιομηχανιών. Στη συνέχεια το παραπροϊόν αυτό συμπιέστηκε περαιτέρω για την παραλαβή συμπυκνωμένου χυμού, ο οποίος χρησιμοποιείται μαζί με τον χυμό από τις τομάτες που απορρίφθηκαν στην αρχή, για την παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού).

3.3.1.2 Διαχωρισμός δέρματος και σπόρων

Για την καλύτερη αξιοποίηση των παραπροϊόντων επιλέχθηκε να γίνει διαχωρισμός του δέρματος της τομάτας από τους σπόρους σε δεξαμενή καθίζησης με απιονισμένο νερό. Ο διαχωρισμός τους γίνεται με τη συλλογή του δέρματος της τομάτας που ανέρχεται στην επιφάνεια της δεξαμενής, ενώ οι σπόροι παραμένουν στον πυθμένα και μπορούν να συλλεχθούν με απόχυση του υπόλοιπου νερού μετά το τέλος.

3.3.1.3 Ξήρανση υπό κατάψυξη φλοιών

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων εκχύλισης απαιτείται η ξήρανση του δέρματος και στη συνέχεια η ομογενοποίηση και το κοσκίνισμά τους με σκοπό την παραλαβή σκόνης γνωστής κοκκομετρίας.

Το δέρμα τοποθετήθηκε αρχικά σε καταψύκτη (Panasonic, MDF-U3386S) σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Εικόνα 19). Μετά από 72 ώρες, μεταφέρθηκε στη συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (Leybold – Heraeus, GT 2A) για άλλες 24 ώρες. Η ξήρανση πραγματοποιήθηκε υπό κενό (Εικόνα 20.ΙΙ).



Εικόνα 19: Καταψύκτης Panasonic, MDF-U3386S, -80 °C



Εικόνα 20: Συσκευή ξήρανσης υπό κατάψυξη (I) και υπό κενό (II)

Το ξηρό παραπροϊόν, υπόκειται στη συνέχεια σε ομογενοποίηση με οικιακό αναμίκτη για την άλεση του και την επίτευξη παρόμοιας κοκκομετρίας στη μάζα του. Για τον έλεγχο της κοκκομετρίας, το ξηρό και αλεσμένο δείγμα, διέρχεται από κόσκινα πλέγματος 1170 – 1000 μm. Έπειτα το υλικό τοποθετείται σε

φούρνο κενού (Εικόνα 20.1) στους 40°C για 24 ώρες μέχρι σταθερού βάρους και αποθηκεύεται σε ξηραντήρες για τη διατήρησή του μέχρι τη χρήση για τις εκχυλίσσεις.

3.3.2 Ανάκτηση Λυκοπενίου

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του λυκοπενίου από ξηρά παραπροϊόντα τομάτας είναι η συνδυασμένη εκχύλιση με υπερήχους και με μικροκύματα (UMAE) και η εκχύλιση Soxhlet (SE) για την εύρεση της μέγιστης δυνατής ανακτώμενης ποσότητας από το συγκεκριμένο δείγμα. Παρακάτω αναλύεται η πειραματική διαδικασία σε κάθε περίπτωση.

3.3.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους και μικροκύματα

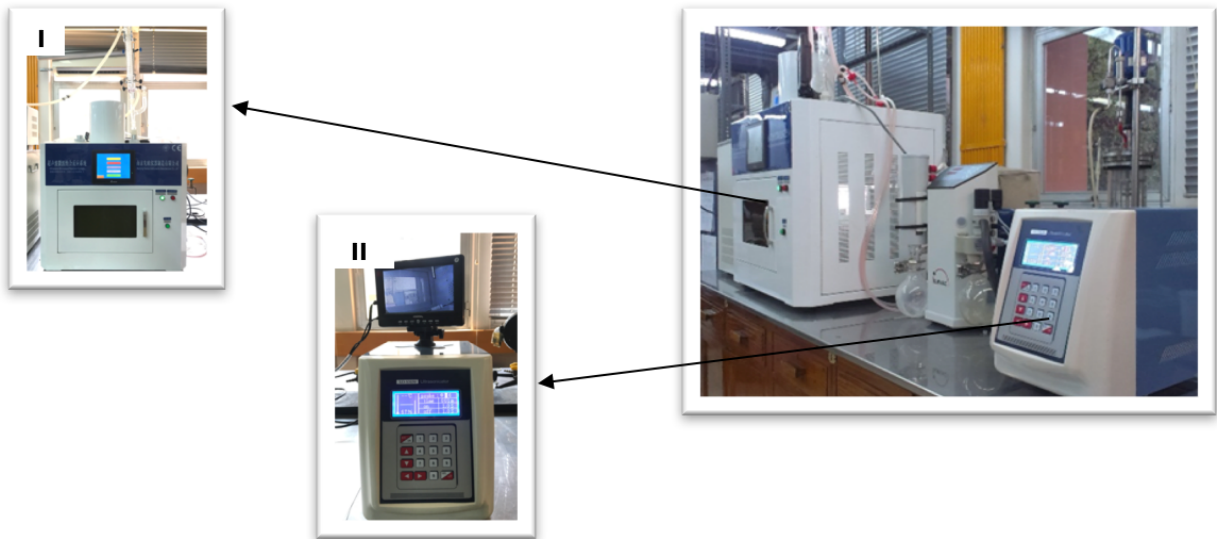
Αρχικά η ξηρή σκόνη του δέρματος ζυγίζεται σε κατάλληλη ποσότητα, ανάλογα με την τιμή της αναλογίας για κάθε πείραμα, και αναμιγνύεται με 50mL γαλακτικού αιθυλεστέρα, ο οποίος αποτελεί τον διαλύτη εκχύλισης. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται η ακριβής ποσότητα σκόνης που ζυγίστηκε για κάθε πείραμα.

Πίνακας 9: Αναλογίες στερεού : διαλύτη και ακριβείς ποσότητες ξηρής σκόνης δέρματος που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα

<i>Δείγμα</i>	<i>Αναλογία</i>	<i>Ποσότητα ξηρής σκόνης δέρματος (g)</i>
<i>E-111</i>	1:30	1.720
<i>E010</i>	1:20	2.632
<i>E000</i>	1:20	2.631
<i>E0-10</i>	1:20	2.631
<i>E-1-1-1</i>	1:10	5.563
<i>E001</i>	1:30	1.724
<i>E100</i>	1:20	2.633
<i>E11-1</i>	1:10	5.565
<i>E000</i>	1:20	2.634
<i>E00-1</i>	1:10	5.562

<i>E-11-1</i>	1:10	5.564
<i>E-100</i>	1:20	2.634
<i>E1-11</i>	1:30	1.721
<i>E1-1-1</i>	1:10	5.562
<i>E111</i>	1:30	1.721
<i>E-1-11</i>	1:30	1.721

Η εκχύλιση των δειγμάτων για την ανάκτηση του λυκοπενίου από το δείγμα πραγματοποιείται στη συσκευή εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα (Ultrasonic/ Microwave Reaction System, XO-SM Series). Το δοχείο εκχύλισης τοποθετείται στον θάλαμο της συσκευής όπου εφαρμόζονται τα μικροκύματα (Εικόνα 21.I). Αντίστοιχα οι υπέρηχοι ενεργοποιούνται, όπου απαιτείται, από την αντίστοιχη συσκευή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21.II.



Εικόνα 21: Διάταξη εκχύλισης UMAE, I) Συσκευή MAE, II) Συσκευή UAE

Στη συνέχεια για κάθε πείραμα ρυθμίζονται οι σταθερές και μεταβλητές παράμετροι (ανάδευση, μέγιστη θερμοκρασία, ένταση μικροκυμάτων και υπερήχων).

Οι σταθερές παράμετροι όπως εισάγονται στην κάθε συσκευή φαίνονται παρακάτω:

(a) Ultrasonic Microwave Reaction System

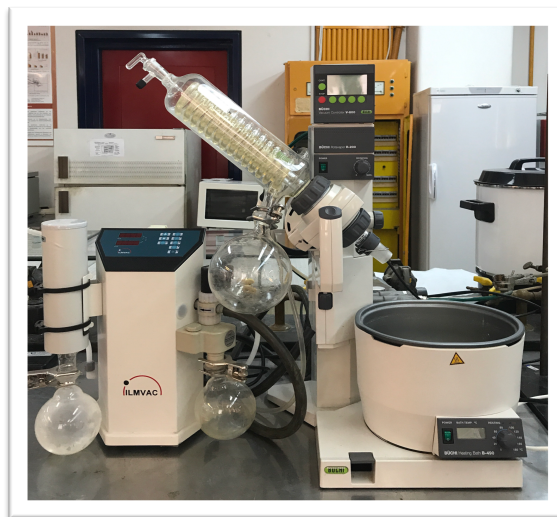
- Stirrer: 230-280 rpm (ανάλογα με την αναλογία, ώστε να διασφαλίζεται καλή ανάδευση)
- Set Temperature: 45°C
- Time: 8 min

(b) Ultrasonicator

- On: 1 sec (διάρκεια ψεκασμού)
- Off: 1 sec (χρόνος μέχρι τον επόμενο ψεκασμό)
- Time: 8 min

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, το περιεχόμενο του δοχείου της εκχύλισης τοποθετείται σε κατάλληλους περιέκτες και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 2,500 rpm (Nuve, NF 400). Μετά τη φυγοκέντριση, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη για τη συμπύκνωσή του και την παραλαβή του τελικού εκχυλίσματος.

Η συμπύκνωση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού Büchi Rotavapor R-200, με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi Heating Bath B-490 (Büchi Laboratories Technik AG, Flawil, Switzerland) ρυθμισμένο στους 40-45°C (Εικόνα 22). Μετά την ολοκλήρωση της εξάτμισης το εκχύλισμα παραλαμβάνεται με την προσθήκη 1 ml χλωριούχου μεθυλενίου. Για την αποφυγή της οξείδωσης του λυκοπενίου, προστίθεται σε αυτό μικρή ποσότητα τριτοταγούς βουτυλο-υδροκινόνης (TBHQ).



Εικόνα 22: Διάταξη συσκευής εξάτμισης υπό κενό

Παράμετροι αριστοποίησης

Οι παράμετροι αριστοποίησης που εξετάζονται κατά την εκχύλιση είναι η ένταση των μικροκυμάτων, η ένταση των υπερήχων και η αναλογία στερεού : διαλύτη. Οι επιλεγόμενες τιμές των παραμέτρων που εφαρμόστηκαν για κάθε πείραμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

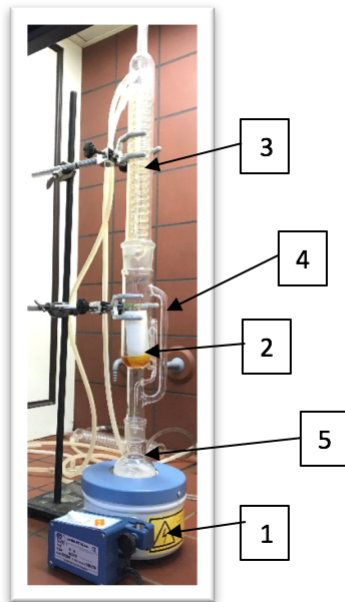
3.3.2.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet εφαρμόσθηκε προκειμένου να υπολογισθεί η περιεχόμενη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο (θεωρείται ότι με αυτή τη μέθοδο ανακτάται περίπου το 100% της περιεχόμενης ποσότητας) ώστε να υπολογισθεί η απόδοση της εκχύλισης με υπερήχους και μικροκύματα για την αριστοποίηση της διεργασίας. Η διάταξη της συσκευής περιλαμβάνει σφαιρική φιάλη, τοποθετημένη σε θερμαντικό μανδύα, με προσαρτημένο οριζόντιο θάλαμο εκχύλισης και συμπυκνωτήρα στο πάνω μέρος της. Ο συμπυκνωτήρας συνδέεται με παροχή νερού ως ψυκτικό. Το δείγμα τοποθετείται σε περιέκτη από πεπιεσμένο χαρτί, στον ειδικό θάλαμο της εκχυλιστικής διάταξης (Εικόνα 23).

Για αυτή την τεχνική εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε αναλογία στερεού παραπροϊόντος : μίγματος εξανίου-ακετόνης 1:20 w/v. Το σύστημα αυτό των διαλυτών, όπως βρέθηκε βιβλιογραφικά, έχει αυξημένη απόδοση, καθώς και σχετικά χαμηλό σημείο βρασμού κοντά στους 50°C, ώστε να αποφευχθεί η αποσύνθεση του λυκοπενίου που εκχυλίζεται.

Ως κριτήριο ολοκλήρωσης της διεργασίας, χρησιμοποιείται το χρώμα του εκχυλιζόμενου διαλύματος πριν από κάθε σιφωνισμό. Έτσι η απουσία πορτοκαλοκόκκινης απόχρωσης στο θάλαμο εκχύλισης, υποδηλώνει την σχεδόν πλήρη παραλαβή του λυκοπενίου από το δείγμα και άρα τον τερματισμό της διεργασίας.

Η διαδικασία της εκχύλισης μέχρι τον σχεδόν πλήρη αποχρωματισμό του εκχυλίσματος στον εκχυλιστήρα, διαρκεί περίπου 4 ώρες, κατά την οποία πραγματοποιούνται 10 σιφωνισμοί, κάθε 7 περίπου λεπτά, με εξαίρεση τον πρώτο σιφωνισμό, που αργεί μέχρι να ξεκινήσει ο βρασμός. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης, συμπυκνώνεται υπό κενό στα 420 mbar και τους 40 °C μέχρι σχεδόν ξηρού και το επιθυμητό τελικό συστατικό λαμβάνεται με διάλυση με μικρή ποσότητα χλωριούχου μεθυλενίου.



Εικόνα 23: Διάταξη της εκχύλισης Soxhlet για την εκχύλιση λυκοπενίου, όπου 1: Θερμαντικός μανδύας, 2: Εκχύλισμα πριν από κάθε σιφωνισμό, 3: Συμπυκνωτήρας, 4: Θάλαμος εκχύλισης και 5: Σφαιρική φιάλη με το μίγμα των διαλυτών της εκχύλισης

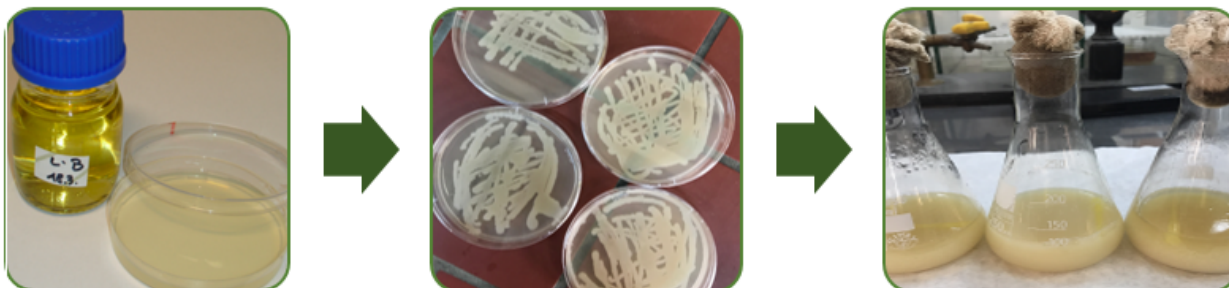
3.3.3 Παραγωγή Οξικού Οξέος (Ξυδιού)

Η διαδικασία της ζύμωσης για την παραγωγή του οξικού οξέος (ξυδιού) από χυμό τομάτας πραγματοποιείται σε δύο επιμέρους στάδια ζυμώσεων, η πειραματική διαδικασία των οποίων μαζί με κάθε απαιτούμενο στάδιο πριν τη ζύμωση, αναλύονται παρακάτω.

3.3.3.1 Προκαλλιέργεια - διατήρηση μικροοργανισμών

Το στέλεχος του βακτηρίου *Acetobacter pasteurianus* που ήταν αποθηκευμένο στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης για τη διατήρησή του, αναπτύχθηκε αρχικά σε τρυβλίο και στη συνέχεια επωάστηκε σε κωνική φιάλη με κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις, συντέθηκαν στο εργαστήριο και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121°C για 1.5 ώρα. Για τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο LB (περιέχει σε g/l απιονισμένο νερό: tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g και agar 15g), ενώ για τις κωνικές χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο YPG (περιέχει σε g/l απιονισμένο νερό: peptone 3g, yeast extract 5g και glucose 20g). Τα τρυβλία με LB εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του βακτηρίου και επωάστηκαν για 24 ώρες, στους 27°C . Στη συνέχεια αφού το βακτήριο αναπτύχθηκε επαρκώς, εμβολιάστηκε στις κωνικές φιάλες, η κάθε μία από τις οποίες περιείχε 100 ml από το θρεπτικό YPG. Οι φιάλες έπειτα τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενο επωαστήριο υπό αερόβιες

συνθήκες με περιστροφική κίνηση 180 rpm και θερμοκρασία 27 °C. Η ανάπτυξη διήρκησε 72 h, σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία [116]. Η διαδικασία καλλιέργειας των βακτηρίων φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 24.



Εικόνα 24: Στάδια καλλιέργειας του βακτηρίου *Acetobacter pasteurianus*

3.3.3.2 Παραγωγή Αιθανόλης – Α' στάδιο Ζύμωσης (αλκοολική ζύμωση)

Πριν την έναρξη της διαδικασίας ζύμωσης για την παραγωγή του τελικού προϊόντος, ο βιοαντιδραστήρας προετοιμάζεται κατάλληλα. Για το λόγο αυτό, γίνεται βαθμονόμηση του πεχαμέτρου που βρίσκεται στη διάταξη με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων (Buffer), τιμών pH 4 και 7 και ο βιοαντιδραστήρας αποστειρώνεται, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του περιεχομένου του και η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση.

Αποστείρωση

Προστίθεται απιονισμένο νερό στον αντιδραστήρα, το οποίο θερμαίνεται αρχικά στους 50°C με ανάδευση 100 στροφές /λεπτό για να γίνει λίπανση του μηχανικού εξοπλισμού ανάδευσης και στη συνέχεια στους 85 °C και 150 στροφές /λεπτό για 20 λεπτά. Έπειτα οι στροφές αυξάνονται στις 1000 /λεπτό και η αποστείρωση πραγματοποιείται στους 121°C για 30 περίπου λεπτά. Παράλληλα με το εσωτερικό του αντιδραστήρα, αποστειρώνεται και η βάνα δειγματοληψίας και εξόδου.

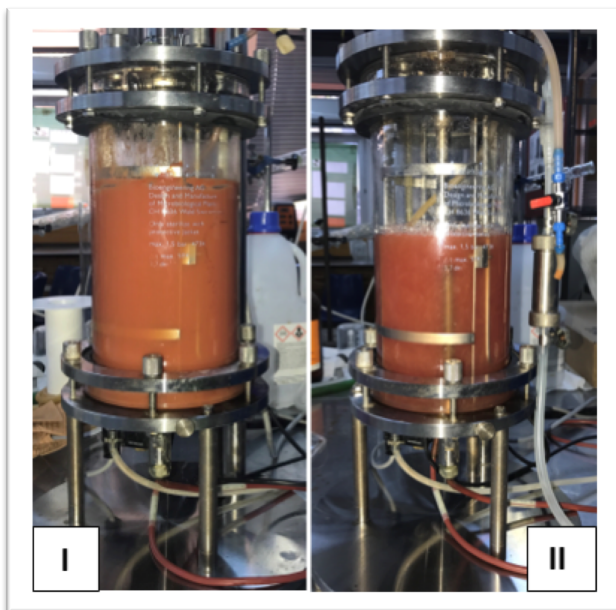
Για τη μετατροπή των σακχάρων που περιέχονται στον χυμό της τομάτας, σε αιθανόλη προστίθεται στον αντιδραστήρα ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* (0,4%, w/v), οποίος λαμβάνεται από εμπορικά διαθέσιμο προϊόν (μαγιά). Ο χυμός τομάτας ενισχύεται με ποσότητα ζάχαρης με σκοπό το διάλυμα να φθάσει την επιθυμητή τιμή των 13°Brix. Το μίγμα αυτό μεταφέρεται στον βιοαντιδραστήρα (Εικόνα 25.1) και πραγματοποιείται η ζύμωση στους 30°C με ανάδευση στις 200 στροφές/λεπτό για τρεις ημέρες, σε αναερόβιες συνθήκες. Σε αυτό το διάστημα λαμβάνονται δείγματα από το περιεχόμενο του αντιδραστήρα, για τη μέτρηση της ποσότητας των περιεχόμενων σακχάρων και τον έλεγχο του pH, το

οποίο δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 5. Μετά το πέρας του πρώτου σταδίου της ζύμωσης, το κρασί τομάτας που έχει παραχθεί παραλαμβάνεται από τον αντιδραστήρα και φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση των στερεών και του μύκητα. Στη συνέχεια αφού μετρηθούν τα ολικά στερεά, η οξύτητα (σε τρυγικό οξύ), το pH και η περιεκτικότητά του σε λυκοπένιο, το κρασί επιστρέφεται στον αντιδραστήρα για το δεύτερο στάδιο της ζύμωσης.

3.3.3 Παραγωγή Οξικού Οξέος – Β' στάδιο Ζύμωσης (Οξική ζύμωση)

Στο δεύτερο στάδιο (Εικόνα 25.ΙΙ) πραγματοποιείται η μετατροπή της αιθανόλης που έχει παραχθεί από το πρώτο στάδιο και υπάρχει στο κρασί τομάτας, σε οξικό οξύ για την παραλαβή του τελικού προϊόντος. Το κρασί τομάτας που βρίσκεται στον βιοαντιδραστήρα, εμβολιάζεται με το βακτήριο *Acetobacter pasteurianus* 3509 (10% v/v), που έχει αναπτυχθεί προηγουμένως κατάλληλα, και ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 30°C και οι στροφές στις 200 /λεπτό. Η οξική ζύμωση είναι αερόβια διεργασία και για το λόγο αυτό παρέχεται επαρκής ποσότητα οξυγόνου στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, το οποίο διήρκησε 9 ημέρες, λαμβάνονται δείγματα καθημερινά προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε οξικό οξύ και να ελέγχεται η τιμή του pH.



Εικόνα 25: Στάδια ζυμώσεων στον βιοαντιδραστήρα, Ι) 1^ο Στάδιο Αλκοολικής Ζύμωσης, ΙΙ) 2^ο Στάδιο Οξικής Ζύμωσης

3.3.4 Μέτρηση χαρακτηριστικών Α' ύλης, εκχυλισμάτων και τελικών προϊόντων

3.3.4.1 Ποιοτικός και Ποσοτικός προσδιορισμός Λυκοπενίου

Για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του λυκοπενίου χρησιμοποιείται η μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) η οποία είναι συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (Diode Array Detector - DAD). Τα δείγματα, αφού διηθηθούν μέσω ηθμού μεμβράνης 0.45 μm για την κατακράτηση υπολειμμάτων σκόνης και στερεών, τοποθετούνται σε κατάλληλους περιέκτες (vial) για ανάλυση στο HPLC. Για κάθε πείραμα πραγματοποιούνται τρεις επαναλήψεις από το ίδιο εκχύλισμα στο HPLC, ενώ για τις βέλτιστες συνθήκες το πείραμα επαναλήφθηκε από την αρχή και το δείγμα αναλύθηκε ξανά για επαλήθευση του αποτελέσματος. Εκτός από τα δείγματα, κάθε νέα ημέρα ανάλυσης, αναλύεται και ένα «τυφλό» δείγμα, το οποίο περιέχει καθαρό τον διαλύτη των δειγμάτων (χλωριούχο μεθυλένιο), προκειμένου να ελεγχθεί ότι η συσκευή έχει καθαριστεί αποτελεσματικά. Ένα παράδειγμα χρωματογραφήματος ενός τέτοιου «τυφλού» δείγματος παρουσιάζεται στο Παράρτημα (Εικόνα 44).

Η ανάλυση των δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο της μεθόδου βαθμωτής έκλουσης που προτείνεται από τους Lin & Chen [49] για το διαχωρισμό καρροτενοειδών από επεξεργασμένο τοματοχυμό. Από μελέτες και άλλων ερευνητών [117, 118], προκύπτει το πλέον κατάλληλο σύστημα διαλυτών για τον προσδιορισμό και την ανάλυση του εκχυλίσματος σε λυκοπένιο. Έτσι, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής: ακετονιτρίλιο (διαλύτης Α), 1-βουτανόλη (διαλύτης Β) και χλωριούχο μεθυλένιο (διαλύτης Γ). Η αρχική σύσταση της κινητής φάσης είναι 69.3% Α, 29.7% Β και 1.0% Γ, ενώ μεταβάλλεται γραμμικά σε 67.2% Α, 28.8% Β και 4.0% Γ στα πρώτα 10 min της ανάλυσης, σε 61.6% Α, 26.4% Β και 12.0% Γ μετά από 20 min ανάλυσης, 49% Α, 21% Β και 30% Γ μετά από 40 min και τέλος επανέρχεται σε 69.3% Α, 29.7% Β και 1.0% Γ μετά από 50 min, ολοκληρώνοντας την ανάλυση. Η ροή του συστήματος διαλυτών παραμένει σταθερή σε όλα τα στάδια με 2 mL/ min, ενώ ο όγκος του εισαγόμενου δείγματος που απαιτείται για την ανάλυση, είναι 20 μL. Ως βασικό μήκος κύματος για την ανίχνευση του λυκοπενίου, επιλέγεται έπειτα από ανασκόπηση στη βιβλιογραφία, η τιμή 476 nm που ανταποκρίνεται στο χαρακτηριστικό σημείο απορρόφησης του all-trans λυκοπενίου. Για την επεξεργασία του φάσματος UV-Vis, χρησιμοποιείται κατάλληλο λογισμικό που είναι εγκατεστημένο σε σταθερό υπολογιστή και συνδέεται με τον χρωματογράφο. Στην Εικόνα 26 φαίνεται η διάταξη της συσκευής του HPLC-DAD που διαθέτει το εργαστήριο και χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις.



Εικόνα 26: Συσκευή HPLC-DAD

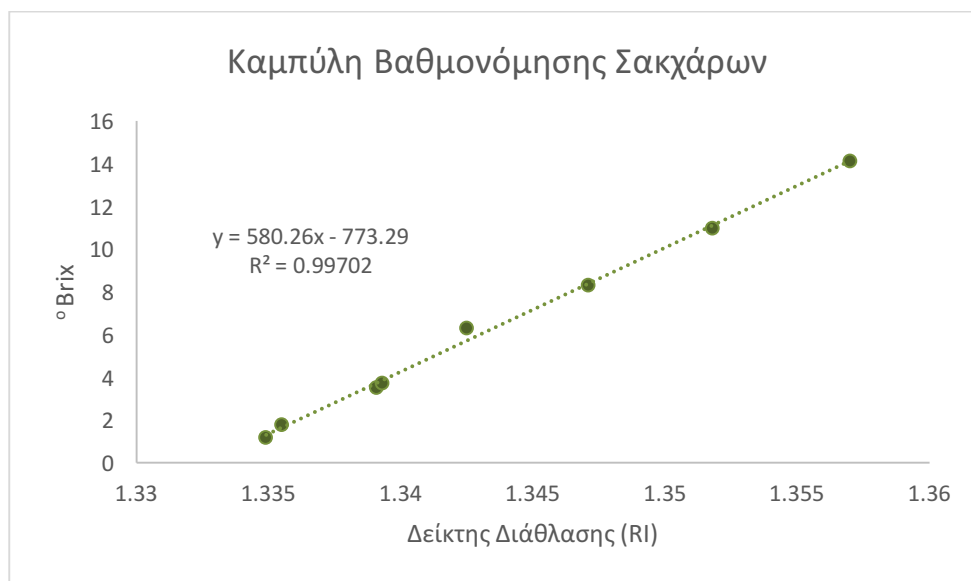
Η **ταυτοποίηση** του λυκοπενίου στο χρωματογράφημα που προκύπτει, πραγματοποιείται με τη σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης και του φάσματος απορρόφησης με τα αντίστοιχα για την πρότυπη ουσία. Για τον **ποσοτικό προσδιορισμό**, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με χρήση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης λυκοπενίου.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για το λυκοπένιο, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό, προκύπτει από πυκνό διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης σε λυκοπένιο με κατάλληλες αραιώσεις με χλωριούχο μεθυλένιο, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό εύρος συγκεντρώσεων. Στα 6 πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν συνολικά οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 1000, 750, 500, 250, 125 και 62.5 μg λυκοπενίου/mL, με ένα εύρος δηλαδή να κυμαίνεται από 62.5 έως 1000 μg λυκοπενίου/ mL εκχυλίσματος. Από τα αποτελέσματα ανάλυσης αυτών των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο HPLC, κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης και προκύπτει η εξίσωση που μετατρέπει το σήμα του ανιχνευτή -που μεταφράζεται σε εμβαδό κορυφής- σε συγκέντρωση λυκοπενίου στο εκχύλισμα σε $\mu\text{g}/\text{ml}$ εκχυλίσματος (Παράγραφος 4.2).

3.3.4.2 Μέτρηση Σακχάρων και Αλκοόλης

Η μέτρηση των σακχάρων πραγματοποιείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, στα δείγματα που λαμβάνονται από το βιοαντιδραστήρα κατά την αλκοολική ζύμωση του χυμού, ενώ η αλκοόλη υπολογίζεται στοιχειομετρικά από την αντίδραση.

Η μέτρηση των σακχάρων γίνεται μέσω του δείκτη διάθλασης του δείγματος μετά από φυγοκέντρηση. Η ένδειξη του διαθλασίμετρου μετατρέπεται σε °Brix από καμπύλη βαθμονόμησης που έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριο (Διάγραμμα 1) χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δείγματα χυμού τομάτας γνωστής περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Για να κατασκευαστεί η καμπύλη αρχικά μετρήθηκαν τα ολικά στερεά του χυμού που χρησιμοποιήθηκε, τα οποία και υποτέθηκε ότι ταυτίζονται με τα ολικά σάκχαρα για αυτή την περίπτωση.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη μετατροπή του μετρούμενου δείκτη διάθλασης σε °Brix

3.3.4.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται με τη συσκευή Multiparameter Bench Meter (Εικόνα 28) (Mi 180, MARTINI instruments). Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH. Κατόπιν σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετείται επαρκής ποσότητα δείγματος έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο να είναι εμβαπτισμένο και να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού. Η θερμοκρασία του δείγματος πρέπει να είναι 20 – 25 °C. Όταν η τιμή σταθεροποιηθεί λαμβάνεται η μέτρηση.



Εικόνα 27: Συσκευή Multiparameter Bench Meter για τη μέτρηση του pH των δειγμάτων

3.3.4.4 Μέτρηση ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας

Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο ξύδι, σε μοριακή κατάσταση και σε μορφή ανιόντων, αποτελεί την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα. Ο προσδιορισμός της γίνεται με τιτλοδότηση και βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκάλειας παρουσία ενός δείκτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1 N και δείκτης φαινολοφθαλεΐνη. Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε είναι:

Σε κωνική φιάλη μεταφέρονται 5 mL φυγοκεντρημένου δείγματος, 45 mL αποσταγμένου νερού και 2 - 3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Η τιτλοδότηση πραγματοποιείται με το διάλυμα καυστικού νατρίου 0.1 N το οποίο και προστίθεται στο δείγμα, όσο αυτό αναδεύεται έως ότου εμφανιστεί ρόδινο χρώμα, το οποίο θα πρέπει να παραμένει σταθερό για 30 sec. Η αραίωση του δείγματος με νερό γίνεται προκειμένου να μπορεί να παρατηρηθεί ευκολότερα η αλλαγή του χρώματος. Στη συνέχεια, από την Εξίσωση 3 υπολογίζεται η % οξύτητα των τιτλοδοτούμενων δειγμάτων.

$$\% \text{ οξικό οξύ} = \frac{N * V * M}{S * 10} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

Όπου:

N: Κανονικότητα (Normality) διαλύματος NaOH (N)

V: Όγκος NaOH που καταναλώθηκε (mL)

M: Μοριακό Βάρος κυρίαρχου οξέος στο διάλυμα προς τον αριθμό των ιόντων υδρογόνου (H⁺) στο μόριο του οξέος που εξουδετερώθηκαν (60 για το οξικό οξύ)

S: Μέγεθος δείγματος σε mL ή g.

Η % περιεκτικότητα σε οξύ υπολογίζεται ως ποσότητα του κυρίαρχου οξέος σε g ανά 100g ή 100mL του δείγματος.

3.3.4.5 Μέτρηση των ολικών διαλυμένων στερεών

Τα ολικά διαλυμένα στερεά αποτελούν μαζί με την ολική οξύτητα πολύ σημαντικοί δείκτες των χυμών φρούτων και λαχανικών. Τα ολικά διαλυμένα στερεά αναφέρονται σε διαλυτά συστατικά των χυμών τα οποία αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα και μικρότερες ποσότητες οργανικών οξέων, βιταμινών, πρωτεϊνών, αμινοξέων, αιθέριων ελαίων και γλυκοσιδίων. Τα σάκχαρα αποτελούν περίπου το 85-98% των ολικών διαλυμένων στερεών στους χυμούς. Το ποσοστό αυτό διαφέρει ανάλογα με τη φύση του χυμού. Στο χυμό τομάτας το 98% περίπου των ολικών διαλυμένων στερεών θεωρείται ότι αποτελούνται από σάκχαρα, έτσι λαμβάνεται ως παραδοχή ότι μέσω αυτής της μέτρησης προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα ενός τέτοιου δείγματος.

Για τη μέτρηση των ολικών στερεών τα δείγματα φυγοκεντρώνται και στη συνέχεια φιλτράρονται μέσω ηθμού μεμβράνης 0.45 μm. Ποσότητα 10g από το διήθημα του δείγματος τοποθετείται σε προ ζυγισμένο κρυσταλλωτήριο και στη συνέχεια ξηραίνεται στους 105°C για 24h. Το υπόλειμμα ζυγίζεται και εκφράζεται σε mg/100g δείγματος.

3.3.4.6 Υπολογισμός Σύστασης

Στο παραπροϊόν που παράγεται, πριν την ξήρανση και αφού ζυγιστεί, γίνεται διαχωρισμός του δέρματος από τους σπόρους με τρόπο που περιγράφεται στην Παράγραφο 3.3.1.2., και ζυγίζονται τα επιμέρους βάρη για την εύρεση της σύστασης του τσίπουρου στο κάθε παραπροϊόν χωριστά.

3.3.4.7 Μέτρηση Υγρασίας

Η μέτρηση της υγρασίας του παραπροϊόντος του δέρματος της τομάτας, υπολογίζεται από το *Αρχικό Βάρος* του πριν την ξήρανση με τις μεθόδους που αναφέρονται στην Παράγραφο 3.3.1.3. και την τιμή του βάρους του, όταν αυτό σταθεροποιηθεί μετά την ξήρανση (*Τελικό Βάρος*). Με αντικατάσταση στην Εξίσωση 4 υπολογίζεται τελικά η υγρασία του δείγματος σε ξηρή βάση.

$$\% \text{ Υγρασία (dw)} = \frac{\text{Αρχικό Βάρος (g)} - \text{Τελικό Βάρος (g)}}{\text{Τελικό Βάρος (g)}} \quad \text{Εξίσωση 4}$$

Επιπρόσθετα, των προαναφερθέντων συσκευών και οργάνων απαιτήθηκε ακόμη η χρήση μικροεοπλισμού του εργαστηρίου όπως: αναλυτικός ζυγός ακρίβειας, ξηραντήρας, συσκευή φυγοκέντρησης, διάταξη τιτλοδότησης, οικιακός αναμίκτης, προχοΐδα, κλπ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηρισμός Α' ύλης

4.1.1.Σύνθεση και υγρασία παραπροϊόντος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι τομάτες αρχικά συμπιέζονται ώστε να προκύψει το νωπό παραπροϊόν και στη συνέχεια ακολουθεί ο διαχωρισμός του δέρματος από τους σπόρους. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται η σύνθεση του παραπροϊόντος σε νωπή βάση. Τα ποσοστά αυτά είναι αρκετά κοντά σε αυτά που αναφέρονται από άλλους ερευνητές, ενώ οι διαφοροποιήσεις σε σχέση με άλλες μελέτες, οφείλονται κατά κύριο λόγο στη διαφορετική ποικιλία και μεταχείριση της πρώτης ύλης από την εκάστοτε βιομηχανία.

Πίνακας 10: Σύσταση του παραπροϊόντος σε δέρμα και σπόρους (σε νωπή βάση)

<i>Είδος</i>	<i>Ποσοστό στο σύνολο του νωπού παραπροϊόντος</i>
Δέρμα/Φλούδα	60.8%
Σπόροι	39.2%

Η υγρασία της νωπής πρώτης ύλης υπολογίστηκε μετά από ξήρανση υπό κενό σε 75%, τιμή η οποία συμπίπτει με αυτή που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία (60-80%).

4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου

Στο Παράρτημα παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση των 16 εκχυλισμάτων στο HPLC. Οι πληροφορίες που δίνονται από τα χρωματογραφήματα και απαιτούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του λυκοπενίου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανάλυσης HPLC για το λυκοπένιο για κάθε δείγμα

<i>Δείγμα</i>	<i>Χρόνος έκλυσης Λυκοπενίου (min)</i>	<i>Εμβαδόν κορυφής</i>
<i>E-111</i>	31.336	2880569
<i>E010</i>	32.182	5237853
<i>E000</i>	32.429	4005462
<i>E0-10</i>	32.176	2353652
<i>E-1-1-1</i>	32.452	5963739
<i>E001</i>	32.085	2352419
<i>E100</i>	32.953	9276607
<i>E11-1</i>	31.761	13330214
<i>E000</i>	31.883	5620295
<i>E00-1</i>	31.512	17666809
<i>E-11-1</i>	31.476	10214776
<i>E-100</i>	30.269	4685038
<i>E1-11</i>	32.214	4360708
<i>E1-1-1</i>	34.700	15835772
<i>E111</i>	32.060	6898324
<i>E-1-11</i>	31.607	1748888
<i>Soxhlet</i>	32.088	10953725
<i>Χυμός τομάτας (Ζύμωση)</i>	32,042	20498960
<i>Κρασί τομάτας (1^ο Στάδιο Ζύμωσης)</i>	32.966	8403049
<i>Ξύδι τομάτας (2^ο Στάδιο Ζύμωσης)</i>	32.288	7624556

Ποιοτικός προσδιορισμός Λυκοπενίου

Η ταυτοποίηση του λυκοπενίου, γίνεται από τους χρόνους ανάσχεσης και τα φάσματα απορρόφησης των χρωματογραφημάτων, που προκύπτουν για το κάθε πείραμα. Οι χρόνοι αυτοί συγκρίνονται με τους χρόνους έκλουσης των πρότυπων διαλυμάτων, οι οποίοι κυμαίνονται από 32.276 min έως 32.685 min, ενώ ελέγχεται και η παρόμοια μορφή των φασμάτων απορρόφησης τους με αυτά των πειραμάτων.

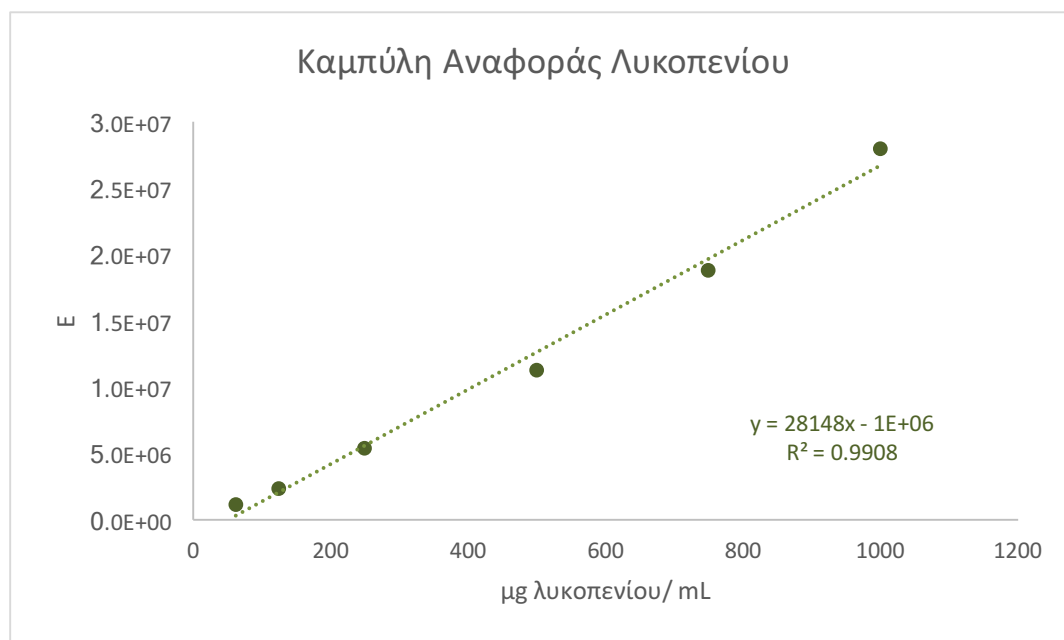
Από τα αποτελέσματα φαίνεται συνεπώς ότι οι χρόνοι ανάσχεσης κυμαίνονται κοντά σε αυτούς των πρότυπων διαλυμάτων με ένα εύρος από 30.269-34.700 min και έτσι ταυτοποιείται η ύπαρξη του λυκοπενίου στο εκχύλισμα.

Ποσοτικός προσδιορισμός Λυκοπενίου

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Λυκοπενίου είναι απαραίτητη η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Καμπύλη αναφοράς Λυκοπενίου για προσδιορισμό της συγκέντρωσής του

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση των πρότυπων δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων στο HPLC, χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς που φαίνεται στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς για το Λυκοπένιο

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η εξίσωση της καμπύλης που σχηματίζεται είναι:

$$y = 28148x - 1000000 \quad \text{Εξίσωση 5}$$

Όπου,

y: η τιμή του εμβαδού της κορυφής που αντιστοιχεί στο λυκοπένιο όπως προκύπτει από το λογισμικό επεξεργασίας του ανιχνευτή, και

x: η περιεκτικότητα του δείγματος σε λυκοπένιο σε $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του σήματος του ανιχνευτή, που μεταφράζεται σε εμβεδόν κορυφής του λυκοπενίου για το χρωματογράφημα, σε συγκέντρωση της ένωσης σε μg ανά mL δείγματος.

Έτσι, ο ποσοτικός προσδιορισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε λυκοπένιο, γίνεται από την Εξίσωση 5. Η υπολογιζόμενη συγκέντρωση προκύπτει σε μg λυκοπενίου / mL του χρησιμοποιούμενου διαλύτη (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Συγκέντρωση λυκοπενίου στα μετρούμενα δείγματα ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

<i>Δείγμα</i>	<i>Εμβαδόν κορυφής Λυκοπενίου</i>	<i>μg λυκοπενίου/ mL διαλύτη</i>
<i>E-111</i>	2880569	137.863
<i>E010</i>	5237853	221.609
<i>E000</i>	4005462	177.827
<i>E0-10</i>	2353652	119.144
<i>E-1-1-1</i>	5963739	247.397
<i>E001</i>	2352419	119.100
<i>E100</i>	9276607	365.092
<i>E11-1</i>	13330214	509.102
<i>E000</i>	5620295	235.196
<i>E00-1</i>	17666809	663.166

<i>E-11-1</i>	10214776	398.422
<i>E-100</i>	4685038	201.970
<i>E1-11</i>	4360708	190.447
<i>E1-1-1</i>	15835772	598.116
<i>E111</i>	6898324	280.600
<i>E-1-11</i>	1748888	97.658
<i>Soxhlet</i>	10953725	424.674
<i>Χυμός τομάτας</i>	20498960	763.783
<i>Κρασί τομάτας</i>	8403049	334.057
<i>Ξύδι τομάτας</i>	7624556	306.400

4.3 Αριστοποίηση Εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν η εκχύλιση Soxhlet (SE) και η συνδυασμένη εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους (Ultrasound/Microwave Assisted Extraction - UMAE).

Η αριστοποίηση της εκχύλισης με αυτές τις τεχνικές, πραγματοποιήθηκε θεωρώντας ως παράμετρο αριστοποίησης την απόδοση των δειγμάτων σε λυκοπένιο και ως μεταβλητές αριστοποίησης: α) την ένταση των μικροκυμάτων, β) την ένταση των υπερήχων και γ) την αναλογία στερεού : διαλύτη.

Προκειμένου να υπολογισθεί η απόδοση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση Soxhlet η οποία θεωρείται ότι έχει απόδοση 100%. Έτσι το αποτέλεσμα της (ποσότητα λυκοπενίου) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της απόδοσης των υπόλοιπων πειραμάτων διαιρώντας την ποσότητα λυκοπενίου των δειγμάτων που ανακτήθηκε από αυτά, με αυτήν από την εκχύλιση Soxhlet (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Απόδοση των εκχυλίσεων ως προς την ανάκτηση λυκοπενίου από το δείγμα

<i>Δείγμα</i>	<i>mg Λυκοπενίου/ g dw δείγματος</i>	<i>Απόδοση Διεργασίας</i>
<i>E-111</i>	0.25548	62.83%
<i>E010</i>	0.25282	62.18%

<i>E000</i>	0.20040	49.29%
<i>E0-10</i>	0.20433	50.25%
<i>E-1-1-1</i>	0.15282	37.59%
<i>E001</i>	0.20431	50.25%
<i>E100</i>	0.31858	78.35%
<i>E11-1</i>	0.19850	48.82%
<i>E000</i>	0.20563	50.57%
<i>E00-1</i>	0.26181	64.39%
<i>E-11-1</i>	0.15753	38.74%
<i>E-100</i>	0.15895	39.09%
<i>E1-11</i>	0.24038	59.12%
<i>E1-1-1</i>	0.36876	90.69%
<i>E111</i>	0.37081	91.20%
<i>E-1-11</i>	0.12589	30.96%
<i>Soxhlet</i>	0.40660	100%

Όπως γίνεται φανερό από τον Πίνακα 13, οι βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους προκύπτουν για το **Δείγμα E111** και είναι αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης λυκοπενίου

<i>Δείγμα</i>	<i>Ένταση Μικροκυμάτων (W)</i>	<i>Ένταση Υπερήχων (W)</i>	<i>Αναλογία στερεού : διαλύτη</i>
<i>E111</i>	500	600	1:30

Οι βέλτιστες συνθήκες θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν αν ως κριτήριο επιλογής εκτός από την απόδοση σε λυκοπένιο λαμβανόταν υπόψιν και η οικονομική ανάλυση.

Παρακάτω παρουσιάζονται ομαδοποιημένα τα αποτελέσματα προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της κάθε μεταβλητής στο αποτέλεσμα της εκχύλισης.

4.3.1 Επίδραση της αναλογίας στερεού : διαλύτη στην απόδοση της εκχύλισης

Πίνακας 15: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 200 W και US 300 W

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E00-1	200	300	1:10	64.39%
E001	200	300	1:30	50.25%
E000	200	300	1:20	49.93%

Προκύπτει ότι για μεγαλύτερες αναλογίες στερεού : διαλύτη (1:20 και 1:30 (w/v)), οι αποδόσεις είναι μικρότερες σε σχέση με την απόδοση όταν η αναλογία είναι 1:10. Ακόμη παρατηρείται ότι για αναλογίες 1:20 και 1:30 (w/v), δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόδοση της εκχύλισης ως προς το λυκοπένιο.

Συνεπώς συμπεραίνεται ότι για μέτριες εντάσεις μικροκυμάτων και υπερήχων προτιμώνται πιο πυκνά δείγματα στην εκχύλιση, χωρίς όμως οι αποδόσεις που επιτυγχάνονται να είναι ιδιαίτερα υψηλές.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 500 W και US 0 W

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E1-1-1	500	0	1:10	90.69%
E1-11	500	0	1:30	59.12%

Πίνακας 17: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 0 W και US 600 W

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E-111	0	600	1:30	62.83%
E-11-1	0	600	1:10	38.74%

Πίνακας 18: Αποτελέσματα αποδόσεων για ένταση MW 500 W και US 600 W

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E111	500	600	1:30	91.20%
E11-1	500	600	1:10	48.82%

Στην περίπτωση των Πινάκων 16, 17 και 18, μελετάται πως επιδρούν οι μέγιστες τιμές των εντάσεων που εφαρμόστηκαν για τους υπερήχους και τα μικροκύματα, στην απόδοση της εκχύλισης, σε σχέση με την αναλογία στερεού : διαλύτη.

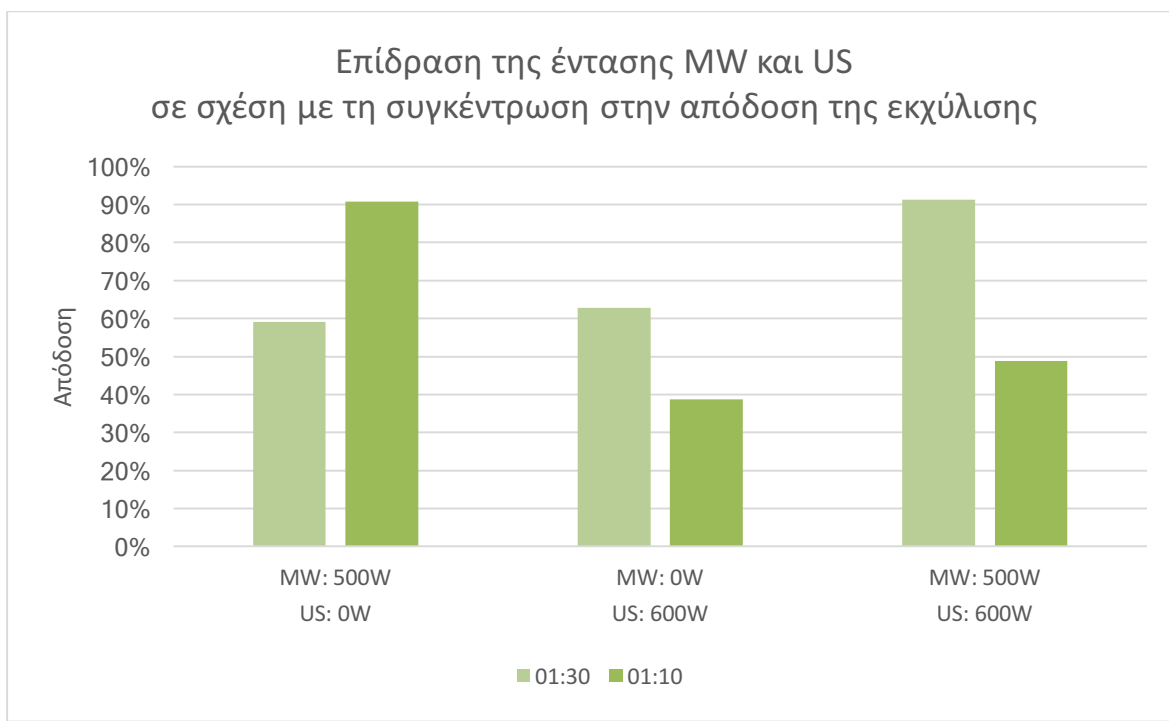
Από τον Πίνακα 16 παρατηρείται ότι για μέγιστη ένταση μικροκυμάτων (500 W) και απουσία υπερήχων, η απόδοση αυξάνεται σημαντικά όταν η αναλογία μειώνεται και το διάλυμα που εκχυλίζεται γίνεται πυκνότερο. Έτσι για αναλογία 1:10 (w/v), η απόδοση λαμβάνει υψηλές τιμές κοντά στο 91%, ενώ για αναλογίες στερεού : διαλύτη 1:30 (w/v), η τιμή της μειώνεται σημαντικά στο 59.12%.

Ωστόσο στην περίπτωση εκχύλισης με μέγιστη ισχύ για τους υπερήχους (600 W) και απουσία μικροκυμάτων, παρατηρείται το αντίθετο αποτέλεσμα, με την απόδοση να αυξάνεται στο 62.83% για τα πιο αραιά διαλύματα (1:30 (w/v)), από το 38.74% που αποδίδει για τα πιο πυκνά με αναλογία 1:10 (w/v).

Από τον Πίνακα 18, προκύπτει ότι όταν επιλέγονται οι μέγιστες δυνατές εντάσεις και για τα μικροκύματα (500 W) αλλά και για τους υπερήχους (600 W), η απόδοση αυξάνεται λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή για τα πιο αραιά εκχυλιζόμενα δείγματα (91.20% απόδοση), ενώ μειώνεται σημαντικά όταν το δείγμα που εκχυλίζεται γίνεται πυκνότερο (48.82% απόδοση).

Συγκρίνοντας τις αποδόσεις των τριών παραπάνω περιπτώσεων, παρατηρείται ότι κατά την εκχύλιση πυκνών δειγμάτων, είναι προτιμότερο να αυξάνεται η ένταση των μικροκυμάτων και να περιορίζεται η χρήση των υπερήχων στην εκχύλιση. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι, η υψηλή ένταση των υπερήχων, όταν δεν συνδυάζεται και με τη χρήση μικροκυμάτων, δεν βοηθά στην ανάκτηση μεγάλης ποσότητας λυκοπενίου κατά την εκχύλιση, για καμία από τις δύο αναλογίες που μελετήθηκαν (1:10 και 1:30, w/v). Αντίθετα όταν η υψηλή ισχύς των υπερήχων συνδυαστεί με υψηλή ισχύ μικροκυμάτων σε αραιά διαλύματα με αναλογία 1:30 (w/v), επιτυγχάνεται η υψηλότερη απόδοση, σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα πειράματα. Ωστόσο η απόδοση αυτή μειώνεται σημαντικά αν το δείγμα που εκχυλίζεται γίνει αρκετά πιο πυκνό στις ίδιες εντάσεις, καθώς το ποσοστό της από 91.2% μειώνεται σε 48.82%. Έτσι προκύπτει ότι σε υψηλότερες εντάσεις μέχρι 500W, τα μικροκύματα έχουν θετικότερη επίδραση στην ανάκτηση του λυκοπενίου για τα πιο πυκνά δείγματα σε σχέση με τους υπερήχους, ενώ το αντίθετο παρατηρείται όταν το δείγμα είναι αραιό. Αυτό προφανώς ισχύει υπό την προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία του διαλύματος κατά την εκχύλιση δεν ξεπερνάει σε καμία περίπτωση τους 50°C, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του λυκοπενίου που εκχυλίζεται από το δείγμα. Η επίδραση των υψηλών εντάσεων MW και US σε σχέση με την αναλογία, αναλύεται περισσότερο στην Παράγραφο 4.3.3.

Τα αποτελέσματα των αποδόσεων για τις παραπάνω περιπτώσεις των Πινάκων 16, 17 και 18, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα επίδρασης της έντασης MW και US σε σχέση με την αναλογία στερεού : διαλύτη στα δείγματα

Αν επιθυμείτε οικονομικότερη κατανάλωση διαλύτη (πυκνότερα δείγματα) ανάμεσα σε αυτές τις τρεις περιπτώσεις για υψηλές εντάσεις, μπορεί να προτιμηθεί η εφαρμογή υψηλής έντασης μικροκυμάτων (500W) απουσία υπερήχων, ενώ ανεξάρτητα της κατανάλωσης διαλύτη, η υψηλότερη απόδοση προκύπτει από την ταυτόχρονη εφαρμογή υψηλών εντάσεων υπερήχων (600W) και μικροκυμάτων (500W) για πιο αραιά δείγματα με αναλογία 1:30 (w/v).

Τα αποτελέσματα για τις ενδιάμεσες τιμές συγκεντρώσεων (1:20, w/v) δεν παρέχουν κάποια ενδιαφέρουσα πληροφορία καθώς οδηγούν σε παρόμοια αποτελέσματα αποδόσεων. Το μόνο συμπέρασμα που μπορεί να προκύψει από τα αποτελέσματά για αυτές, είναι ότι οι αναλογίες 1:20 και 1:30 (w/v) σε εκχυλίσαις με ίδιες συνθήκες έντασης MW και US, δεν διαφοροποιούν σημαντικά την ποσότητα λυκοπενίου που μπορεί να ανακτηθεί, και άρα θα ήταν προτιμότερο για οικονομία του διαλύτη να προτιμηθεί η επιλογή του πιο πυκνού διαλύματος με αναλογία 1:20 (w/v), ώστε η διεργασία να είναι και οικονομικά πιο συμφέρουσα.

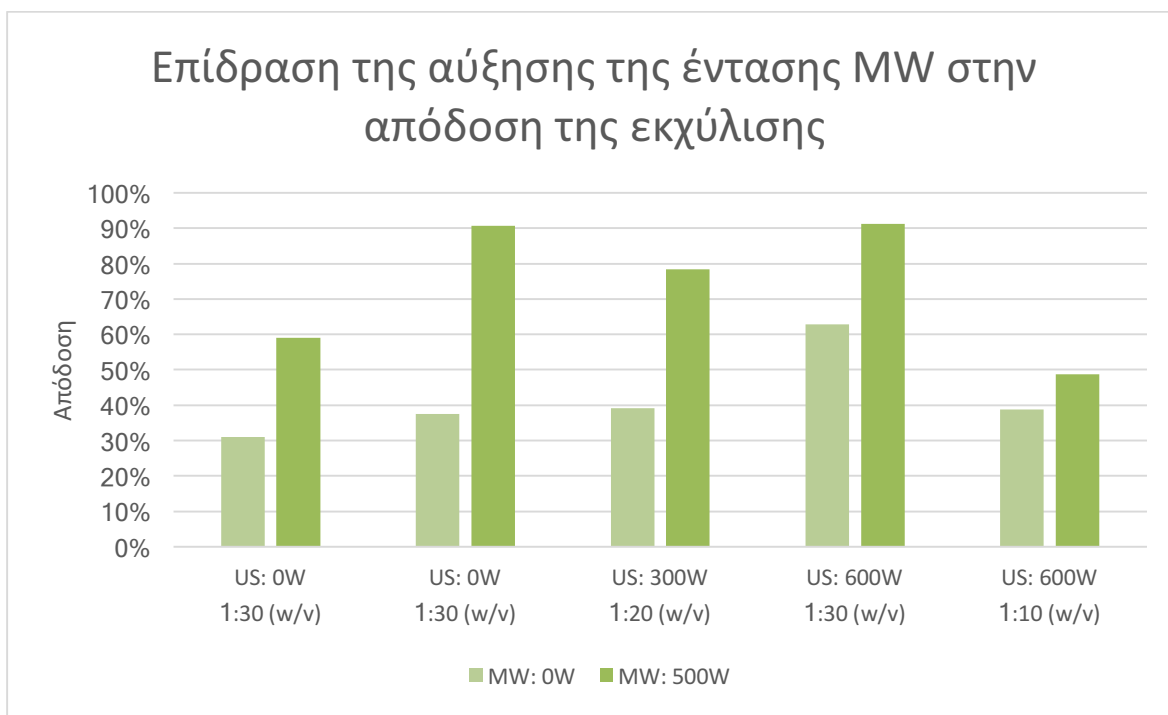
4.3.2 Επίδραση της έντασης μικροκυμάτων και υπερήχων στην απόδοση της εκχύλισης

Πίνακας 19: Αποτελέσματα αποδόσεων για εντάσεις MW 0 και 500W και μεταβλητές τιμές έντασης US και αναλογίας στερεού : διαλύτη

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση	Περίπτωση
E1-11	500	0	1:30	59.12%	1
E-1-11	0	0	1:30	30.96%	
E1-1-1	500	0	1:10	90.69%	2
E-1-1-1	0	0	1:10	37.59%	
E100	500	300	1:20	78.35%	3
E-100	0	300	1:20	39.09%	
E111	500	600	1:30	91.20%	4
E-111	0	600	1:30	62.83%	

<i>E11-1</i>	500	600	1:10	48.82%	5
<i>E-11-1</i>	0	600	1:10	38.74%	

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 19 για τις αποδόσεις των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν σε συνθήκες εντάσεων MW 0 και 500W, παρατηρείται ότι για κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα από την τιμή της έντασης US και της αναλογίας στερεού με διαλύτη, η απόδοση αυξάνεται με την αύξηση της έντασης των μικροκυμάτων, σε άλλες περιπτώσεις περισσότερο και σε άλλες λιγότερο. Η μεγαλύτερη αύξηση της απόδοσης με την αύξηση της έντασης των υπερήχων παρατηρείται για την Περίπτωση 2 και τα Δείγματα *E1-1-1* και *E-1-1-1*. Σε αυτή την περίπτωση η απόδοση αυξάνεται σε ποσοστό 141%, αυξάνοντας σημαντικά την ποσότητα του λυκοπενίου που ανακτάται, και αναφέρεται σε συνθήκες πυκνών δειγμάτων (αναλογία 1:10, w/v) και απουσία υπερήχων (US 0W). Επομένως προκύπτει ότι σε κάθε περίπτωση ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες συνθήκες εκχύλισης του δείγματος, η αύξηση της έντασης των μικροκυμάτων σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της ανάκτησης του λυκοπενίου, εφόσον η θερμοκρασία του διαλύματος κατά την εκχύλιση δεν ξεπερνά τους 50°C, οπότε και εξασφαλίζεται η αποφυγή της αποικοδόμησής του. Στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αποδόσεων για τους συνδυασμούς συνθηκών εκχύλισης του Πίνακα 19.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της αύξησης της έντασης του MW στην απόδοση της εκχύλισης για πέντε περιπτώσεις μελετώμενων συνθηκών

Όπως παρατηρείται και στο Διάγραμμα 4, η απόδοση αυξάνεται για υψηλότερη ένταση MW, ανεξάρτητα των τιμών των άλλων δύο παραμέτρων. Η αύξηση αυτή δεν είναι ίδια για όλες τις περιπτώσεις και επηρεάζεται προφανώς και από τις τιμές της έντασης US και τις επιλεγόμενης αναλογίας στερεού με διαλύτη.

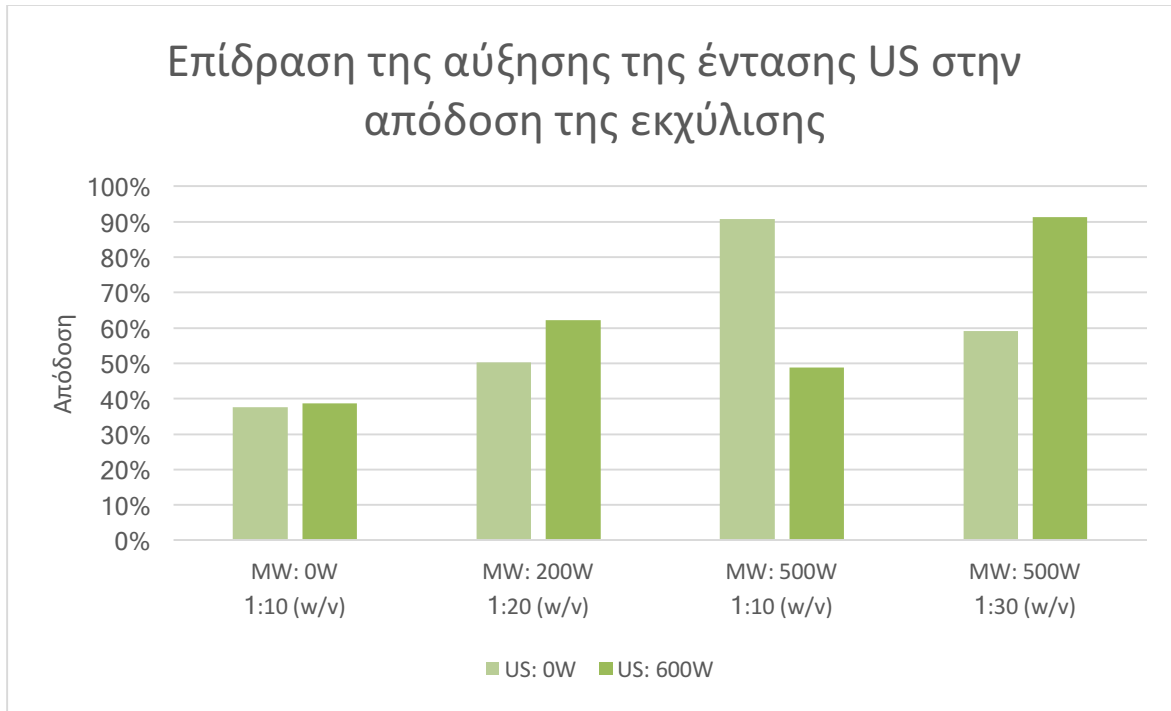
Πίνακας 20: Αποτελέσματα αποδόσεων για εντάσεις US 0 και 600W και μεταβλητές τιμές έντασης MW και αναλογίας στερεού : διαλύτη

<i>Δείγμα</i>	<i>Ένταση MW (W)</i>	<i>Ένταση US (W)</i>	<i>Αναλογία (g/mL)</i>	<i>Απόδοση</i>	<i>Περίπτωση</i>
<i>E-11-1</i>	0	600	1:10	38.74%	1
<i>E-1-1-1</i>	0	0	1:10	37.59%	
<i>E010</i>	200	600	1:20	62.18%	2
<i>E0-10</i>	200	0	1:20	50.25%	
<i>E11-1</i>	500	600	1:10	48.82%	3
<i>E1-11</i>	500	0	1:10	90.69%	
<i>E111</i>	500	600	1:30	91.20%	4
<i>E1-11</i>	500	0	1:30	59.12%	

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 20, παρατηρείται ότι η ποσότητα του λυκοπενίου που μπορεί να ανακτηθεί δεν επηρεάζεται με τον ίδιο τρόπο για όλες τις περιπτώσεις. Γενικότερα παρουσιάζεται μια αύξηση της απόδοσης με την αύξηση της έντασης των υπερήχων για όλες τις περιπτώσεις, εκτός της Περίπτωσης 3, όπου το εκχυλιζόμενο δείγμα είναι πυκνότερο με αναλογία 1:10 (w/v). Ακόμη σχετικά χαμηλές αποδόσεις προκύπτουν και για την περίπτωση 1, όπου εφαρμόζεται η ίδια αναλογία. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στη χαμηλή αποδοτικότητα της εκχύλισης των υπερήχων για τα πυκνά δείγματα, όπως προέκυψε από την Παράγραφο 4.3.1.. Η αύξηση της απόδοσης του λυκοπενίου είναι αξιοσημείωτη για την περίπτωση 4, όπου συνδυάζεται με αυξημένη ένταση MW και μεγαλύτερη αναλογία στερεού : διαλύτη (1:30 (w/v)) και αντιστοιχεί σε ποσοστό 54%. Για όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις παρατηρείται ότι η αύξηση στην ένταση του US δεν φαίνεται να έχει το ίδιο σημαντική

Θετική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης, ενώ για τα πυκνότερα δείγματα, η επίδραση αυτή μπορεί να γίνει ακόμα και αρνητική αν συνδυαστεί με υψηλότερες εντάσεις MW.

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα των περιπτώσεων που αναφέρονται στον Πίνακα 20.



Διάγραμμα 5: Επίδραση της αύξησης της έντασης του US στην απόδοση της εκχύλισης για τέσσερις περιπτώσεις μελετώμενων συνθηκών

Από το Διάγραμμα 5 επιβεβαιώνεται ότι η επίδραση της έντασης US δεν είναι ίδια για όλες τις περιπτώσεις και εξαρτάται σημαντικά από τις τιμές και των άλλων δύο παραμέτρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αύξηση της έντασης αυτής της παραμέτρου αυξάνει αισθητά την απόδοση ως προς την ανάκτηση λυκοπενίου, εκτός των περιπτώσεων που η εκχύλιση πραγματοποιείται σε πυκνά δείγματα με αναλογία 1:10 (w/v).

4.3.3 Συνδυαστική επίδραση των τριών παραμέτρων

Πίνακας 21: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:30 (w/v) και μεταβλητές εντάσεις MW και US

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E111	500	600	1:30	91.20%
E001	200	300	1:30	50.25%
E-1-11	0	0	1:30	30.96%

Πίνακας 22: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:10 (w/v) και μεταβλητές εντάσεις MW και US

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E1-1-1	500	0	01:10	90.69%
E00-1	200	300	01:10	64.39%
E11-1	500	600	01:10	48.82%
E-11-1	0	600	01:10	38.74%

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των αποδόσεων για τις αναλογίες 1:30 και 1:10 (w/v) του Πίνακα 21 και 22, συμπεραίνεται ότι στην πρώτη περίπτωση των αραιών διαλυμάτων (για μεγάλες αναλογίες στερεού : διαλύτη), θα πρέπει να προτιμώνται οι μεγαλύτερες εντάσεις MW και US (500W και 600W αντίστοιχα), προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη απόδοση ως προς το λυκοπένιο. Έτσι παρατηρείται ότι με την εφαρμογή 200 W MW και 300 W US, η απόδοση αυξάνεται περίπου κατά 62% σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση (Δείγμα E-1-11), ενώ ακόμη μεγαλύτερη αύξηση κοντά στο 81%, παρατηρείται κατά την εφαρμογή 500 W έντασης μικροκυμάτων και 600 W έντασης υπερήχων σε σχέση με το Δείγμα E001.

Από την άλλη, όταν το διάλυμα που εκχυλίζεται είναι πυκνό ως προς το στερεό (αναλογία 1:10, w/v), παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση στον τρόπο που αλληλοεπιδρούν οι εντάσεις MW και US στην απόδοση της εκχύλισης για τις μελετώμενες τιμές των παραμέτρων. Το μόνο που μπορεί να προκύψει ως συμπέρασμα από αυτήν την περίπτωση, είναι ότι για υψηλές τιμές US (600W) (Δείγμα E11-

1 και E-11-1), η απόδοση της εκχύλισης μειώνεται, ανεξάρτητα από την τιμή της έντασης MW. Δηλαδή για τα πυκνά διαλύματα, οι υπέρηχοι μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στο αποτέλεσμα της εκχύλισης αν εφαρμοσθούν σε υψηλές εντάσεις, με αποτέλεσμα να ανακτηθεί μικρότερη ποσότητα λυκοπενίου, ανεξάρτητα από την τιμή της έντασης MW, όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους.

Απομονώνοντας τα αποτελέσματα των αποδόσεων για υψηλές εντάσεις MW και US και συσχετίζοντας το πως επιδρούν στην απόδοση του λυκοπενίου σε σχέση με την αναλογία, προκύπτουν οι εξής πίνακες:

Πίνακας 23: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:30 (w/v), και υψηλές εντάσεις μικροκυμάτων και υπερήχων

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E111	500	600	1:30	91.20%
E-111	0	600	1:30	62.83%
E1-11	500	0	1:30	59.12%

Πίνακας 24: Αποτελέσματα αποδόσεων για αναλογία 1:10 (w/v), και υψηλές εντάσεις μικροκυμάτων και υπερήχων

Δείγμα	Ένταση MW (W)	Ένταση US (W)	Αναλογία (g/mL)	Απόδοση
E1-1-1	500	0	01:10	90.69%
E11-1	500	600	01:10	48.82%
E-11-1	0	600	01:10	38.74%

Από τους Πίνακες 23 και 24, επιβεβαιώνεται η παραπάνω παρατήρηση, ότι για τα αραιά δείγματα με αναλογία στερεού : διαλύτη 1:30 (w/v), ο συνδυασμός υψηλής έντασης μικροκυμάτων και υπερήχων λειτουργεί θετικά, αποδίδοντας 91.20% στο αποτέλεσμα της εκχύλισης (Δείγμα E111), ενώ το αντίθετο φαίνεται να συμβαίνει για τα πυκνά δείγματα, όπου η απόδοση μειώνεται στο 48.82% (Δείγμα E11-1).

Από τις αποδόσεις που προκύπτουν για τα δείγματα E-111, E1-11, E1-1-1 και E-11-1, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι γενικότερα υψηλές εντάσεις US (600W) θα πρέπει να προτιμώνται σε αραιά δείγματα

αναλογίας 1:30 (w/v), ενώ όταν εφαρμόζονται υψηλές εντάσεις MW (500W), μεγαλύτερες αποδόσεις προκύπτουν από τα πυκνότερα προς εκχύλιση διαλύματα. Έτσι, η υψηλή ένταση των υπερήχων στα πυκνά διαλύματα για αναλογίες 1:10 (w/v), φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στο αποτέλεσμα της απόδοσης, όπως προκύπτει από τα δείγματα E-11-1 και E11-1, όπου οι αποδόσεις της εκχύλισης λαμβάνουν αρκετά χαμηλές τιμές (38.74% και 48.82% αντίστοιχα) σε σχέση με την περίπτωση υψηλής έντασης MW και απουσίας US στην ίδια αναλογία (90.69%).

Αποτελέσματα εκχύλισης σε μηδενική ένταση MW και US.

Τα αποτελέσματα των αποδόσεων όταν οι τιμές των εντάσεων των μικροκυμάτων και των υπερήχων μηδενίζονται και η εκχύλιση πραγματοποιείται μόνο με ανάδευση, παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα αποδόσεων για απλή συμβατική εκχύλιση

<i>Δείγμα</i>	<i>Ένταση MW (W)</i>	<i>Ένταση US (W)</i>	<i>Αναλογία (g/mL)</i>	<i>Απόδοση</i>
<i>E-1-1-1</i>	0	0	1:10	37.59%
<i>E-1-11</i>	0	0	1:30	30.96%

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει όπως είναι αναμενόμενο, ότι η απόδοση της απλής συμβατικής εκχύλισης αυξάνεται για μεγαλύτερες αναλογίες (1:30 (w/v)). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε μεγαλύτερες αναλογίες και άρα πιο αραιά διαλύματα, η δυναμικότητα του διαλύτη της εκχύλισης αυξάνεται, με αποτέλεσμα να μπορεί να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα από την επιθυμητή ουσία προτού επέλθει ο κορεσμός του. Οι αποδόσεις του Πίνακα 25 που προκύπτουν για αυτή την περίπτωση εκχύλισης, είναι οι χαμηλότερες που επιτυγχάνονται σε σχέση με τους υπόλοιπους συνδυασμούς μεταβλητών που μελετήθηκαν, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 13. Επαληθεύεται συνεπώς η βιβλιογραφική υπόθεση ότι οι νέες «πράσινες» τεχνολογίες εκχύλισης MAE, UAE και ο συνδυασμός τους (UMAE), αυξάνουν την απόδοση της εκχύλισης σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους και οδηγούν σε πολύ καλύτερα αποτελέσματα στον ίδιο χρόνο.

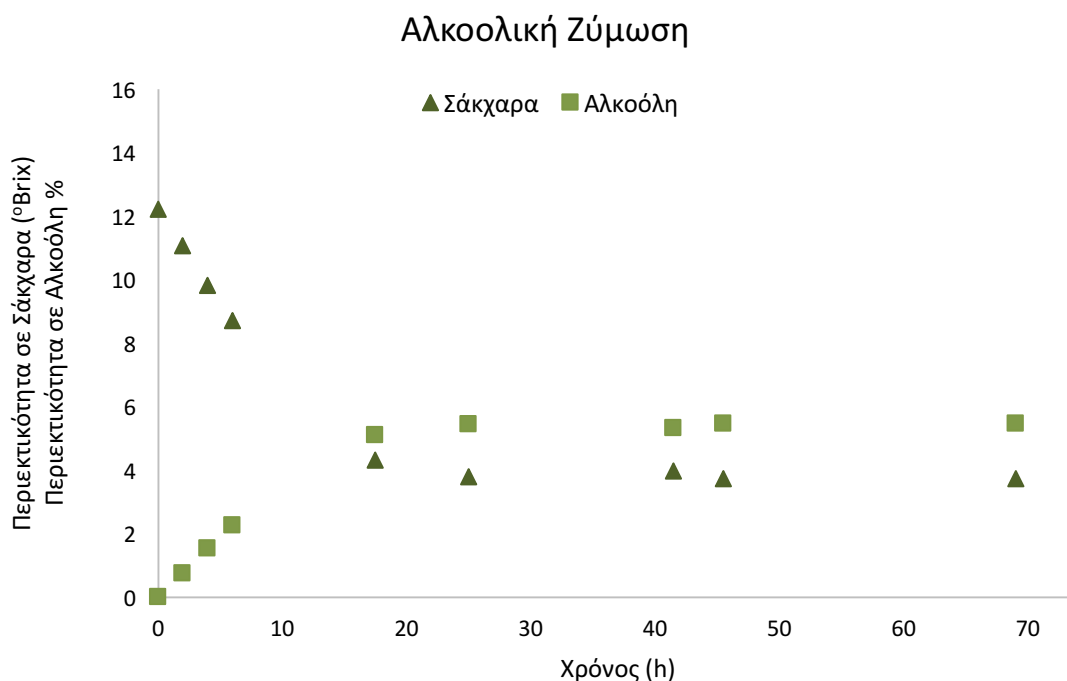
4.4 Διεργασία ζύμωσης και χαρακτηρισμός προϊόντων

Όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία η μετατροπή του χυμού τομάτας σε οξικό οξύ πραγματοποιείται με ζύμωση δύο σταδίων. Από ανάλυση που έγινε στο χυμό της τομάτας στο HPLC, για

την εύρεση της περιεκτικότητάς του σε λυκοπένιο, μετρήθηκε ότι η αρχική του τιμή πριν τη ζύμωση ήταν 12.15 mg/ 100g. Στη συνέχεια αναφέρονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατά τη διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και ο χαρακτηρισμός των προϊόντων που παράγονται.

4.4.1 Α' στάδιο ζύμωσης - αλκοολική ζύμωση

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης λαμβάνονται τουλάχιστον δύο δείγματα την ημέρα από το εσωτερικό του αντιδραστήρα, για τα οποία μετράται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε αλκοόλη, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία (Παράγραφος 3.3.4.2). Από τις μετρήσεις αυτές για τα δείγματα που λαμβάνονται προκύπτει το Διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6: Πρώτο στάδιο παραγωγής οξικού οξέος. Μεταβολές στην περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αλκοόλη κατά το στάδιο αλκοολικής ζύμωσης

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 6, κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου της ζύμωσης τα σάκχαρα που περιέχονται στο χυμό της τομάτας μετατρέπονται σε αλκοόλη (αιθανόλη), με αποτέλεσμα το ποσοστό των σακχάρων να μειώνεται, ενώ αυτό της αλκοόλης αυξάνεται. Το κρασί που παράγεται από το χυμό της τομάτας, έχει τελικό ποσοστό σε αλκοόλη 5.58%. Ωστόσο το ποσοστό της αλκοόλης στον αντιδραστήρα, φαίνεται να είχε φθάσει κοντά στην τελική του τιμή ήδη από την αρχή της δεύτερης

ημέρας (μετά τις 25-28 ώρες). Προκύπτει λοιπόν ότι η αλκοολική ζύμωση θα μπορούσε να είχε διακοπεί νωρίτερα από την τρίτη ημέρα, για τη μείωση του χρόνου της διεργασίας και του κόστους της ζύμωσης.

4.4.2 Χαρακτηρισμός προϊόντος αλκοολικής ζύμωσης (κρασί τομάτας)

Το τελικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της παραγωγής οξικού οξέος. Παρόλα αυτά πραγματοποιούνται μετρήσεις για τον χαρακτηρισμό του για τον συνολικό έλεγχο της διεργασίας της ζύμωσης (Πίνακας 26).

Πίνακας 26: Μετρούμενες ιδιότητες του προϊόντος αλκοολικής ζύμωσης (κρασί τομάτας)

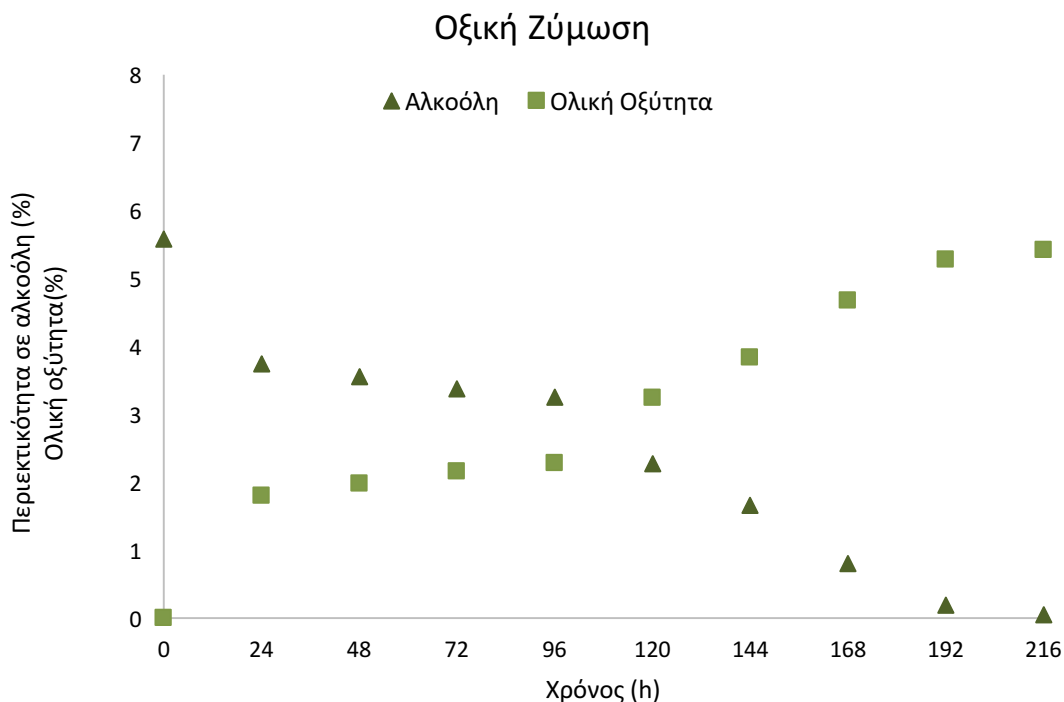
<i>Μετρούμενη Ιδιότητα</i>	<i>Τιμή</i>
Περιεκτικότητα σε Λυκοπένιο (mg/ 100g)	10.02
Αρχική περιεκτικότητα σε σάκχαρα, Brix, (g/100g)	12.21
Τελική περιεκτικότητα σε σάκχαρα, Brix, (g/100g)	3.73
% Αιθανόλη (mL/ 100mL)	5.58
pH	4.2
Ολικά Διαλυμένα Στερεά (g/100g)	3.81

Από τις μετρήσεις των ιδιοτήτων του ενδιάμεσου προϊόντος, προκύπτει ότι το προϊόν αυτό έχει διατηρήσει τη μεγαλύτερη ποσότητα της περιεκτικότητάς του σε λυκοπένιο, ενώ πληροί την προϋπόθεση σε περιεκτικότητα αιθανόλης προκειμένου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή οξικού οξέος. Σύμφωνα με αυτή την προδιαγραφή, το ποσοστό αλκοόλης στον οίνο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή οξικού οξέος, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 5.5-7%. Η τιμή του ποσοστού αυτού σε αιθανόλη προσεγγίζεται ρυθμίζοντας την αρχική περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε 12.2° Brix. Όπως φαίνεται από τις τιμές της τελικής περιεκτικότητας σε σάκχαρα και των ολικών διαλυμένων στερεών από τον Πίνακα 26, αυτές παρουσιάζουν μικρή απόκλιση και άρα επαληθεύεται η μέτρηση του δείκτη διάθλασης του κρασιού τομάτας.

4.4.3 Β' στάδιο ζύμωσης - Οξική ζύμωση

Κατά τη διάρκεια της οξικής ζύμωσης λαμβάνονται τουλάχιστον δύο δείγματα την ημέρα από το εσωτερικό του αντιδραστήρα, για τα οποία μετράται η περιεκτικότητα σε οξύ και υπολογίζεται η

περιεκτικότητα σε αλκοόλη, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία (Παράγραφος 3.3.4.4). Από τις μετρήσεις αυτές προκύπτει το Διάγραμμα 7.



Διάγραμμα 7: Δεύτερο στάδιο παραγωγής οξικού οξέος. Μεταβολές στην περιεκτικότητα σε αλκοόλη και οξικό οξύ κατά το δεύτερο στάδιο οξικής ζύμωσης

Όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 7, κατά τη διάρκεια αυτού του τελικού σταδίου της ζύμωσης η αλκοόλη που περιέχεται στο προϊόν και παράγεται από την αλκοολική ζύμωση, μετατρέπεται σε οξικό οξύ, με αποτέλεσμα το ποσοστό της αλκοόλης να μειώνεται, ενώ παράλληλα αυτό του οξικού οξέος αυξάνεται. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν η ολική οξύτητα φθάσει κοντά στην επιθυμητή τιμή, δηλαδή στην περίπτωση αυτή όταν η ολική οξύτητα γίνει 5.42%. Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, η συγκέντρωση του οξικού οξέος αρχίζει να αυξάνεται απότομα μετά από την 3^η ημέρα και φθάνει στην τελική του τιμή την 9^η ημέρα της ζύμωσης. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση της αλκοόλης μειώνεται απότομα μετά την 3^η ημέρα και στη συνέχεια διατηρεί μια περίπου σταθερή κλίση, μέχρι την 9^η και τελευταία μέρα της ζύμωσης, όπου η περιεκτικότητα σε αλκοόλη σχεδόν μηδενίζεται.

Η τελική τιμή της ολικής οξύτητας (5.42%) που αποτελεί και τη μέγιστη που μπορεί να επιτευχθεί για αυτές τις συνθήκες, γίνεται εφικτή με τη ρύθμιση της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων στους 12-13°Brix και προκύπτει μετά από 13 ημέρες συνολικής ζύμωσης.

4.4.2 Χαρακτηρισμός προϊόντος οξικής ζύμωσης (ξύδι τομάτας)

Στο τελικό προϊόν της οξικής ζύμωσης πραγματοποιούνται μετρήσεις για τον χαρακτηρισμό του και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Μετρούμενες ιδιότητες του τελικού προϊόντος (ξύδι τομάτας)

Μετρούμενη Ιδιότητα	Τιμή
Περιεκτικότητα σε Λυκοπένιο (mg/ 100g)	9.19
% Οξικό Οξύ (g/ 100mL)	5.42
% Αιθανόλη (mL/ 100mL)	0.05
pH	2.85

Από την τιμή για την περιεκτικότητα του οξικού οξέος που παράγεται σε λυκοπένιο (Πίνακα 27) και δεδομένου ότι η αρχική περιεκτικότητα που μετρήθηκε στο χυμό της τομάτας πριν τη ζύμωση ήταν 12.15 mg/ 100g, συμπεραίνεται ότι το τελικό προϊόν που προκύπτει διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος του λυκοπενίου της πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε και άρα και τις ευεργετικές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ακόμη δεδομένου ότι η ελάχιστη οξύτητα που επιτρέπεται να έχει ένα προϊόν, προκειμένου να είναι δυνατή η πώλησή του σαν προϊόν ξυδιού, είναι 5.0%, προκύπτει ότι το ξύδι τομάτας που παράχθηκε με αυτή τη μέθοδο, είναι δυνατόν να χαρακτηριστεί και να πωληθεί στην αγορά ως τέτοιο προϊόν. Τέλος, συγκρίνοντας τις τιμές της οξύτητας και του pH του τελικού προϊόντος που προκύπτει, με τις αντίστοιχες τιμές για το λευκό ξύδι του εμπορίου, οι οποίες είναι 6% για την οξύτητα και 3 για το pH, παρατηρείται ότι υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους ως προς αυτά τα χαρακτηριστικά.

Σε ότι αφορά την τελική τιμή της περιεκτικότητας σε οξικό οξύ, αυτή είναι μέσα στα αναμενόμενα όρια, δεδομένου ότι ρυθμίστηκε έμμεσα στην αρχή της διεργασίας, μέσω της αρχικής περιεκτικότητας του χυμού σε σάκχαρο (12.2° Brix).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

5.1 Σημαντικές Παρατηρήσεις-Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των παραπροϊόντων βιομηχανιών επεξεργασίας τομάτας για την παραγωγή βιοδραστικών συστατικών και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αποτελέσματα άλλων ερευνών υποδεικνύουν ότι κυρίως το δέρμα της τομάτας, αποτελεί σημαντική πηγή λυκοπενίου και συνεισφέρει σε μεγάλο ποσοστό στη συνολική αντιοξειδωτική δράση και θρεπτική αξία του φρούτου της τομάτας. Επομένως, η απομάκρυνσή της κατά την επεξεργασία από τις βιομηχανίες, συνεπάγεται με σημαντική απώλεια αντιοξειδωτικών και άλλων θρεπτικών συστατικών που αυτή περιέχει. Επιπρόσθετα, τα οφέλη του λυκοπενίου για την υγεία του ανθρώπου και τη δυνατότητα πρόληψης πολλών ασθενειών, καθιστά την ανάκτηση του από αυτά τα παραπροϊόντα χαμηλής αξίας, ενδιαφέρουσα και οικονομικά συμφέρουσα για τη βιομηχανία.

Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η περίπτωση αξιοποίησης του δέρματος της τομάτας για την ανάκτηση του βασικού καροτενοειδούς που περιέχει και έγινε προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών απόδοσης της διεργασίας. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε ο χυμός που προέκυψε από τη συμπίεση του τσίπουρου τομάτας και των ελαττωματικών τοματών που δεν χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία, για την παραγωγή οξικού οξέος (ξύδι τομάτας), που αποτελεί ένα προϊόν σημαντικής προστιθέμενης αξίας, πλούσιο σε αντιοξειδωτικά συστατικά με πολλά αποδεδειγμένα οφέλη για την υγεία των ανθρώπων.

5.1.1 Ανάκτηση Λυκοπενίου

Το βασικό παραπροϊόν της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας είναι το τσίπουρο, το οποίο αποτελείται κυρίως από το δέρμα και τους σπόρους του φρούτου, σε σύσταση περίπου 60 και 40% αντίστοιχα. Το παραπροϊόν αυτό έχει αποδειχθεί ότι είναι πλούσιο σε βιοδραστικά και κυρίως αντιοξειδωτικά συστατικά, με κυρίαρχο το λυκοπένιο, η σύσταση του οποίου ανέρχεται κατά μέσο όρο σε 414 mg/ kg ξηρού παραπροϊόντος. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντικά μεγαλύτερη σύσταση του λυκοπενίου στο δέρμα της τομάτας, έγινε αρχικά διαχωρισμός αυτού του παραπροϊόντος από την υπόλοιπη μάζα του τσίπουρου και πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης του λυκοπενίου με τη χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων (UMAE). Οι παράμετροι ως προς τις οποίες διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση της εκχύλισης, με κριτήριο την επίτευξη της μέγιστης δυνατής απόδοσης, είναι τρεις: α) η ένταση των μικροκυμάτων (MW), β) η ένταση των υπερήχων (US) και γ) η αναλογία στερεού : διαλύτη στο διάλυμα που εκχυλίστηκε. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με τη μέθοδο

Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC-DAD) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν και αναλύθηκαν ως προς την απόδοση τους σε σχέση με την απόδοση της βέλτιστης μεθόδου εκχύλισης Soxhlet (SE).

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα βελτιστοποίησης, απέδειξαν ότι η αναλογία στερεού : διαλύτη και η ισχύς μικροκυμάτων και υπερήχων, επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση εκχύλισης του λυκοπενίου από το συγκεκριμένο παραπροϊόν τομάτας. Ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης και τον συνδυασμό των τιμών των επιμέρους παραμέτρων, επιτεύχθηκαν διαφορετικές αποδόσεις ως προς λυκοπένιο από τα διαφορετικά δείγματα.

Από τα αποτελέσματα, προέκυψε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης λυκοπενίου που μπορεί να επιτευχθεί με αυτές τις μεθόδους είναι **91.20%** (Δείγμα E111) και αναφέρεται στις εξής συνθήκες:

- Ένταση MW **500 W**
- Ένταση US **600 W**
- Αναλογία στερεού : διαλύτη **1:30 w/v**

Ωστόσο αν ληφθεί υπόψη και ο οικονομικός παράγοντας, μια οικονομικότερη επιλογή διεργασίας, με μικρότερη κατανάλωση διαλύτη, που αποδίδει παρόμοια αποτελέσματα με τη βέλτιστη περίπτωση, θα μπορούσε να είναι η εκχύλιση με εντάσεις MW 500 W, US 0W και αναλογία στερεού : διαλύτη 1:10 w/v (Δείγμα E1-1-1), που δίνει απόδοση 90.69%. Η εκχύλιση με αυτές τις συνθήκες μπορεί να προτιμηθεί και να θεωρηθεί ως καλύτερη επιλογή, για την περίπτωση που ο διαλύτης δεν μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μετά την εκχύλιση και η αγορά του αυξάνει σημαντικά το κόστος της διεργασίας.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η χρήση των μικροκυμάτων συνδυαστικά με τους υπερήχους, ενίσχυσε στις περισσότερες περιπτώσεις την αποδοτικότητα της εκχύλισης, κυρίως όσο το δείγμα γινόταν αραιότερο για τις υψηλές εντάσεις. Ωστόσο η χρήση αποκλειστικά της UAE, δεν αύξησε ιδιαίτερα την απόδοση της εκχύλισης συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους, ενώ η διαφορά στην ανακτώμενη ποσότητα λυκοπενίου ήταν ακόμα πιο έντονη σε σχέση με τις MAE και UAME. Τέλος αποδείχθηκε ότι η αύξηση της έντασης των υπερήχων μέχρι τα 500W και για ελεγχόμενη θερμοκρασία διαλύματος κάτω από τους 50 °C, οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης του λυκοπενίου, ανεξάρτητα των τιμών των άλλων δύο παραμέτρων.

Ακόμη επιβεβαιώθηκε ότι οι νέες αυτές «φιλικές» προς το περιβάλλον μέθοδοι εκχύλισης (MAE, UAE και UMAE), αποτελούν βελτιωμένες μεθόδους έναντι των συμβατικών και μπορούν να οδηγήσουν στην ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας λυκοπενίου, μειώνοντας παράλληλα τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης.

Συγκεκριμένα εστιάζοντας στην κάθε περίπτωση εκχύλισης, σε σχέση με τα αποτελέσματα μπορούν να γίνουν οι παρακάτω παρατηρήσεις.

Παρατηρήσεις

Αξίζει να σημειωθεί ότι σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και αριστοποίηση της συνδυασμένης εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους. Ωστόσο, κατά τον πειραματικό σχεδιασμό προέκυψαν πειράματα με μηδενική ένταση μικροκυμάτων, υπερήχων ή και των δύο, τα οποία θα μπορούσαμε να τα θεωρήσουμε εκχύλιση μόνο με μικροκύματα (MAE) ή μόνο με υπερήχους (UAE), ή απλής ανάδευσης. Συγκεκριμένα όταν η ένταση των υπερήχων λαμβάνει μηδενική τιμή ($US= 0W$) και ειδικότερα για τα δείγματα *E0-10*, *E1-11* και *E-1-1-1*, τότε θεωρείται ότι πραγματοποιείται εκχύλιση με μικροκύματα (MAE). Αντίστοιχα, όταν η τιμή της έντασης των μικροκυμάτων είναι μηδενική ($MW= 0W$), δηλαδή για τα δείγματα *E-111*, *E-11-1*, *E-100*, τότε εκτελείται εκχύλιση μόνο με υπερήχους (UAE). Ομοίως για τα δείγματα *E-1-1-1* και *E-1-11*, για τα οποία οι τιμές της έντασης για τα μικροκύματα και τους υπερήχους μηδενίζονται ταυτόχρονα, θεωρείται ότι το διάλυμα εκχυλίζεται με τη μέθοδο της απλής συμβατικής εκχύλισης. Με βάση τα παραπάνω, στη συνέχεια γίνονται ορισμένες παρατηρήσεις για την κάθε μέθοδο χωριστά, όπως προέκυψαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και με βάση τα αποτελέσματα που συγκεντρώθηκαν.

❖ Απλή συμβατική μέθοδος

Όπως ήταν αναμενόμενο και από τη βιβλιογραφία, οι χαμηλότερες αποδόσεις προέκυψαν για την απλή συμβατική εκχύλιση, απουσία μικροκυμάτων και υπερήχων, αποδεικνύοντας ότι πράγματι οι νέες αυτές «φιλικές» προς το περιβάλλον μέθοδοι αποτελούν βελτιωμένη μέθοδο εκχύλισης έναντι των συμβατικών μεθόδων. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι για αυτή την τεχνική, η απόδοση αυξήθηκε με την αύξηση της αναλογίας στερεού : διαλύτη στο δείγμα. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου διαλύτη για την ίδια ποσότητα δείγματος, ενισχύει τη διάχυση της επιθυμητής ουσίας στον κύριο όγκο του διαλύματος και επιτρέπει να διαλυθεί μεγαλύτερη ποσότητα σωματιδίων της επιθυμητής ουσίας, δεδομένου ότι προκαλείται μειωμένος κορεσμός στον όγκο του.

❖ MAE

Όπως αποδείχθηκε και πειραματικά, η αυξημένη ενέργεια μικροκυμάτων, μπορεί να ευνοήσει τη διείδυση του διαλύτη στη μήτρα του τρόφιμου και να προσφέρει μια ταχύτερη μεταφορά ενέργειας στο διαλύτη και την κυτταρική δομή του στερεού, αυξάνοντας τη θερμοκρασία τους. Η ισχύς προκαλεί τοπική θέρμανση στο δείγμα, η οποία ενεργεί ως κινητήρια δύναμη για την MAE να καταστρέψει τη κυτταρική δομή των φυτών έτσι ώστε η διαλυμένη ουσία να διαχυθεί και να διαλυθεί στον διαλύτη. Έτσι

επιτρέπεται η διάλυση των επιθυμητών ενώσεων σε αυτόν, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απόδοση εκχύλισης του λυκοπενίου. Όσο η θερμοκρασία διατηρείται χαμηλότερη από τους 50°C, εμποδίζεται η αποικοδόμηση των αντιοξειδωτικών ενώσεων και η υπερπίεση στο εσωτερικό του δοχείου λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα η αύξηση της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων να μην επιδρά αρνητικά στο τελικό αποτέλεσμα. Επομένως, γενικότερα η αύξηση της ισχύος MW σε αυτές τις συνθήκες, οδηγεί σε βελτίωση της απόδοσης της MAE στον ίδιο χρόνο, με την προϋπόθεση πάντα ότι η θερμοκρασία στην οποία φτάνει το διάλυμα δεν είναι ικανή να προκαλέσει αποικοδόμηση των θερμικά ευαίσθητων ενώσεων. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι παρατεταμένη χρήση των μικροκυμάτων ενδεχομένως να επιδράσει αρνητικά στο λυκοπένιο που βρίσκεται εντός του εκχυλίσματος, οδηγώντας στην αποικοδόμησή του, με αποτέλεσμα η τελική μετρούμενη ποσότητα αυτού να είναι μικρότερη από την εκχυλιζόμενη.

Ταυτόχρονα λόγω της υψηλής έντασης μικροκυμάτων, την επίτευξη υψηλότερων θερμοκρασιών και την ταχεία ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος της μήτρας του δείγματος, ενδέχεται να μειωθεί η εκλεκτικότητα της εκχύλισης στην επιθυμητή ένωση, με αποτέλεσμα να εκχυλιστούν σημαντικές ποσότητες και άλλων ανεπιθύμητων συστατικών στο εκχύλισμα, ικανών να μειώσουν την καθαρότητα του τελικού εκχυλίσματος. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν διερευνάται περαιτέρω στην παρούσα διπλωματική, καθώς επικεντρώνεται μόνο στην ποσότητα του λυκοπενίου που μπορεί να ανακτηθεί από την πρώτη ύλη.

Από τα πειράματα που έγιναν, αποδείχθηκε ακόμη ότι η ισχύς των μικροκυμάτων, συνδέεται άμεσα με την ποσότητα του δείγματος που προστίθεται κατά την εκχύλιση για την περίπτωση της MAE. Έτσι όπως φαίνεται και από τα δείγματα E1-1-1 και E-11-1, η απόδοση αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας στερεού : διαλύτη για αυτές τις συνθήκες και αναλογίες.

❖ UAE

Κατά τη χρήση των υπερήχων έχει παρατηρηθεί ότι οι υπερθερμίες που προκαλούνται από τη βίαιη κατάρρευση των φυσαλίδων που παράγονται λόγω της επαναλαμβανόμενης σπηλαιώσης, σε συνδυασμό με τις ταυτόχρονες εναλλαγές της πίεσης στο διάλυμα που εκχυλίζεται, μπορούν να επιφέρουν ένα μεγάλο αριθμό χημικών μεταβολών είτε στο εσωτερικό των φυσαλίδων ατμού, είτε στη διεπιφάνεια με το υγρό μέσο και να προκαλέσουν ακόμη και αποικοδόμηση του λυκοπενίου που εκχυλίζεται. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από την κατάρρευση μιας τέτοιας φυσαλίδας ως αποτέλεσμα της τοπικά υψηλής θερμοκρασίας. Οι ρίζες αυτές είναι ικανές να σχηματίσουν στη συνέχεια παρουσία νερού, πρωτογενείς ελεύθερες ρίζες H[•] και OH[•], οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν αλυσιδωτά σε δευτερογενή προϊόντα ελευθέρων ριζών. Αυτές με τη

σειρά τους, μπορούν να επιδράσουν χημικά στο διάλυμα, διασπώντας διθειλυδικούς δεσμούς πρωτεϊνών και να επηρεάσουν το βαθμό υδροξυλίωσης μακρομορίων αυξάνοντας την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Έτσι παρουσία ακόμα και μικρής ποσότητας νερού, είναι ικανές να οδηγήσουν στην αποσύνθεση του λυκοπενίου που εκχυλίζεται. Συνεπώς, από τα αποτελέσματα των αποδόσεων για εκχύλιση με UAE και δεδομένου ότι τα καρτενοειδή αποτελούν γενικότερα ασταθείς ενώσεις, προέκυψε ότι η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για εντάσεις 300 και 600W σε αυτές τις συνθήκες, καθώς παρατηρήθηκε μεγάλη υποβάθμιση των ενώσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους εκχύλισης. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και άλλοι ερευνητές μετά από έρευνα για τη μέθοδο αυτή [119].

Ακόμη παρατηρήθηκε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν παρουσιάζει υψηλές αποδόσεις για εκχύλιση κυρίως σε πυκνά δείγματα (*E-111* και *E-11-1*). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη κυκλοφορία του υγρού και την ύπαρξη μικρό-ροών και αναταράξεων που προκαλούνται ως αποτέλεσμα της σπηλαίωσης από τη χρήση των υπερήχων στο διάλυμα. Τα φαινόμενα αυτά μπορούν να βοηθήσουν στην εξάλειψη των ποσοστών μεταφοράς μάζας, με αποτέλεσμα να δρουν τελικά παρεμποδιστικά στην εκχύλιση του λυκοπενίου όταν το προς εκχύλιση διάλυμα είναι πυκνότερο. Η χαμηλότερη απόδοση της UAE, ενδέχεται να οφείλεται και σε μη ομοιόμορφη κατανομή και έκθεση του δείγματος στους υπερήχους ή στην αντίσταση στα υπερηχητικά κύματα που προκαλείται για δείγματα με υψηλότερα ιξώδη (πιο πυκνά διαλύματα) σε συνδυασμό και με την επίδραση της θερμοκρασίας.

Ωστόσο ακόμα και για αυτή την περίπτωση τα πλεονέκτημα από τη χρήση των υπερήχων σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, είναι προφανή, όπως προκύπτει από τις υψηλότερες αποδόσεις των δειγμάτων τους.

Από τα πειράματα που έγιναν με τις τεχνικές MAE και UAE, παρατηρήθηκε ότι στην πρώτη περίπτωση η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με τη χρήση μόνο των υπερήχων. Έτσι προκύπτει ότι η αυξημένη απόδοση της MAE σε σχέση με την UAE, ενδεχομένως να οφείλεται μερικώς και στο γεγονός ότι η χρήση των υπερήχων αυξάνει εντονότερα τη θερμοκρασία της διεργασίας, η οποία έχει αποδειχθεί από πολλούς ερευνητές [120] ότι επιδρά θετικά στην απόδοση της εκχύλισης των καρτενοειδών, όταν η τιμή της δεν υπερβαίνει τους 50°C. Η θετική επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας στην απόδοση της εκχύλισης, οφείλεται στην καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στη κυτταρική δομή του στερεού δείγματος, σε συνδυασμό με τη θερμική καταπόνηση της μήτρας που περιέχει τα δραστικά συστατικά.

❖ UMAE

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε κυρίως ο συνδυασμός υπερήχων και μικροκυμάτων και η επίδρασή τους στην ανάκτηση του λυκοπενίου. Αυτή η συνδυασμένη μέθοδος UMAE, φαίνεται να αποτρέπει την παραγωγή ριζών υδροξυλίου από την υπερηχητική δράση της σπηλαίωσης για τα αραιά εκχυλίσματα, αποτρέποντας την αποσύνθεση του λυκοπενίου και αυξάνοντας σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης. Με τη βοήθεια της ακουστικής σπηλαίωσης και της ελεγχόμενης γρήγορης θέρμανσης των μικροκυμάτων, η εκχύλιση βελτιώνεται και η απόδοση λυκοπενίου αυξάνεται στον ίδιο χρόνο, συγκριτικά με την κάθε μέθοδο χωριστά. Η λογική εξήγηση στο γεγονός ότι η βοήθεια υπερήχων σε αυτή την περίπτωση δεν μείωσε την απόδοση του λυκοπενίου είναι ότι η αποσύνθεση του λυκοπενίου δεν είναι πολύ μεγάλη για να επηρεάσει την απόδοση, όταν οι δύο αυτές μέθοδοι λειτουργούν συνδυαστικά σε αραιά διαλύματα. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα και για τα αντίστοιχα πυκνά εκχυλιζόμενα δείγματα, όπου οι αποδόσεις ήταν σημαντικά μικρότερες. Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης αυτής μεθόδου φαίνεται να διαφοροποιούνται για χαμηλότερες εντάσεις και των δύο συνθηκών (ένταση MW και US), όπου τα πυκνότερα διαλύματα αποδίδουν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα από τα αντίστοιχα αραιά (Δείγματα E000, E00-1, E001).

Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι η UMAE όταν διεξάγεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες, είναι μια πιο ελκυστική μέθοδος ανάκτησης σε σχέση με την MAE και την UAE και σίγουρα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, ενώ τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από άλλες σχετικές έρευνες [121].

Σημειώνεται ότι, οι αποδόσεις και οι ποσότητες του λυκοπενίου που μετρήθηκαν για όλες τις περιπτώσεις συνδυασμών σε αυτές τις συνθήκες, μπορεί να είναι διαφορετικές από αυτές που εμφανίζονται σε άλλες βιβλιογραφίες. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική ποικιλία της πρώτης ύλης, τις συνθήκες επεξεργασίας, την περίοδο καλλιέργειας, το βαθμό ωρίμανσης της τομάτας που χρησιμοποιείται ή προηγούμενη επεξεργασία (εξάτμιση υγρασίας).

5.1.2 Παραγωγή Ξυδιού τομάτας

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση διαφόρων ειδών ξυδιών, μεταξύ των οποίων η δράση τους κατά της παχυσαρκίας, της αθηροσκλήρωσης και των υπερλιπιδαιμικών δραστηριοτήτων.

Από τις έρευνες των τελευταίων χρόνων αποδεικνύεται ότι η τομάτα αποτελεί ένα λειτουργικό τρόφιμο με πολλά θετικά οφέλη για την υγεία, λόγω της πλούσιας σύστασης του σε βιοδραστικά συστατικά όπως το λυκοπένιο και άλλα καροτενοειδή. Έτσι η παραγωγή οξικού οξέος από το χυμό της τομάτας αποκτά

μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των δυνατοτήτων του να αξιοποιηθεί ως λειτουργικό τρόφιμο και των θετικών επιδράσεων του για την υγεία. Διερευνήθηκε συνεπώς, η δυνατότητα ανάπτυξης ενός νέου προϊόντος ξυδιού από πλεονασματικές και ελαττωματικές τομάτες και χυμό που εξάγεται από τα παραπροϊόντα, για την πώληση του στην αγορά, ως ένα λειτουργικό τρόφιμο υψηλής διατροφικής και σημαντικής αγοραστικής αξίας.

Το ξύδι τομάτας παρασκευάστηκε μέσω της διεργασίας ζύμωσης δύο σταδίων που περιλάμβανε αρχικά αλκοολική και έπειτα οξική ζύμωση. Το πρώτο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης, κατά την οποία παρασκευάστηκε ο οίνος τομάτας από τον αρχικό χυμό, έδωσε αλκοόλη 5.58% μετά από παραμονή στον αντιδραστήρα στους 30 ° C με ανάδευση 200 rpm για 3 ημέρες. Παρόλα αυτά, η ποσότητα σακχάρων στο μέσο έφθασε κοντά στην ελάχιστη τιμή του έπειτα από δύο ημέρες. Έτσι κρίνεται ότι ένα καλό σημείο εκκίνησης της ζύμωσης με οξικό οξύ θα ήταν οι 2 ημέρες, προκειμένου να μειωθεί και το πρόσθετο κόστος της διεργασίας. Στη συνέχεια κατά το δεύτερο στάδιο της οξικής ζύμωσης, ο οίνος τομάτας που παράχθηκε από το πρώτο στάδιο, ζυμώθηκε στον βιοαντιδραστήρα στους 30 ° C για 9 ημέρες. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξήθηκε ταχέως μετά από 3 ημέρες και έφθασε στο 5.42% μετά από 9 ημέρες. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση αλκοόλης μειώθηκε απότομα μετά την τρίτη ημέρα και έφθασε τελικά κοντά στο 0% την τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Ως εκ τούτου, η μέγιστη περιεκτικότητα σε οξύτητα (5.42%) ελήφθη μετά από 13 ημέρες συνολικής ζύμωσης, ρυθμίζοντας την αρχική συγκέντρωση σακχάρων στο χυμό της τομάτας σε 12.2 ° Brix.

5.2 Προοπτικές για το μέλλον

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση για την πλήρη αξιοποίηση βιομηχανικών παραπροϊόντων τομάτας με σκοπό την παραγωγή εκχυλίσματος λυκοπενίου και οξικού οξέος από τομάτα, ως λειτουργικά προϊόντα με υψηλή διατροφική αξία για τον άνθρωπο. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για βαθύτερη έρευνα πάνω στον τομέα αξιοποίησης των συγκεκριμένων παραπροϊόντων για την παραγωγή χρήσιμων και θρεπτικών τροφίμων από τη βιομηχανία. Συγκεκριμένα μερικές μελλοντικές προτάσεις για περαιτέρω έρευνα θα μπορούσαν να είναι:

- ✓ Η ανάκτηση και άλλων βιοδραστικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων εκτός του λυκοπενίου από τα παραπροϊόντα τομάτας.
- ✓ Η ενσωμάτωση των βέλτιστων εκχυλισμάτων σε προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, με στόχο την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων. Ακόμη σε αυτήν την προοπτική, σκόπιμο θα ήταν να

πραγματοποιηθεί και μία μελέτη επίδρασης της ενσωμάτωσης του εκχυλίσματος σε προϊόντα, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

- ✓ Η διερεύνηση χρήσης των παραθθέντων εκχυλισμάτων λυκοπενίου για επέκταση της διατηρησιμότητας ορισμένων προϊόντων, λόγω των αντιοξειδωτικών τους λειτουργιών και ενδεχόμενη ενθυλάκωσή τους.
- ✓ Η διενέργεια τεχνοοικονομικής μελέτης για τον σχεδιασμό πιλοτικής μονάδας επεξεργασίας, ικανής να παράγει συμπυκνωμένα εκχυλίσματα λυκοπενίου ή/και οξικό οξύ με πρώτη ύλη τα παραπροϊόντα της βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας, βασισμένα στις μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία.
- ✓ Η διενέργεια πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής οξικού οξέος από το συγκεκριμένο παραπροϊόν. Η βελτιστοποίηση αυτή μπορεί να γίνει τόσο ως προς το χρόνο ζύμωσης για κάθε στάδιο, όσο και ως προς τις χρησιμοποιούμενες ποσότητες των μικροοργανισμών σε κάθε περίπτωση, για τη μείωση του κόστους της διεργασίας στο ελάχιστο δυνατό.
- ✓ Η αξιοποίηση του παραπροϊόντος των σπόρων για την παραγωγή βρώσιμων ελαίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. González, M., M.C. Cid, and M.G. Lobo, *Chapter 133 - Usage of Tomato (Lycopersicum esculentum Mill.) Seeds in Health A2 - Preedy, Victor R*, in *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, R.R. Watson and V.B. Patel, Editors. 2011, Academic Press: San Diego. p. 1123-1132.
2. Lazos, E.S., J. Tsaknis, and S. Lalas, *Characteristics and composition of tomato seed oil*. *Grasas y Aceites*; Vol 49, No 5-6 (1998), 1998.
3. Rossini, G., et al., *Analysis of the characteristics of the tomato manufacturing residues finalized to the energy recovery*. *Biomass and Bioenergy*, 2013. **51**: p. 177-182.
4. FAOSTAT. *World Crops Production*. 2016; Food and Agriculture Organization of the United Nations:[Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/-data/QC/visualize>.
5. WPTC, *General Secretary of World Processing Tomato Council (WPTC) in an exclusive interview* S. Colvine, Editor. 2016.
6. TIS, *Tomato News – Global consumption survey 2012/2013*. Tomatoland Information Service (2014), Suresnes (France): Tomatoland Information Service.
7. Zoran, I.S., K. Nikolaos, and Š. Ljubomir, *Tomato Fruit Quality from Organic and Conventional Production*, in *Organic Agriculture Towards Sustainability*, V. Pilipavicius, Editor. 2014, InTech: Rijeka. p. Ch. 07.
8. ΚΥΚΝΟΣ-Προϊόντα. 2017; Available from: <http://kyknoscanning.com/el/products/-proionta-tomatas>
9. FAOSTAT, (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (2015). <http://www.fao.org/economic/ess/ess-home/en/>.
10. Gould, W.A., *CHAPTER 1 - Introduction & History of the Tomato Industry*, in *Tomato Production, Processing and Technology (Third Edition)*. 1992, Woodhead Publishing. p. 3-17.
11. Στρατή, Ε.Φ., *Μελέτη μεθόδων παραλαβής καροτενοειδών από παραπροϊόντα τομάτας*, in *Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών*. 2014, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών
12. Gould, W.A., *CHAPTER 2 - Tomato Culture and Production for Processing*, in *Tomato Production, Processing and Technology (Third Edition)*. 1992, Woodhead Publishing. p. 19-81.
13. Strati, I.F. and V. Oreopoulou, *Recovery of carotenoids from tomato processing by-products – a review*. *Food Research International*, 2014. **65**: p. 311-321.

14. Lazos, E.S., J. Tsaknis, and S. Lalas, *Characteristics and composition of tomato seed oil*. *Grasas y Aceites*; Vol 49, No 5-6 (1998)DO - 10.3989/gya.1998.v49.i5-6.755, 1998.
15. Lazos, E.S. and P. Kalathenos, *Technical Note: Composition of tomato processing wastes*. *International Journal of Food Science & Technology*, 1988. **23**(6): p. 649-652.
16. Knoblich, M., B. Anderson, and D. Latshaw, *Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005. **85**(7): p. 1166-1170.
17. Del Valle, M., M. Cámara, and M.E. Torija, *Chemical characterization of tomato pomace*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006. **86**(8): p. 1232-1236.
18. WPTC. *World production estimate*. 2016; Available from: <http://www.wptc.to/releases-wptc.php>.
19. Ruiz Celma, A., F. Cuadros, and F. López-Rodríguez, *Characterization of pellets from industrial tomato residues*. *Food and Bioprocess Processing*, 2012. **90**(4): p. 700-706.
20. Reboul, E., et al., *Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and beta-carotene bioavailability in men*. *J Nutr*, 2005. **135**(4): p. 790-4.
21. Benakmoum, A., et al., *Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste*. *Food Chemistry*, 2008. **110**(3): p. 684-690.
22. Strazzullo, G., et al., *Solid Wastes of Tomato-Processing Industry (*Lycopersicon esculentum* `Hybrid Rome`) as Renewable Sources of Polysaccharides*. *Journal of Food Technology*, 2003. **1**: p. 102-105.
23. Unal, H. and K. Alibas, *Agricultural Residues as Biomass Energy*. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy*, 2007. **2**(2): p. 123-140.
24. Sabio, E., et al., *Conversion of tomato-peel waste into solid fuel by hydrothermal carbonization: Influence of the processing variables*. Vol. 47. 2015.
25. O'Shea, N., E.K. Arendt, and E. Gallagher, *Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012. **16**: p. 1-10.
26. Farahnaky, A., et al., *THE USE OF TOMATO PULP POWDER AS A THICKENING AGENT IN THE FORMULATION OF TOMATO KETCHUP*. *Journal of Texture Studies*, 2008. **39**(2): p. 169-182.
27. Altan, A., K.L. McCarthy, and M. Maskan, *Evaluation of snack foods from barley–tomato pomace blends by extrusion processing*. *Journal of Food Engineering*, 2008. **84**(2): p. 231-242.

28. Wadhwa, M.B., M. P. S., *Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products*. 2013, FAO 2013: RAP Publication 2013/04.
29. Sarada, R. and R. Joseph, *A comparative study of single and two stage processes for methane production from tomato processing waste*. *Process Biochemistry*, 1996. **31**(4): p. 337-340.
30. Toor, R.K. and G.P. Savage, *Antioxidant activity in different fractions of tomatoes*. *Food Research International*, 2005. **38**(5): p. 487-494.
31. Silva, Y.P.A., et al., *TOMATO INDUSTRIAL WASTE AS POTENTIAL SOURCE OF NUTRIENTS*, in *XXV Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2016: Gramado, Brazil.
32. Kaur, D., et al., *Flotation-cum-sedimentation system for skin and seed separation from tomato pomace*. *Journal of Food Engineering*, 2005. **71**(4): p. 341-344.
33. Kalogeropoulos, N., et al., *Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts*. *LWT - Food Science and Technology*, 2012. **49**(2): p. 213-216.
34. Lavelli, V. and M.C. Torresani, *Modelling the stability of lycopene-rich by-products of tomato processing*. *Food Chemistry*, 2011. **125**(2): p. 529-535.
35. *Ministry of Rural Development and Food (2012), Cultivation and processing data of industrial tomato in Greece*. Division of Manufacturing & Quality Control of Agricultural Food Production.
36. Peng, Y., Y. Zhang, and J. Ye, *Determination of Phenolic Compounds and Ascorbic Acid in Different Fractions of Tomato by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(6): p. 1838-1844.
37. García-Valverde, V., et al., *Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars*. *Food and Bioprocess Technology*, 2013. **6**(2): p. 391-402.
38. Vinha, A.F., et al., *Chemical Composition and Antioxidant Activity of Portuguese Diospyrus Kaki Fruit by Geographical Origins*. 2011, 2011. **4**(2).
39. F. Vinha, A., et al., *Influence of the Storage Conditions on the Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Microbial Flora of Different Tomato (Lycopersicon esculentum L.) Cultivars*. 2013, 2013. **5**(2).
40. Vinha, A.F., et al., *Effect of peel and seed removal on the nutritional value and antioxidant activity of tomato (Lycopersicon esculentum L.) fruits*. *LWT - Food Science and Technology*, 2014. **55**(1): p. 197-202.

41. Higdon, J., *Linus Pauling Institute, Oregon State University (2016)*. "Carotenoids: α -Carotene, β -Carotene, β -Cryptoxanthin, Lycopene, Lutein, and Zeaxanthin". <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids>.
42. Botineştean, C., A.T. Gruia, and I. Jianu, *Utilization of seeds from tomato processing wastes as raw material for oil production*. Journal of Material Cycles and Waste Management, 2015. **17**(1): p. 118-124.
43. Szalay, J. *Live Science-What Are Carotenoids?* October 15, 2015
44. Stahl, W. and H. Sies, *Bioactivity and protective effects of natural carotenoids*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2005. **1740**(2): p. 101-107.
45. Bendich, A. and J.A. Olson, *Biological actions of carotenoids*. The FASEB Journal, 1989. **3**(8): p. 1927-1932.
46. Βαλαβανίδης, Θ. and Κ. Ευσταθίου. *Η χημική ένωση του μήνα: Λυκοπένιο*. 2013; Available from: http://195.134.76.37/chemicals/chem_lycopene.htm.
47. Britton, G., *Carotenoids, Vol. 1B, Spectroscopy*, edited by G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander, ch. 2, B. Verlag, Editor. 1995: Berlin p. 13-44.
48. Schierle, J., et al., *Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma*. Food Chemistry, 1997. **59**(3): p. 459-465.
49. Lin, C.H. and B.H. Chen, *Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **1012**(1): p. 103-109.
50. Tonucci, L.H., et al., *Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food Products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(3): p. 579-586.
51. *Lycopene-STRUCTURE AND CHEMICAL PROPERTIES*. Available from: <http://lycopene.com/>.
52. Rath, S., Z. Olempska-Bier, and P.M. Kuznesof, *FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), LYCOPENE EXTRACT FROM TOMATO Chemical and Technical Assessment (CTA)*
53. RIZK, E.M., S.H. BEDIER, and A.E.G. MANAL, *UTILIZATION OF CAROTENOID PIGMENTS EXTRACTED FROM TOMATO PEEL AS NATURAL ANTIOXIDANTS AND COLORANTS IN SUNFLOWER OIL AND SPAGHETTI* Egyptian Journal of Agricultural Research, 2014. **92**(1): p. 309-319.
54. Periago, M.J., et al., *Mixture Approach for Optimizing Lycopene Extraction from Tomato and Tomato Products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(19): p. 5796-5802.

55. Ho, K.K.H.Y., et al., *Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **62**(1): p. 160-168.
56. Μισυρλή, Θ.-Β., *Αξιοποίηση παραπροϊόντων ελαιολαιού για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης: Διερεύνηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης*, in *Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙ: Ανάλυση, Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Διεργασιών και Συστημάτων*. 2015, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα.
57. *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης-Σημειώσεις Οργανικών Εργαστηρίων EXTRACT*. Available from: http://www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACT.pdf.
58. Μπακέα, Ε. and Κ. Ευσταθίου, *Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς, Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα 'Ενόργανη Ανάλυση Ι'*. 2008.
59. *Εργαστηριακή Άσκηση ΕΚΧΥΛΙΣΗ*. Available from: <https://e-class.teilar.gr/modules/document/file.php/DIET221/%C3%8E%E2%80%A23.EKXYLISH.pdf>.
60. Ανδρικόπουλος, Ν.Κ., *Ανάλυση Τροφίμων: Θεωρία Μεθοδολογίας-Οργανολογίας και Εργαστηριακές Ασκήσεις*. 2010: Εκδόσεις ΜΠΙΣΤΙΚΕΑ.
61. Wang, L. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(6): p. 300-312.
62. Heines, R. and C. Oliveros. *CALTEST STANDARD OPERATING PROCEDURE: SOXHLET EXTRACTION METHOD* 2009; Available from: [http://www.swrcb.ca.gov/public_notices/petitions/water_quality/docs/a2239/overview/Communications/AR-Comm \(119\).pdf](http://www.swrcb.ca.gov/public_notices/petitions/water_quality/docs/a2239/overview/Communications/AR-Comm (119).pdf).
63. Hao, J.-y., et al., *Microwave-assisted extraction of artemisinin from Artemisia annua L*. Separation and Purification Technology, 2002. **28**(3): p. 191-196.
64. Παπαοικονόμου, Λ. and Κ.Γ. Αδαμόπουλος, *ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΦΛΟΙΟΥΣ ΡΟΔΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ*, in *Τμήμα Χημικών Μηχανικών 2016 Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Θεσσαλονίκη*
65. Chemat, F., M. Abert-Vian, and X. Fernandez, *Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas*, in *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, F. Chemat and G. Cravotto, Editors. 2013, Springer US: Boston, MA. p. 53-113.
66. Μπαμπούλη, Α. and Μ. Κροκίδα, *Επίδραση μεθόδων εκχύλισης στην αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων μαστιχόδεντρου από τη Χίο*, in *Σχολή Χημικών Μηχανικών Φεβρουάριος 2014, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα*.

67. Κόκκινος, Χ. *Χημικό Εργαστήριο-Παραλαβή αιθερίων ελαίων*. Available from: http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2010/02/blog-post_12.html.
68. Χατζηαντωνίου-Μαρούλη, Κ. and Α. Μαρούλης. *Πράσινη Χημεία 2012*; Available from: <http://www.gcex.gr/wp-content/uploads/2012/02/flowers-and-fruits-green-chemistry-web.pdf>
69. Veggi, P.C., J. Martinez, and M.A.A. Meireles, *Fundamentals of Microwave Extraction, in Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, F. Chemat and G. Cravotto, Editors. 2013, Springer US: Boston, MA. p. 15-52.
70. Guolin, H., et al. *Journal of Analytical Methods in Chemistry-Application of Ionic Liquids in the Microwave: Assisted Extraction of Pectin from Lemon Peels*. 2011; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2012/302059/fig1/>.
71. Guolin, H., et al., *Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Pectin from Lemon Peels*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012. **2012**: p. 8.
72. Valdés, A., et al., *Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Almond Skin Byproducts (Prunus amygdalus): A Multivariate Analysis Approach*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(22): p. 5395-5402.
73. Wang, L., P. Qin, and Y. Hu, *Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea*. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 2010. **4**(3): p. 307-313.
74. Καλτσά, Ο. *Η Χρήση των Υπερήχων στην Τεχνολογία Τροφίμων*. Available from: <http://www.foodbites.eu/j15/el/science-news/epexergasies/821-ultrasonics>.
75. Vardanega, R., D.T. Santos, and M.A.A. Meireles, *Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation*. *Pharmacognosy Reviews*, 2014. **8**(16): p. 88-95.
76. Lorimer, J.P. and T.J. Mason, *Sonochemistry. Part 1-The physical aspects*. *Chemical Society Reviews*, 1987. **16**(0): p. 239-274.
77. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017. **34**: p. 540-560.
78. Khoddami, A., M. Wilkes, and T. Roberts, *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds*. *Molecules*, 2013. **18**(2): p. 2328.
79. Poojary, M.M. and P. Passamonti, *Optimization of extraction of high purity all-trans-lycopene from tomato pulp waste*. *Food Chemistry*, 2015. **188**: p. 84-91.

80. Sparr Eskilsson, C. and E. Björklund, *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A, 2000. **902**(1): p. 227-250.
81. Sabio, E., et al., *Lycopene and β -Carotene Extraction from Tomato Processing Waste Using Supercritical CO₂*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2003. **42**(25): p. 6641-6646.
82. Ishida, B.K. and M.H. Chapman, *Carotenoid Extraction from Plants Using a Novel, Environmentally Friendly Solvent*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(3): p. 1051-1059.
83. Salvador, M.D., et al., *Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability*. Food Chemistry, 2001. **74**(3): p. 267-274.
84. Naviglio, D., et al., *Extraction of pure lycopene from industrial tomato by-products in water using a new high-pressure process*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008. **88**(14): p. 2414-2420.
85. Perretti, G., et al., *Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, 2013. **82**: p. 177-182.
86. Lo Presti, M., et al., *A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(3): p. 273-280.
87. Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics Sonochemistry, 2001. **8**(3): p. 303-313.
88. Rajendran, V., Y.S. Pu, and B.H. Chen, *An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum*. Journal of Chromatography B, 2005. **824**(1): p. 99-106.
89. Chen, J.P., C.Y. Tai, and B.H. Chen, *Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.)*. Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1): p. 261-268.
90. Mayeaux, M., et al., *Effects of Cooking Conditions on the Lycopene Content in Tomatoes*. Journal of Food Science, 2006. **71**(8): p. C461-C464.
91. Anguelova, T. and J. Warthesen, *Lycopene Stability in Tomato Powders*. Journal of Food Science, 2000. **65**(1): p. 67-70.
92. Κουπάρης, Μ. *Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)*, Image Available from: <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/%CE%9A%CE%95%CE%A6.20%CE%92%CE%A5%CE%93%CE%A1%CE%97%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91.pdf>

93. International_Carotenoid_Society. *Carotenoids: Lycopene*. 2017; Available from: <http://www.carotenoidsociety.org/carotenoids>.
94. Nigam, P.S. and J.S. Luke, *Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties*. Current Opinion in Food Science, 2016. **7**: p. 93-100.
95. Wilson, B.G. and S.L. Bahna, *Adverse reactions to food additives*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2005. **95**(6): p. 499-507.
96. Tuli, H.S., et al., *Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives*. Journal of Food Science and Technology, 2015. **52**(8): p. 4669-4678.
97. Walker, P.M.B., *Chambers science and technology dictionary* 1988 Chambers-Cambridge p. 1008, xvi.
98. Kavya, S.E., *Evaluation of tomato varieties for fermented beverage and vinegar production in Agricultural Microbiology*. 2013, University of Agricultural Sciences, GKVK: Bengaluru.
99. Yoon, K.Y., E.E. Woodams, and Y.D. Hang, *Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria*. Journal of microbiology (Seoul, Korea), 2004. **42**(4): p. 315-318.
100. Lee, J.-H., et al., *New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 3241-3249.
101. Budak, N.H., et al., *Effects of Apple Cider Vinegars Produced with Different Techniques on Blood Lipids in High-Cholesterol-Fed Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(12): p. 6638-6644.
102. Sakakibara, S., et al., *Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **344**(2): p. 597-604.
103. Fushimi, T., et al., *Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet*. British Journal of Nutrition, 2007. **95**(5): p. 916-924.
104. Kondo, T., et al., *Vinegar Intake Reduces Body Weight, Body Fat Mass, and Serum Triglyceride Levels in Obese Japanese Subjects*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009. **73**(8): p. 1837-1843.
105. Σαββαΐδης, Ι., «Γενική Μικροβιολογία. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΖΥΜΩΣΕΙΣ. 2014, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Τμήμα Χημείας Ιωάννινα p. 69-77.
106. Ρούσσης, Ι., *Διαφάνειες Παραδόσεων Οινολογίας: Βακτήρια γλεύκους και οίνου. Μηλογαλακτική ζύμωση*. 2015-16, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων:
http://ecourse.uoi.gr/pluginfile.php/107902/mod_resource/content/2/%CE%99%CE%A1%CE%9F%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%828.pdf

107. González, Á., et al., *Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **96**(4): p. 853-860.
108. *Wikimedia Commons (Image)*. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Allyl-alcohol-3D-balls-2.png>
109. *Science Photo Library (Image)*. Available from: <http://www.sciencephoto.com/media/426102/view>.
110. *Wikipedia: Saccharomyces cerevisiae (Image)*. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae.
111. *The Delicious Dietitian (Image)*. Available from: <http://4tdd.com/product/tomato-wine-vinegar/>.
112. *Image*. Available from: <http://www.cditchen.com/recipes/course/drinks/tomato-juice/>.
113. *Image* Available from: <http://www.pngall.com/sugar-png>.
114. *Microbe Wiki (Image)*. Available from: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacter_aceti.
115. Τζιά, Κ., Π. Ταούκης, and Β. Ωραιοπούλου, *Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Σημειώσεις από τις παραδόσεις* in *Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Συστατικά-Ιδιότητες-Ποιότητα-Μικροβιολογία-Ρεολογία-Συσκευασία*, Ε.Ε.Μ. Πολυτεχνείου, Editor. 2009, Ε.Μ. Πολυτεχνείο: Αθήνα p. 84-119.
116. Παπαδέα, Κ., *Παραγωγή οξικού οξέος (ξυδιού) από λευκό κρασί και συμπυκνωμένο εκχύλισμα ξηρής σταφίδας με τη χρήση των βακτηρίων Acetobacter pasteurianus & Gluconobacter oxydans*, in *Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών*. 2016, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Αθήνα
117. Lee, M.T. and B.H. Chen, *Separation of lycopene and its cis isomers by liquid chromatography*. Chromatographia, 2001. **54**(9): p. 613-617.
118. Chen, B.H., H.Y. Peng, and H.E. Chen, *Changes of Carotenoids, Color, and Vitamin A Contents during Processing of Carrot Juice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(7): p. 1912-1918.
119. Zhao, L., et al., *Different Effects of Microwave and Ultrasound on the Stability of (all-E)-Astaxanthin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(21): p. 8346-8351.
120. Kaur, D., et al., *Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology*. Food Chemistry, 2008. **108**(2): p. 711-718.

121. Lianfu, Z. and L. Zelong, *Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008. **15**(5): p. 731-737.

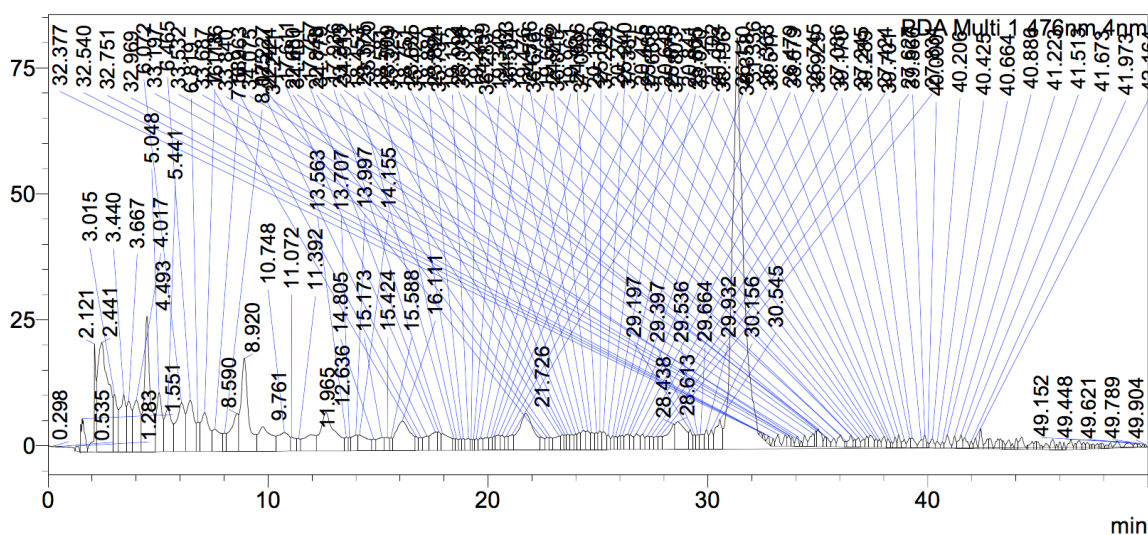
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χρωματογραφήματα HPLC

Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν τα αποτελέσματα των Χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από το λογισμικό επεξεργασίας του HPLC. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν τα δείγματα που αναλύθηκαν κατά τις εκχυλίσεις και την παραγωγή οξικού οξέος από τα παραπροϊόντα τομάτας.

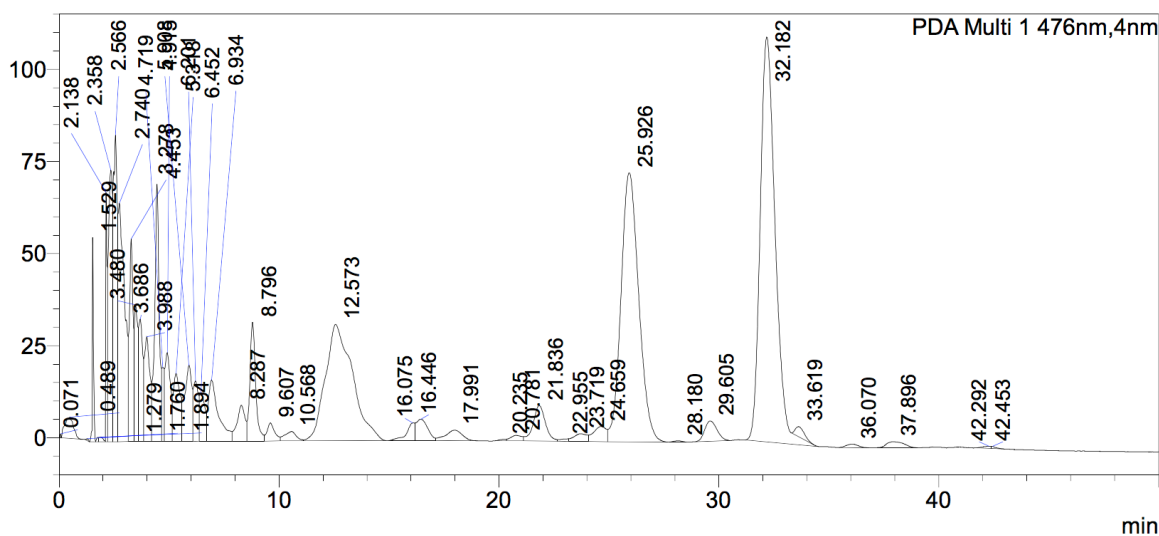
❖ Χρωματογραφήματα δειγμάτων από εκχυλίσεις

mAU



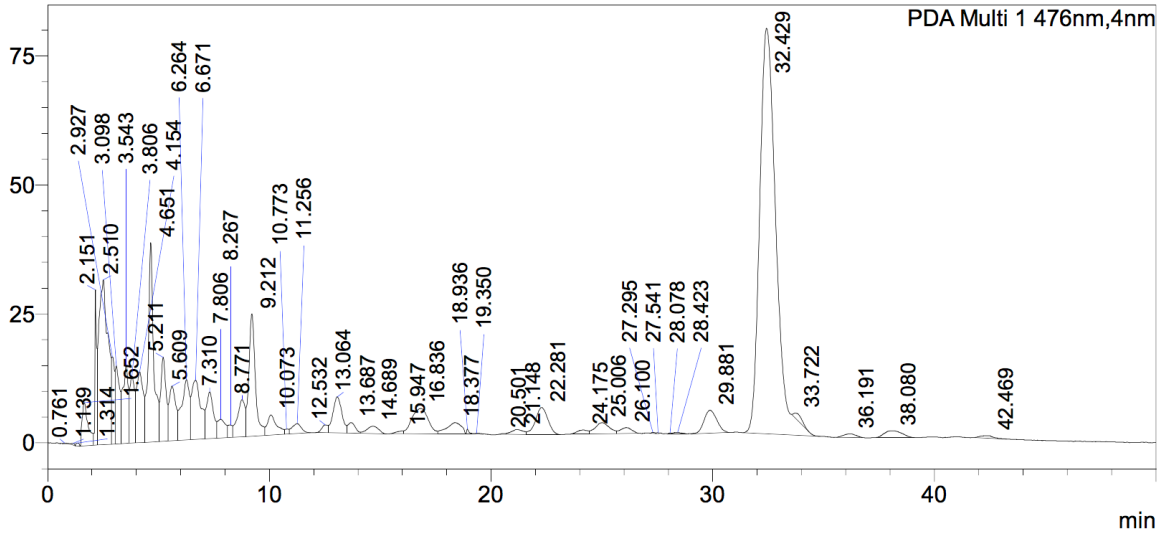
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα πειράματος E-111

mAU



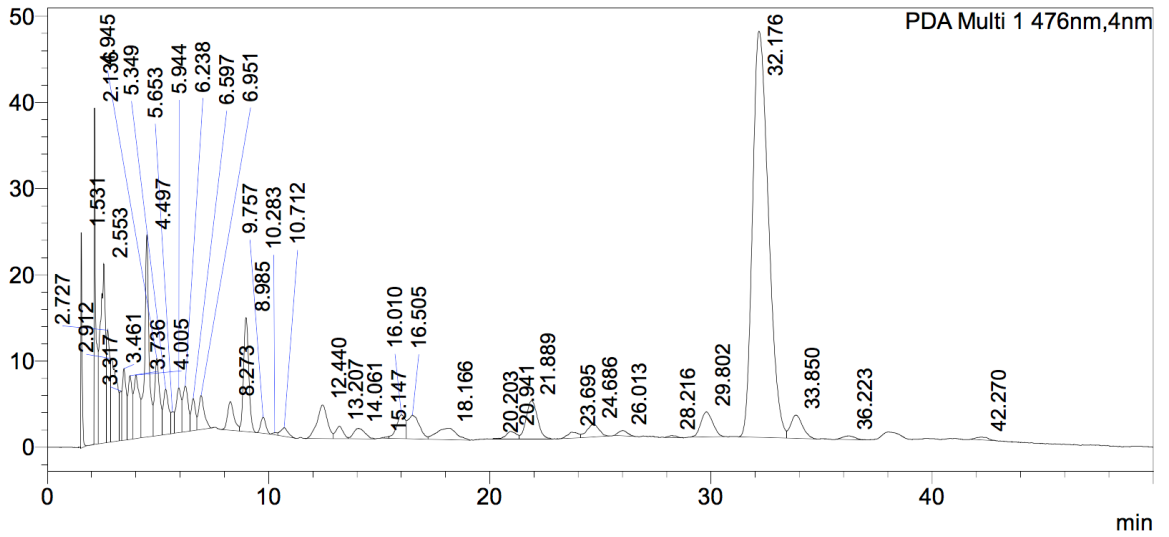
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα πειράματος E010

mAU



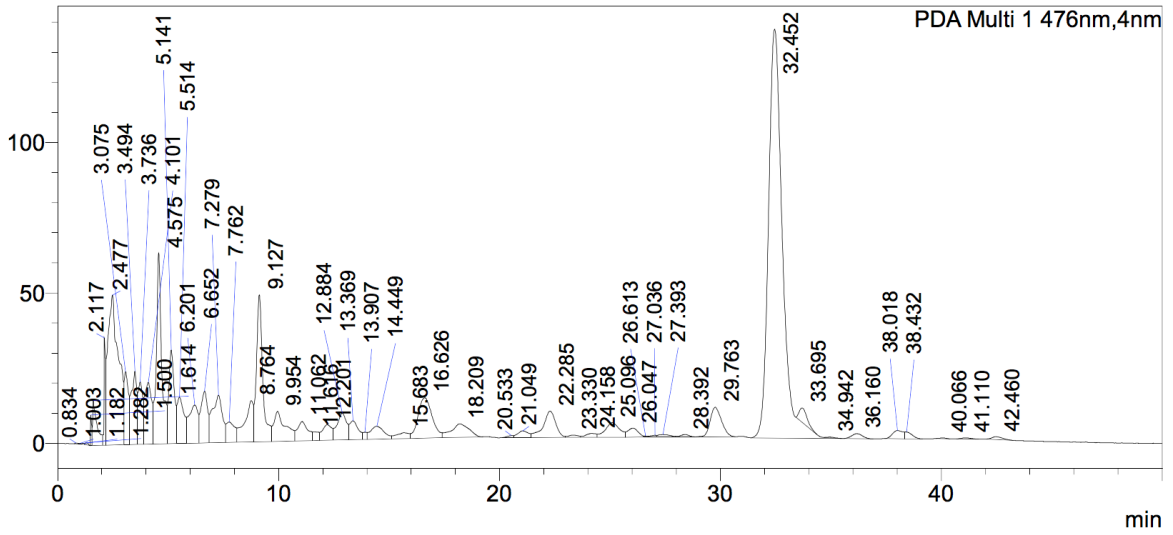
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα πειράματος E000

mAU



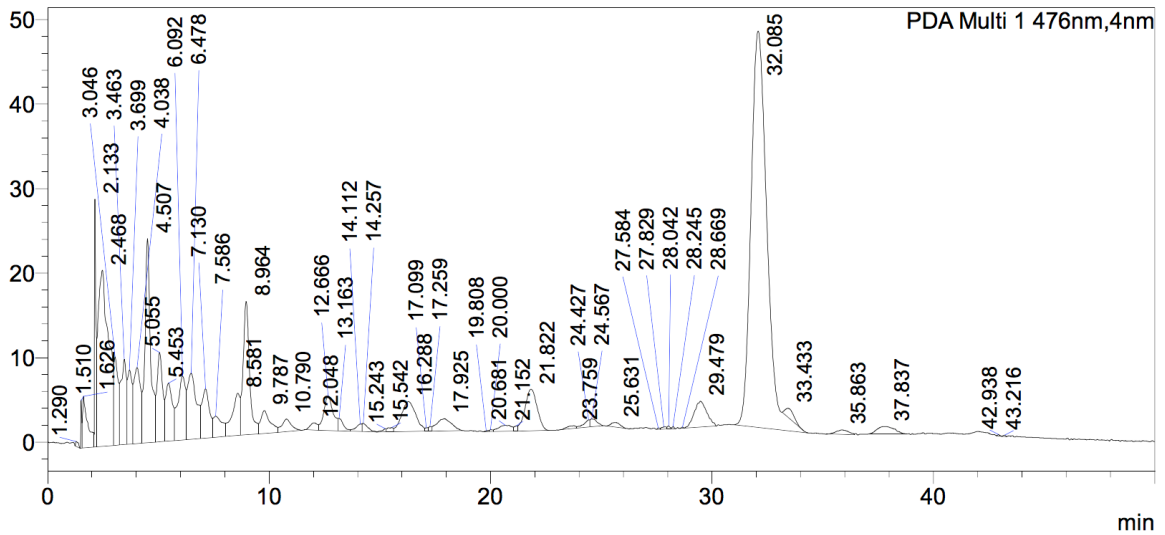
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα πειράματος E0-10

mAU



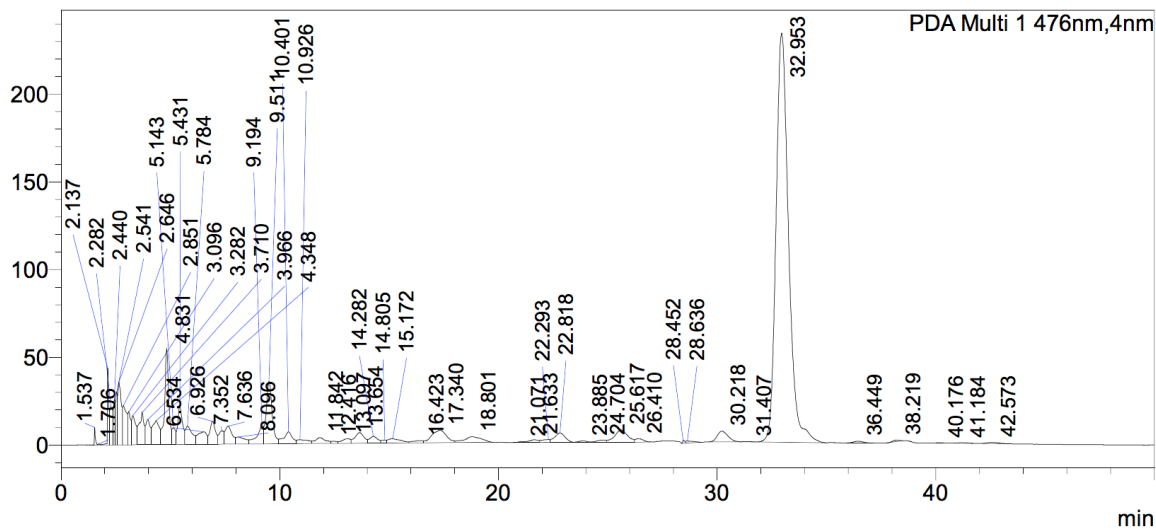
Εικόνα 32: Χρωματογράφημα πειράματος E-1-1-1

mAU



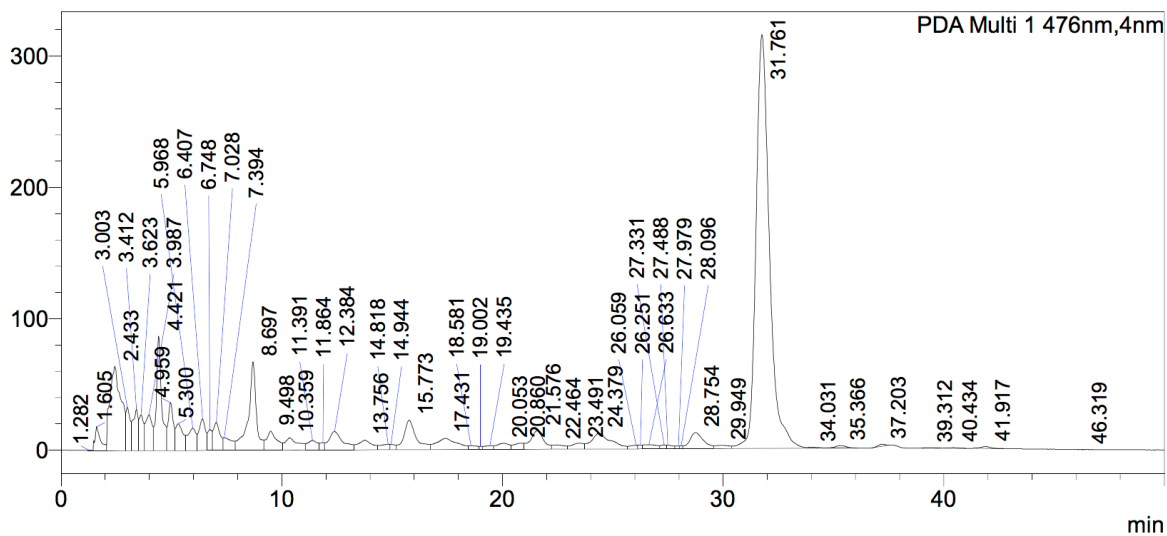
Εικόνα 33: Χρωματογράφημα πειράματος E001

mAU

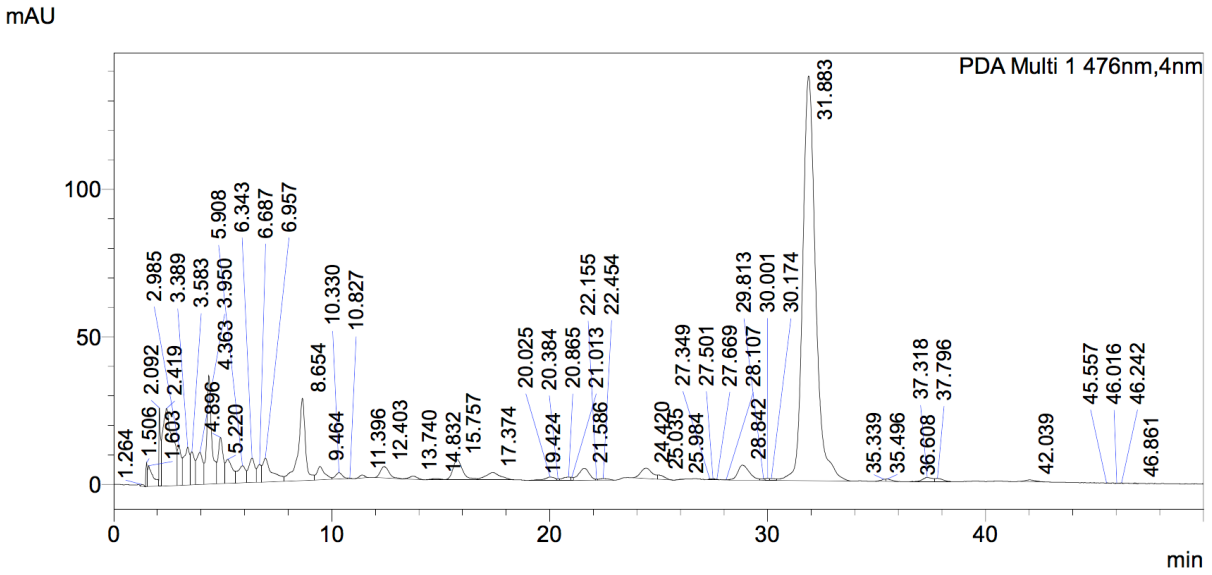


Εικόνα 34: Χρωματογράφημα πειράματος E100

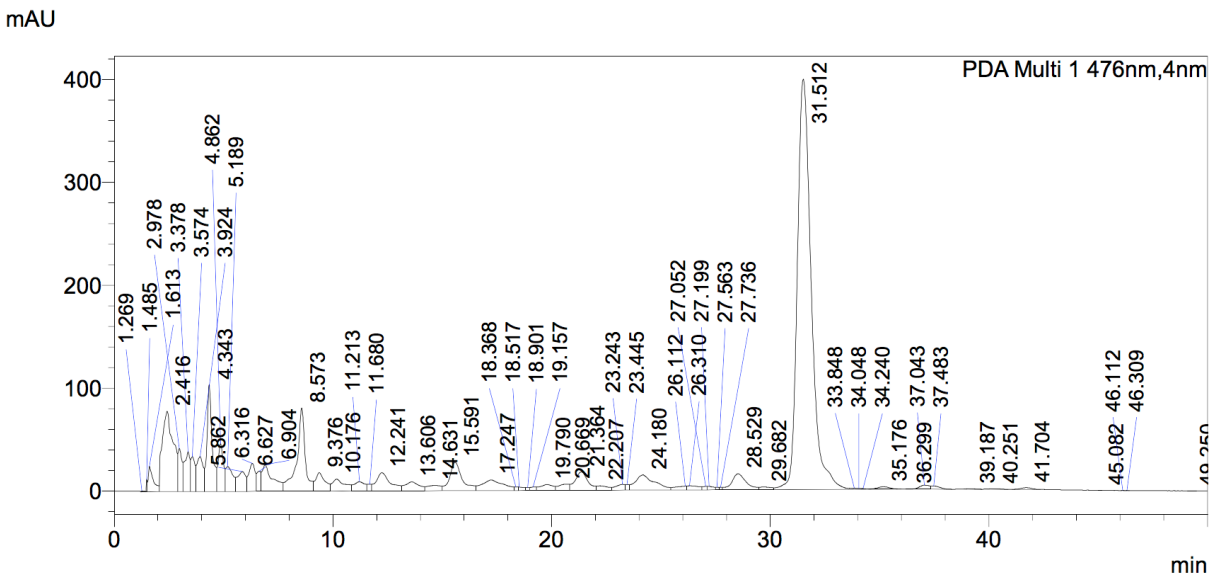
mAU



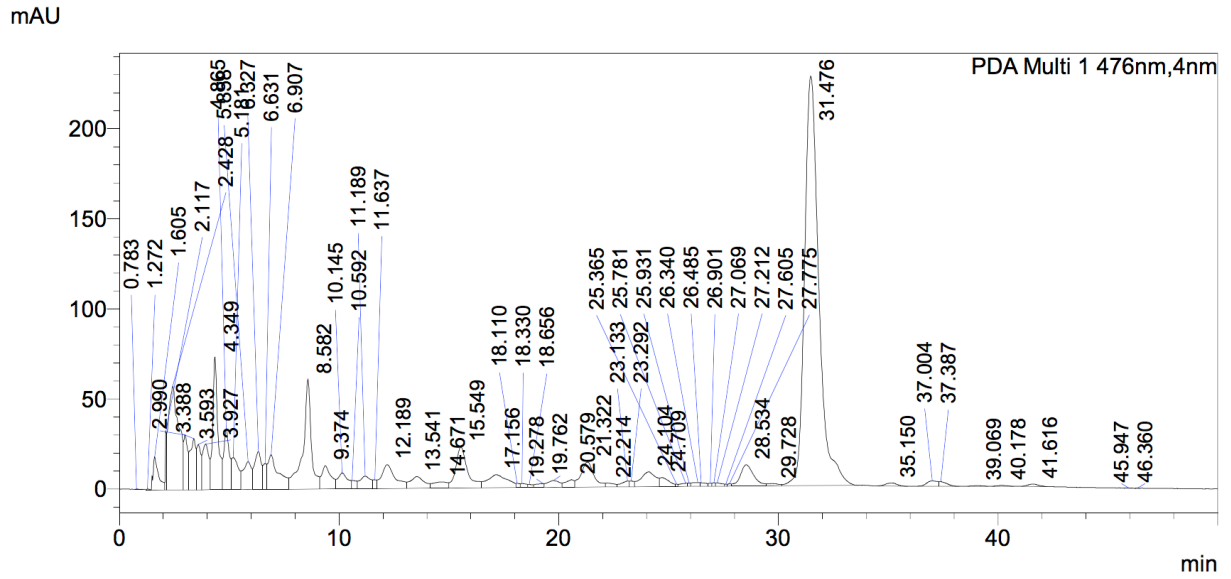
Εικόνα 35: Χρωματογράφημα πειράματος E11-1



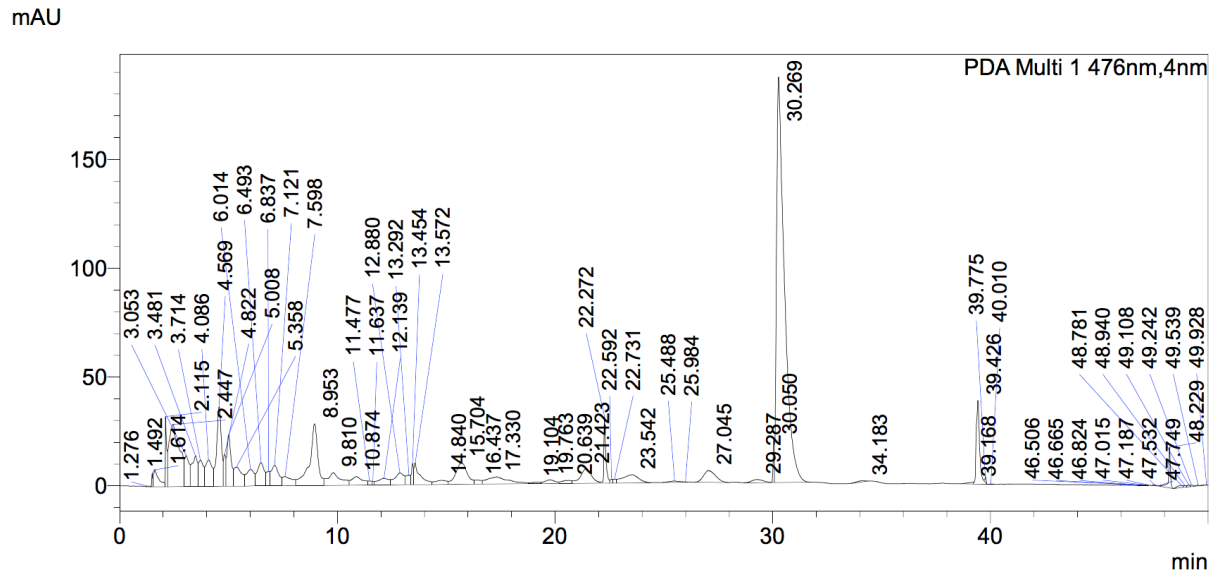
Εικόνα 36: Χρωματογράφημα πειράματος E000



Εικόνα 37: Χρωματογράφημα πειράματος E00-1

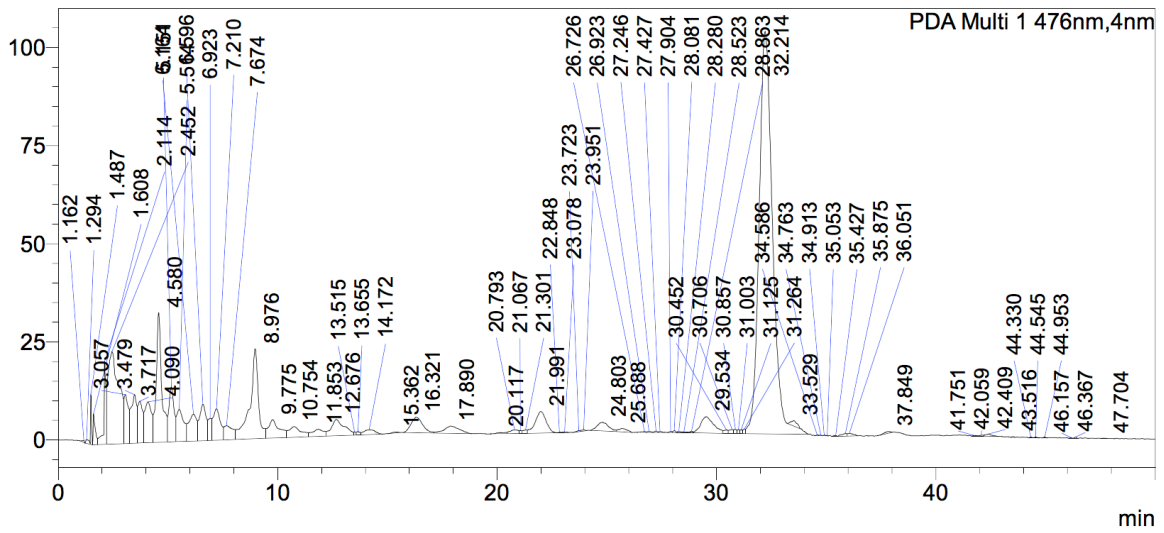


Εικόνα 38: Χρωματογράφημα πειράματος E-11-1



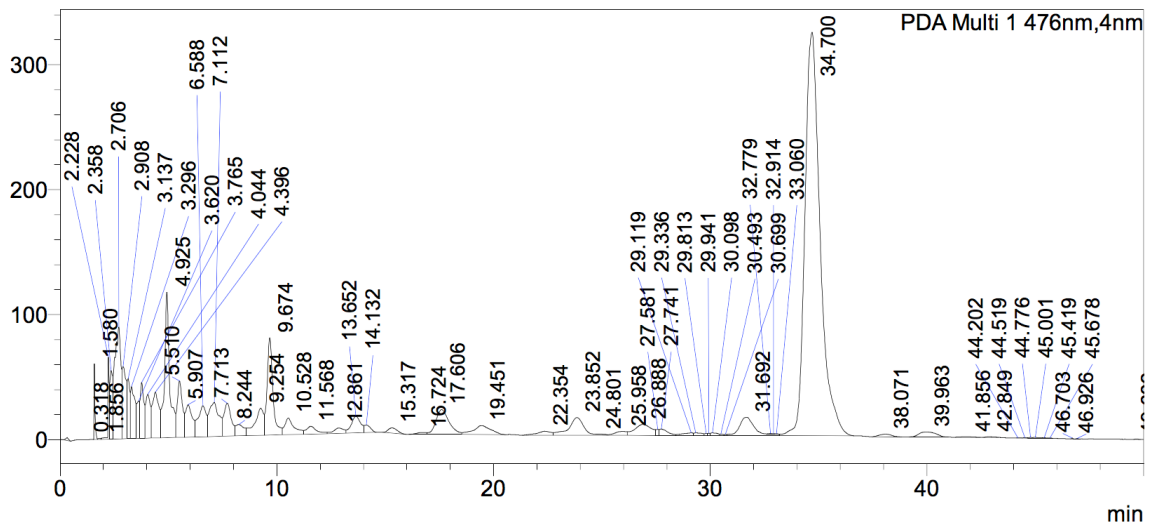
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα πειράματος E-100

mAU



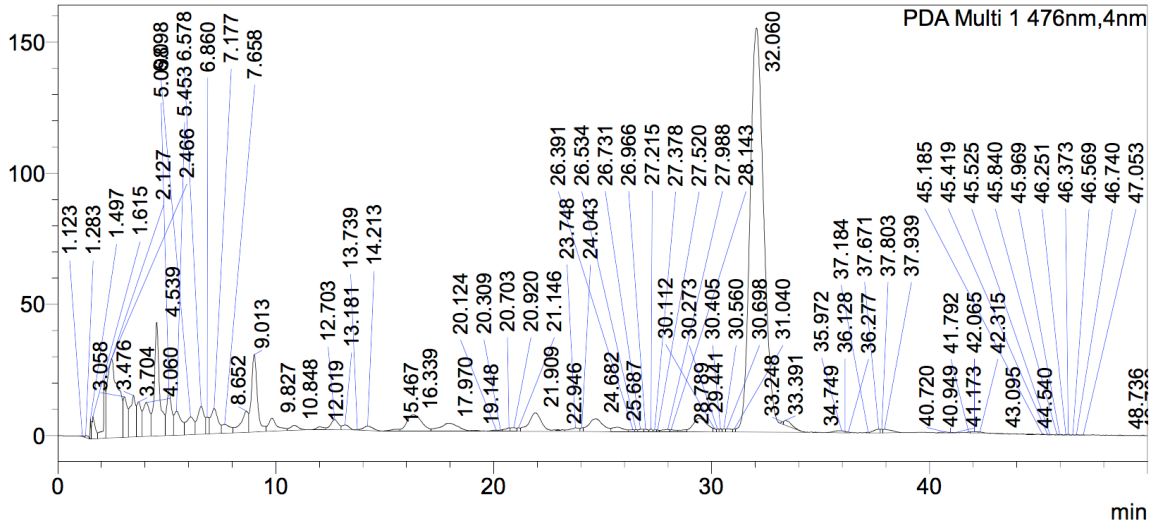
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα πειράματος E1-11

mAU



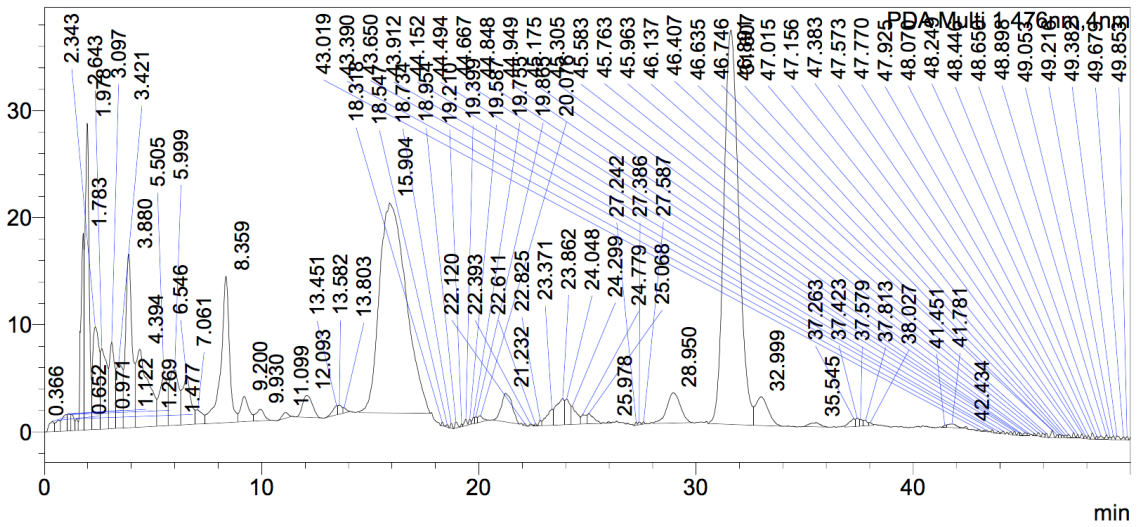
Εικόνα 41: Χρωματογράφημα πειράματος E1-1-1

mAU



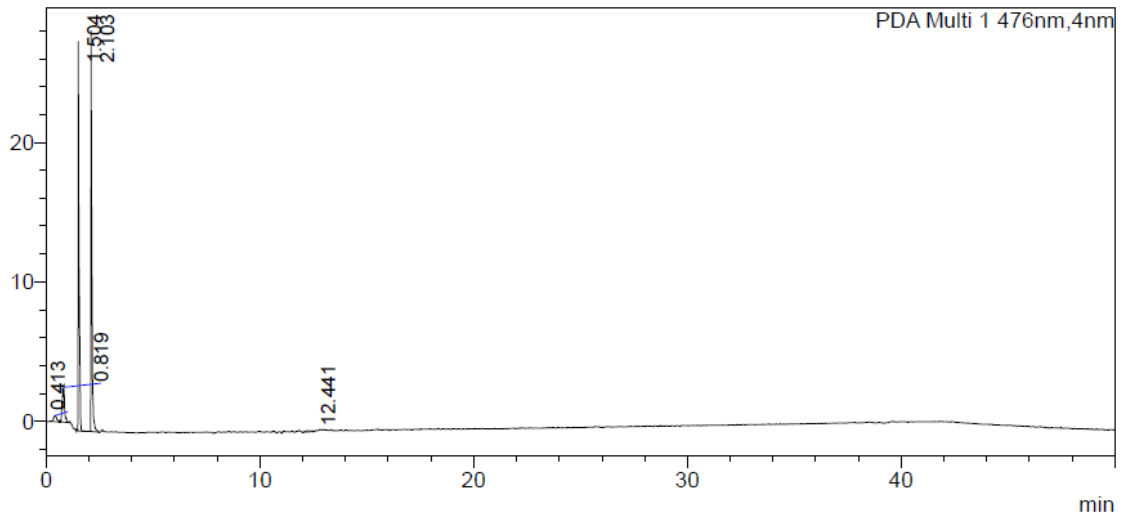
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα πειράματος E111

mAU



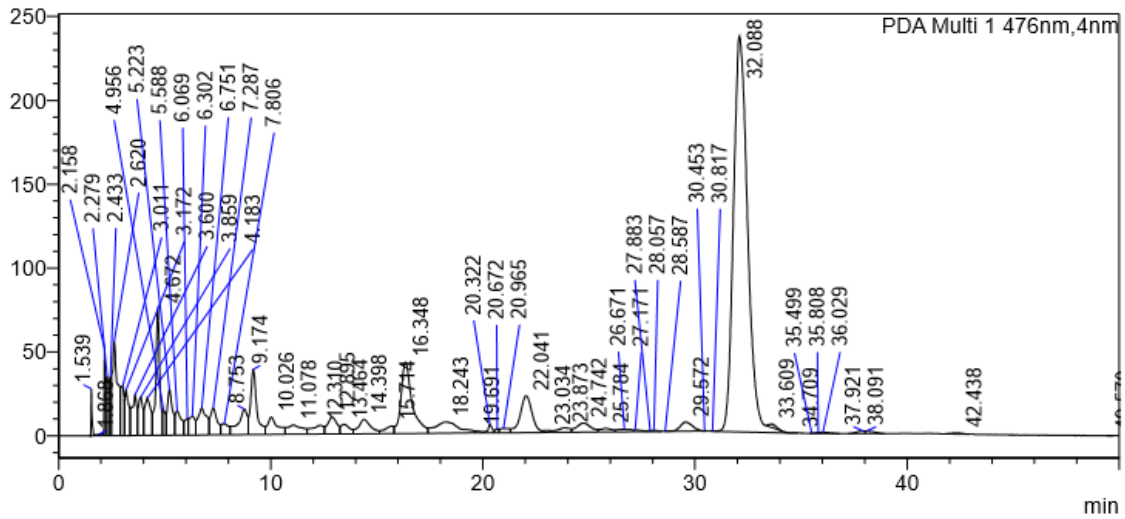
Εικόνα 43: Χρωματογράφημα πειράματος E-1-11

mAU



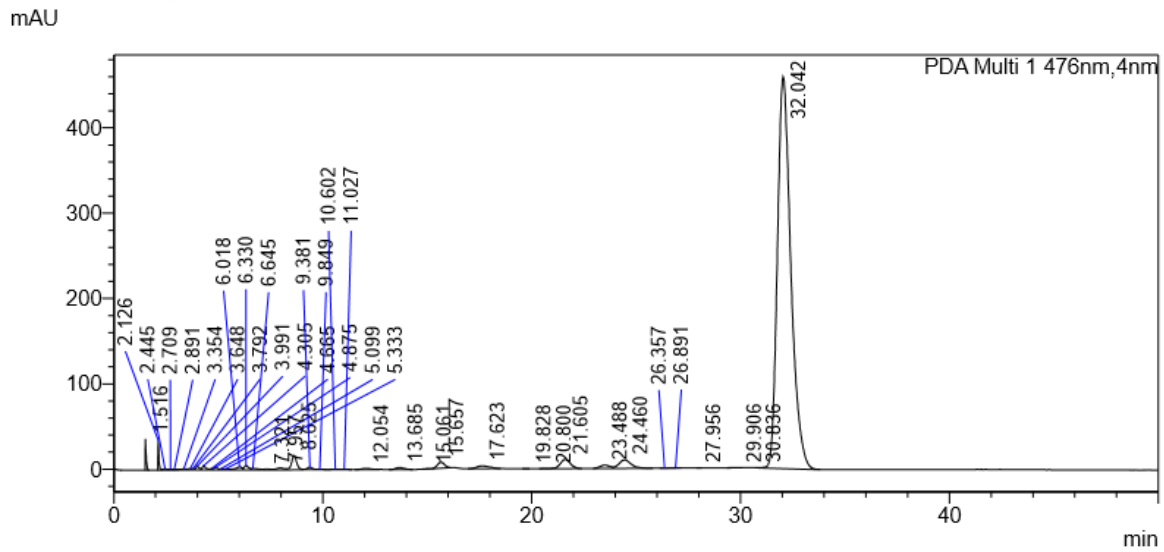
Εικόνα 44: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (χλωριούχο μεθυλένιο)

mAU

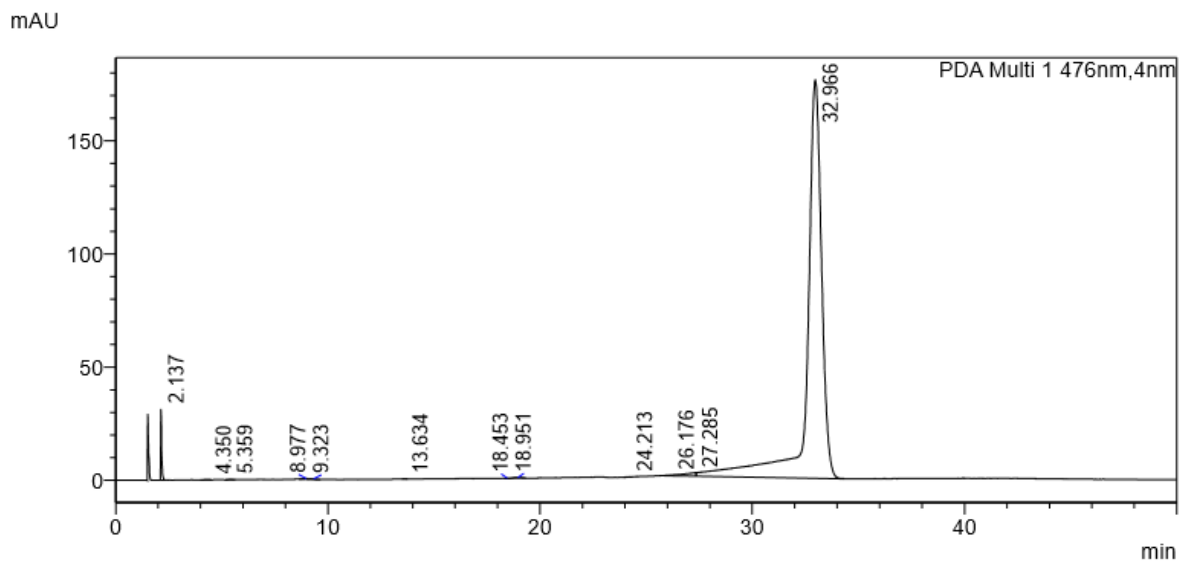


Εικόνα 45: Χρωματογράφημα εκχύλισης Soxhlet

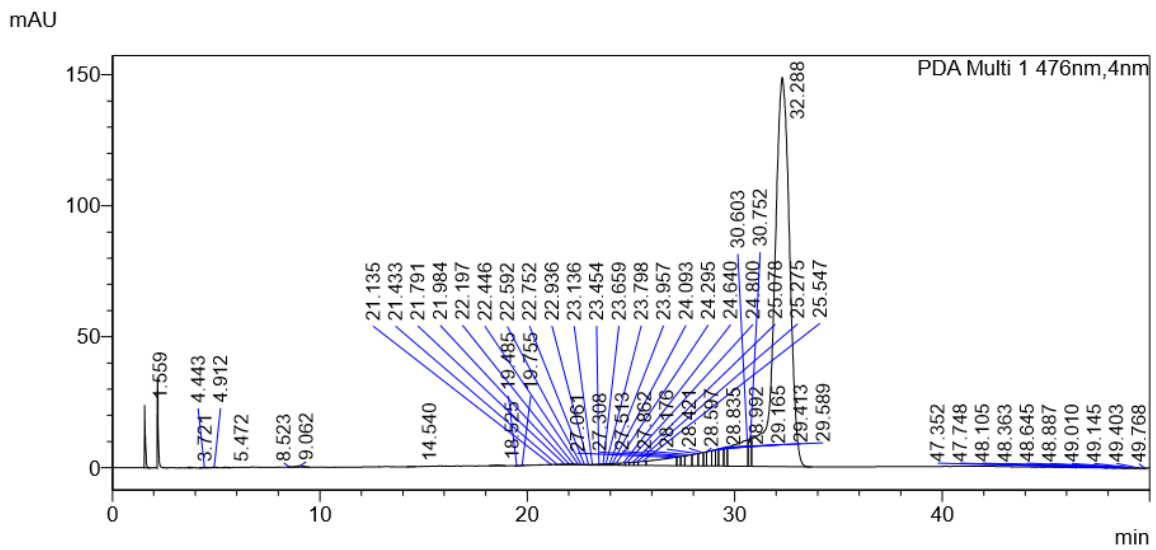
❖ Χρωματογράφημα δειγμάτων κατά τη ζύμωση



Εικόνα 46: Χρωματογράφημα χυμού τομάτας πριν τη ζύμωση



Εικόνα 47: Χρωματογράφημα κρασιού τομάτας μετά το 1^ο Στάδιο Ζύμωσης



Εικόνα 48: Χρωματογράφημα οξικού οξέος (ξύδι τομάτας) μετά το 2^ο Στάδιο Ζύμωσης