



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΟΦΙΑ ΧΑΝΙΩΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2019

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

(Ν.5343/1932, Άρθρο 202)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	21
Περίληψη.....	23
Innovative extraction techniques of oil and minor bioactive compounds from olive pomace	34
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
Κεφάλαιο 1. Ελαιοπυρήνας: πηγή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών	43
1. Εισαγωγή.....	43
1.1 Ελαιοπυρήνας: πηγή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών.....	45
1.1.2 Ελαιοπυρήνας ανάλογα με την επιλεγόμενη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου	46
1.2 Στερεό παραπροϊόν παραγωγής ελαιόλαδου (ελαιοπυρήνας) -Υγρά απόβλητα .	50
1.2.1 Σύσταση του ελαιοπυρήνα	52
1.2.2 Αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα - Επεξεργασία για παραλαβή ελαίου.....	53
1.2.2.1 Αποθήκευση	54
1.2.2.2 Ξήρανση	54
1.2.2.3 Επίδραση της ξήρανσης στα συστατικά του πυρηνέλαιου.....	57
1.2.2.4 Άλεση	58
1.2.2.5 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη	58
1.2.2.6 Παραλαβή πυρηνέλαιου και ανάκτηση εξανίου.....	61
1.2.3 Το προϊόν (πυρηνέλαιο) και το παραπροϊόν (πυρηνόξυλο) των πυρηνελαιουργείων.....	62
1.3 Σύσταση του πυρηνέλαιου	63
1.3.1 Λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και φυσικοχημικές ιδιότητες.....	63
1.3.2 Βιοδραστικά συστατικά πυρηνέλαιου και ελαιοπυρήνα	66
1.3.2.1 Στερόλες	68
1.3.2.2 Σκουαλένιο	70
1.3.2.3 Τοκοφερόλες	72
1.3.2.4 Αλειφατικές αλκοόλες.....	74
1.3.2.5 Τριτερπενικές αλκοόλες	74
1.3.2.6 Φαινολικά συστατικά	75
Κεφάλαιο 2. Εκχύλιση στερεού-υγρού	82
2.1 Εισαγωγή.....	82
2.2 Αρχή μεθόδου εκχύλισης στερεού-υγρού	83
2.2.1 Μεταφορά μάζας σε διεργασίες εκχύλισης στερεού-υγρού	85
2.2.2 Λειτουργία των εκχυλιστήρων με χρήση διαλυτών	87

2.2.3	Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εκχύλισης.....	88
2.3	Μέθοδοι εκχύλισης και ανάκτησης των βιοδραστικών ενώσεων	91
2.4	Καμπύλη εκχύλισης.....	92
2.5	Καινοτόμες πράσινες διεργασίες εκχύλισης.....	96
2.5.1	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave-assisted extraction, MAE)	96
2.5.1.1	Μηχανισμός της MAE.....	97
2.5.1.2	Παράγοντες που επηρεάζουν τη MAE	100
2.5.1.3	Φούρνοι μικροκυμάτων	101
2.5.1.4	Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (MAE)	102
2.5.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)	105
2.5.2.1	Σημαντικές παράμετροι της UAE.....	107
2.5.2.2	Συσκευές υπερήχων.....	109
2.5.2.3	Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους (UAE).....	110
2.5.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα (Enzymatic-assisted extraction, EAE).....	112
2.5.3.1	Παράγοντες λειτουργίας της EAE	113
2.5.3.2	Στάδια της EAE σε ελαιούχους σπόρους	114
2.5.3.3	Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα (EAE).....	116
2.5.3.4	Οφέλη της εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων.....	118
2.5.4	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υψηλή υδροστατική πίεση (High hydrostatic pressure assisted extraction, HHPAE)	118
2.5.4.1	Γενική αρχή της HHPAE.....	119
2.5.4.2	Εξοπλισμός HHPAE.....	120
2.5.4.3	Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερυψηλή πίεση (HHPAE)	121
2.5.5	Εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE)	123
2.5.6	Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical Fluid Extraction, SFE)	125
2.5.6.1	Εφαρμογές της εκχύλισης με χρήση του CO ₂	127
2.5.7	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed Electric Field, PEF)	129
2.5.8	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Homogenate assisted extraction, HAE).....	130
2.6	Συνδυασμός των μεθόδων εκχύλισης.....	132
2.7	Ενίσχυση της εκχύλισης από νέους αναδύμενους διαλύτες (ευτηκτικοί διαλύτες, Natural Deep Eutectic Solvents - NADES)	133
	Πειραματικό Μέρος.....	137

3.1	Σκοπός.....	137
3.2	Υλικά και μεθοδολογία	140
3.2.1	Υλικά.....	140
3.2.2	Χημικά Αντιδραστήρια	140
3.3	Πειραματική διαδικασία.....	141
3.3.1	Εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών του συστατικών.....	141
3.3.1.1	Συμβατική εκχύλιση - Κινητική μελέτη.....	141
3.3.1.2	Εκχύλιση Soxhlet με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας	141
3.3.1.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound Assisted- Extraction, UAE)	141
3.3.2	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα.....	142
3.3.2.1	Συμβατική εκχύλιση (CE)	142
3.3.2.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound Assisted – Extraction, UAE)	143
3.3.2.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted – Extraction, MAE)	143
3.3.2.4	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Homogenate Assisted – Extraction, HAE).....	143
3.3.2.5	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (High Hydrostatic Pressure Assisted – Extraction, HHPAE)	143
3.3.2.6	Υδατική ενζυμική εκχύλιση και ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα (Enzymatic Assisted – Extraction, EAE)	144
3.3.3	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με ευτηκτικούς διαλύτες	146
3.3.3.1	Παρασκευή ευτηκτικών διαλυτών.....	146
3.3.3.2	Εκχύλιση με ευτηκτικούς διαλύτες	147
3.3.4	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων	149
3.3.4.1	Παρασκευή εκχυλίσματος αιθανόλης 70% και κλασμάτων του	149
3.3.4.2	Ενσωμάτωση αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε πρότυπο λινελαϊκό οξύ.....	149
3.3.4.3	Ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (Linoleic Acid Emulsion - LAE)	150
3.3.4.4	Ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε ηλιέλαιο	151
3.3.4.5	Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο).....	151

3.4	Μέθοδοι - Αναλύσεις - Μετρήσεις.....	152
3.4.1	Προσδιορισμός υγρασίας	153
3.4.2	Προσδιορισμός περιεχόμενου λιπαρού	153
3.4.3	Προσδιορισμός του ασαπωνοποίητου υλικού	153
3.4.4	Παραλαβή φαινολικών εκχυλισμάτων πυρηέλαιου.....	154
3.4.5	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχόμενου (Total phenol content - TPC)	154
3.4.6	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος DPPH).....	155
3.4.7	Προσδιορισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ευτηκτικών διαλυτών	155
3.4.8	Προσδιορισμός υπεροξειδίων με τη μέθοδο του θειοκυανικού αμμωνίου....	155
3.4.9	Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων (Peroxide Value, PV).....	156
3.4.10	Προσδιορισμός αριθμού p-Ανισιδίνης (p-Anisidine Value, p-AV).....	156
3.4.11	Προσδιορισμός συντελεστών απορρόφησης K232 και K270.....	156
3.4.12	Αξιολόγηση της οξειδωτικής σταθερότητας των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες (Μέθοδος Oxitest)	156
3.4.13	Ανάλυση των στερολών και του σκουαλένιου με HPLC-DAD.....	157
3.4.14	Προσδιορισμός των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD... ..	157
3.5	Επεξεργασία - Υπολογισμοί.....	158
3.5.1	Απόδοση εκχύλισης στερεού-υγρού.....	158
3.5.2	Κινητικά μοντέλα	158
3.5.2.1	Μοντέλο των So & Macdonald (1986).....	158
3.5.2.2	Μοντέλο των Sulaiman et al. (2013).....	159
3.5.3	Θερμοδυναμικές παράμετροι	160
3.5.4	Σχεδιασμός Box-Behnken για την αριστοποίηση της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους.....	160
3.6	Σχεδιασμός πειραμάτων	161
3.6	Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	166
	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	167
4.1	Εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα	167
4.1.1	Κινητική μελέτη συμβατικής εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο).....	167
4.1.1.1	Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης.....	169
4.1.1.2	Επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού.....	173
4.1.1.3	Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης	176
4.1.1.4	Θερμοδυναμικές παράμετροι	179

4.1.1.5	Συντελεστής θερμοκρασίας εκχύλισης.....	181
4.1.1.6	Πειράματα κινητικής εκχύλισης των επιμέρους στερολών και του σκουαλένιου	182
4.1.2	Μελέτη εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας με συσκευή Soxhlet (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο)	189
4.1.2.1	Απόδοση σε έλαιο - Ασαπωνοποίητο υλικό ελαίου (%).....	190
4.1.2.2	Περιεχόμενο στερολών και σκουαλένιου του εκχυλιζόμενου ελαίου.....	192
4.1.3	Μελέτη εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους (Ultrasound Assisted-Extraction, UAE).....	194
4.1.3.1	Μοντέλα προσαρμογής.....	196
4.1.3.1.1	Απόδοση εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους	198
4.1.3.1.2	Ασαπωνοποίητο υλικό (USM) % ελαίου	199
4.1.3.1.3	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) ελαίου.....	199
4.1.3.1.4	Αντιοξειδωτική δράση (DPPH) ελαίου	200
4.1.3.2	Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας	200
4.1.3.2.1	Απόδοση εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους	201
4.1.3.2.2	Ασαπωνοποίητο υλικό (USM) % ελαίου	203
4.1.3.2.3	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) ελαίου.....	204
4.1.3.2.4	Αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του ελαίου.....	205
4.1.3.3	Αριστοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους του πυρηνέλαιου.....	208
4.1.3.4	Σύγκριση της UAE και της SE για την ανάκτηση πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα	209
4.1.4	Αριστοποίηση της εκχύλισης των στερολών και του σκουαλένιου υποβοηθούμενης με υπέρηχους.....	211
4.1.2.3	Σύγκριση των UAE και της SE για την ανάκτηση των στερολών και του σκουαλένιου	217
4.2	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα.....	219
4.2.1	Συμβατική εκχύλιση (CE)	219
4.2.1.1	Επίδραση του είδους του οργανικού διαλύτη και της συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη σε νερό (% v/v).....	219
4.2.1.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζυμικού διαλύματος	228
4.2.1.3	Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης με εφαρμογή της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης.....	228

4.2.1.4	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	230
4.2.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση υπερήχων (UAE)	233
4.2.2.1	Επίδραση του είδους του διαλύτη και της συγκέντρωσής του σε νερό (% v/v) και της θερμοκρασίας εκχύλισης.....	233
4.2.2.3	Επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης	248
4.2.2.4	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	249
4.2.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση μικροκυμάτων (MAE)	250
4.2.3.1	Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης με εφαρμογή της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης.....	250
4.2.3.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	251
4.2.4	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE)	255
4.2.4.1	Επίδραση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ανάδευσης με εφαρμογή της υδατικής, υδατικής ενζυμικής εκχύλισης, χρήσης αιθανόλης και ενζυμικής προκατεργασίας.....	255
4.2.4.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	257
4.2.5	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση υδροστατικής υπερυψηλής πίεσης (HHPAE)	260
4.2.5.1	Επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης με εφαρμογή της υδατικής, υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήσης αιθανόλης.....	260
4.2.5.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	262
4.2.6	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES)	264
4.2.6.2	Εκχύλιση με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE)	266
4.2.6.2.1	Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)	266
4.2.6.3	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της HAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	268
4.2.6.3	Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)	272
4.2.6.3.1	Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με μικροκύματα (MAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES).....	272
4.2.6.3.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της MAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	274

4.2.6.4	Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE).....	276
4.2.6.4.1	Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με υπέρηχους (UAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES).....	276
4.2.6.4.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της UAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC	278
4.2.6.5	Εκχύλιση με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE)	280
4.2.6.5.1	Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με υψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)	280
4.2.6.5.2	Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της HHPAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC.....	282
4.2.6.6	Συσχέτιση και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με εφαρμογή νέων μεθόδων εκχύλισης και με χρήση των NADES	284
4.3	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων.....	289
4.3.1	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ ή και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο	289
4.3.1.1	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, αντιοξειδωτική δράση και επιμέρους φαινολικά συστατικά του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του	289
4.3.1.2	Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων (PV) του συστήματος του λινολεϊκού οξέος με το αιθανολικό εκχύλισμα ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του ..	293
4.3.1.3	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (Linoleic Acid Emulsion - LAE).....	294
4.3.1.4	Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε φυτικό έλαιο, όπως το ηλιέλαιο με θερμική οξείδωση	295
4.3.2	Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο).....	296
4.3.2.1	Χαρακτηρισμός των φαινολικών συστατικών σε εγκλεισμένη μορφή	296
4.3.2.2	Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο).....	298
	Συμπεράσματα – Προτάσεις.....	307
4.1	Συμπεράσματα.....	307
4.2	Προτάσεις.....	319
	Βιβλιογραφία.....	321

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ελαιοπυρήνας (παραπροϊόν) από τα διάφορα συστήματα παραγωγής ελαιόλαδου - Ισοζύγια μάζας	50
Πίνακας 2. Σύσταση του ελαιοπυρήνα ανάλογα με το σύστημα εξαγωγής του ελαιόλαδου (πηγή: Dermeche et al. 2013)	53
Πίνακας 3. Σύσταση λιπαρών οξέων πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (μέσω προσδιορισμού με αέρια χρωματογραφία (% w/w μεθυλεστέρες) (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ollivier, Artaud, Pinatel, Durbec, & Guèrère, 2006)	64
Πίνακας 4. Σύσταση τριγλυκεριδίων πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (% του συνόλου των τριγλυκεριδίων) (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ollivier et al., 2006)	65
Πίνακας 5. Φυσικοχημικές και άλλες ιδιότητες πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (Nunes et al., 2018, Azlan et al., 2010, Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Boskou, 2011)	66
Πίνακας 6. Σύσταση του κλάσματος των ασαπωνοποίητων συστατικών σε κύρια βιοδραστικά πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (%) (Kiritsakis, 2007).	67
Πίνακας 7. Συγκέντρωση των κυριότερων φαινολικών συστατικών ελαιόλαδου και πυρηνέλαιου.	80
Πίνακας 8. Συγκέντρωση των κυριότερων φαινολικών συστατικών ελαιοπυρήνα.	81
Πίνακας 9. Μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της κινητικής μελέτης της εκχύλισης ελαίου από φυτικές πηγές	95
Πίνακας 10. Φυσικές σταθερές για διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε εκχυλίσεις υποβοηθούμενες με μικροκύματα (MAE)	99
Πίνακας 11. Εφαρμογές εκχυλίσεων βιοδραστικών ουσιών με μικροκύματα από διάφορες φυτικές πρώτες ύλες.	104
Πίνακας 12. Εφαρμογές εκχυλίσεων βιοδραστικών ουσιών με υπέρηχους από διάφορες φυτικές πρώτες ύλες.	111
Πίνακας 13. Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα	117
Πίνακας 14. Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υψηλή υδροστατική πίεση.	123
Πίνακας 15. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης	147
Πίνακας 16. Σειρές πειραμάτων	162
Πίνακας 17. Επίδραση της θερμοκρασίας (T) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των <i>So & Macdonald</i> (1986) (α) και των <i>Sulaiman et al.</i> (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του	172
Πίνακας 18. Επίδραση της αναλογίας στερεού - υγρού (S:L) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των <i>So & Macdonald</i> (1986) (α) και των <i>Sulaiman et al.</i> (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του.	176
Πίνακας 19. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης (AS) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των <i>So & Macdonald</i> (1986) (α) και των <i>Sulaiman et al.</i> (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του.	179
Πίνακας 20. Θερμοδυναμικές παράμετροι της εκχύλισης του πυρηνέλαιου.	180
Πίνακας 21. Περιεκτικότητα του πυρηνέλαιου σε στερόλες και σκουαλένιο	183
Πίνακας 22. Επίδραση της θερμοκρασίας (T), της αναλογίας στερεού/υγρού (S:L) και της ταχύτητας ανάδευσης (AS) στις παραμέτρους του κινητικού μοντέλου των <i>So & Macdonald</i> για την εκχύλιση του σκουαλένιου, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης.	187
Πίνακας 23. Απόδοση σε έλαιο και ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου (USM) % από ελαιοπυρήνα που εκχυλίζεται με διαφορετικά συστήματα διαλυτών.	192

Πίνακας 24. Περιεκτικότητα στερολών και σκουαλένιου σε εκχυλιζόμενο πυρηνέλαιο που λαμβάνεται από από διαφορετικά συστήματα διαλυτών (mg/g ελαίου)	193
Πίνακας 25. Σχεδιασμός Box-Behnken με τις αποκρίσεις για την απόδοση της εκχύλισης (%), το ασαπωνοποίητο υλικό (%), τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά –TPC (mg GA/g ελαίου) και την αντιοξειδωτική ικανότητα - DPPH (mg Trolox/g ελαίου) του εκχυλιζόμενου ελαίου.....	195
Πίνακας 26. Ανάλυση διακύμανσης της επιφάνειας απόκρισης της απόδοσης της εκχύλισης σε έλαιο (%), των ασαπωνοποίητων συστατικών – USM (%), της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά –TPC (mg GA/g ελαίου) και της αντιοξειδωτικής δράσης - DPPH (mg Trolox/g ελαίου) του εκχυλιζόμενου ελαίου	197
Πίνακας 27. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών.....	209
Πίνακας 28. Σύγκριση της UAE και της SE.....	210
Πίνακας 29. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών των μοντέλων για τη β-Σιτοστερόλη, την καμπεστερόλη, τη στιγμαστερόλη, και το σκουαλένιο των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων ...	212
Πίνακας 30. Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την επιφάνεια απόκρισης της β-Σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης, της στιγμαστερόλης και του σκουαλένιου των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων.....	212
Πίνακας 31. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών.....	217
Πίνακας 32. Σύγκριση των περιεχόμενων στερολών και του σκουαλένιου που λαμβάνονται με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και συστήματα διαλυτών.....	218
Πίνακας 33. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών (A) και ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (B) των μοντέλων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και την ανάκτηση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα.....	221
Πίνακας 34. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών.....	227
Πίνακας 35. Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα	228
Πίνακας 36. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης.....	232
Πίνακας 37. Σχεδιασμός Box-Behnken με τις αποκρίσεις για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και τις συγκεντρώσεις στα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα.	234
Πίνακας 38. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών (A) και η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (B) των μοντέλων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και τη συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα.....	238
Πίνακας 39. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών.....	247
Πίνακας 40. Σύγκριση των UAE και CE.....	247

Πίνακας 41. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εκχύλιση με υπέρηχους και με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης (UAEW) και της εκχύλισης με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης.....	249
Πίνακας 42. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) με χρήση μικροκυμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης.....	254
Πίνακας 43. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες θερμοκρασίες και ταχύτητες ανάδευσης.	259
Πίνακας 44. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (HHPAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE), και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε διάφορες πιέσεις και χρόνους.	263
Πίνακας 45. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης.....	264
Πίνακας 46. Φυσικοχημικές ιδιότητες των ευτηκτικών διαλυτών.....	266
Πίνακας 47. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της HAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.	271
Πίνακας 48. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της MAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.	275
Πίνακας 49. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.	279
Πίνακας 50. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της HHP και χρήση των ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.	283
Πίνακας 51. Ομάδες κωδικοποίησης των εκχυλισμάτων με NADES που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)	286
Πίνακας 52. Φαινολικά συστατικά του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του.....	291
Πίνακας 53. Ιδιότητες των εγκλεισμένων εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα.....	298
Πίνακας 54. Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και αντιοξειδωτική δράση (DPPH) εκχυλισμάτων από ελαιοπυρήνα	299
Πίνακας 55. Το TPC και η αντιοξειδωτική ικανότητα των ελαίων για την πρώτη (Ημέρα 0) και την τελευταία ημέρα (Ημέρα 15) αποθήκευσής τους στους 80 °C.....	300
Πίνακας 56. Φαινολικό προφίλ του αρχικού ελαιόλαδου και των εμπλουτισμένων ελαίων στο χρόνο 0.	301
Πίνακας 57. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που αφορούν την εκχύλιση ελαίου από τον ελαιοπυρήνα στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης.....	311
Πίνακας 58. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που αφορούν τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης.....	316
Πίνακας 59. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης με ευτηκτικούς διαλύτες.....	317

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Παραγωγική διαδικασία ελαιόλαδου.	46
Σχήμα 2. Διάγραμμα της ‘παραγωγής’ ελαιοπυρήνα από τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου ανάλογα με χρήση: συστήματος πίεσης (α), φυγοκεντρικού συστήματος τριών φάσεων (β) και φυγοκεντρικού συστήματος δύο φάσεων (γ).	48
Σχήμα 3. Στερεό παραπροϊόν (ελαιοπυρήνας) και υγρά απόβλητα από τη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης.	51
Σχήμα 4. Ξηραντήρας ελαιοπυρήνα σε πυρηνελαιουργείο.	55
Σχήμα 5. Διάγραμμα ροής παραγωγής πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από πίεση ή από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης.	56
Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής παραγωγής πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από διφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης.	56
Σχήμα 7. Εκχυλιστήρες (α) Belt - De Smet, (β) Rotocel, (γ) Bollman - Lurgi, και (δ) Bonotto.	61
Σχήμα 8. Χημική δομή στερόλης.	68
Σχήμα 9. Χημική δομή των κύριων φυτοστερολών: β-σιτοστερόλη (α), καμπεστερόλη (β), στιγμαστερόλη (γ) και βρασικαστερόλη (δ) (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000).	69
Σχήμα 10. Απεικόνιση του μορίου του σκουαλενίου.	71
Σχήμα 11. Η ομάδα χρωμανίου (α), 6-χρωμανόλης (β) και η ουρά φυτιλίου (γ) που συνιστούν τις τοκοφερόλες.	72
Σχήμα 12. Χημική δομή των κύριων τοκοφερολών και τοκοτριενολών (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000).	73
Σχήμα 13. Απεικόνιση των μορίων της ερυθροδιόλης (α) και της ουβαόλης (β).	75
Σχήμα 14. Σύνθεση της υδροξυ-ισοχρωμάνης.	76
Σχήμα 15. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: φαινολικά οξέα.	77
Σχήμα 16. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαϊνή και παράγωγα.	78
Σχήμα 17. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: φλαβονοειδή, απιγενίνη (α) και λουτεολίνη (β).	79
Σχήμα 18. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: λιγνάνες (πινορεσινόλη).	79
Σχήμα 19. Συγγενείς μη φαινολικές ενώσεις εκχυλισμένες με φαινόλες (α: ελενολικό οξύ, β: κινναμωμικό οξύ).	80
Σχήμα 20. Τα βασικά στάδια της εκχύλισης ενός στερεού σώματος με χρήση διαλύτη.	84
Σχήμα 21. Εκχύλιση στερεού-υγρού ενός σταδίου.	87
Σχήμα 22. Εκχύλιση στερεού-υγρού πολλαπλών σταδίων με ομορροή του διαλύτη.	88
Σχήμα 23. Εκχύλιση στερεού-υγρού πολλαπλών σταδίων με αντίθετη ροή διαλύτη.	88
Σχήμα 24. Θεωρητική καμπύλη εκχύλισης στερεού-υγρού ως προς το χρόνο ή το διαλύτη.	93
Σχήμα 25. Σύστημα μικροκυμάτων κλειστού τύπου (α) και σύστημα μικροκυμάτων ανοικτού τύπου (β).	102
Σχήμα 26. Το φάσμα του ήχου.	105
Σχήμα 27. Δημιουργία φυσαλίδων σπηλαίωσης και κατάρρευσή τους.	106
Σχήμα 28. Διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος με εφαρμογή υπερήχων.	106
Σχήμα 29. Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης με υπερήχους σε: α) λουτρό υπερήχων, β) εκχυλιστήρα κλειστού τύπου εξοπλισμένο με αισθητήρα μετατροπής υπερήχων.	110
Σχήμα 30. Συσκευές υπερήχων βιομηχανικής κλίμακας: α) με στέλεχος, β) με λουτρό.	110

Σχήμα 31. Η μικροδομή ενός ελαιούχου σπόρου (φυστίκι), O: έλαιο, P: πρωτεΐνη και CW: κυτταρικό τοίχωμα (Liu et al., 2016)	115
Σχήμα 32. Τα στάδια της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα	115
Σχήμα 33. Πειραματική συσκευή εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά (1) Αντλία CO ₂ , (2) Αντλία ρύθμισης ροής, (3) Εκχυλιστήρας, (4) και (5) Διαχωριστήρες	126
Σχήμα 34. Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας	131
Σχήμα 35. Αλληλεπίδραση ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) με το χλωρίδιο της χολίνης	134
Σχήμα 36. Ορισμένοι δέκτες και δότες δεσμού υδρογόνου που μπορούν να συνδυαστούν για σχηματισμό ευτηκτικού διαλύτη	135
Σχήμα 37. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα και βιοδραστικών συστατικών του	142
Σχήμα 38. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα.....	146
Σχήμα 39. Εμφάνιση των ευτηκτικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης.....	147
Σχήμα 40. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας παρασκευής ευτηκτικών διαλυτών. 149	
Σχήμα 41. Παρασκευή εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα με αιθανόλη 70% και κλασμάτων του. 150	
Σχήμα 42. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εμπλουτισμένου ελαιόλαδου από φαινολικά συστατικά ελαιοπυρήνα	152
Σχήμα 43. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Συνθήκες: αναλογία στερεού υγρού 1:4 g/mL, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (συνεχής γραμμή).....	170
Σχήμα 44. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές αναλογίες στερεού/υγρού. Συνθήκες: θερμοκρασία 50 °C, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (συνεχής γραμμή).....	174
Σχήμα 45. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης. Συνθήκες: θερμοκρασία 50 °C, αναλογία στερεού/υγρού 1:4 g/mL. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (1986) (συνεχής γραμμή).	177
Σχήμα 46. Εξάρτηση της lnK (σταθερά ισορροπίας) επί του 1/T (θερμοκρασία, K). Συνθήκες: αναλογία στερεού/υγρού 1:4 g/mL, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Εξ. (19).....	181
Σχήμα 47. Εξάρτηση του lnYe επί του T/10. Εξ. (23).	182
Σχήμα 48. Τυπικό χρωματογράφημα ανάλυσης των στερολών και του σκουαλένιου του πυρηνέλαιου. 1 ερυθροδιόλη, 2 σκουαλένιο, 3 εργοστερόλη, 4 χοληστερόλη, 5 καμπεστερόλη, 6 στιγμαστερόλη, 7 β-σιτοστερόλη	182
Σχήμα 49. Η εκχύλιση του σκουαλένιου, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης σε διαφορετικές θερμοκρασίες (A, B) (S:L=1:4 g/mL, AS=800 rpm) αναλογίες στερεού/υγρού (Γ, Δ) (T=50 °C, AS=800 rpm) και ταχύτητες ανάδευσης (E, Z) (S:L=1:4 g/mL, T=50 °C). Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι	

ράβδοι τις τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που έχουν ληφθεί από το μοντέλο των So & Macdonald.....	186
Σχήμα 50. Διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης.	189
Σχήμα 51. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στην απόδοση της εκχύλισης του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της απόδοσης της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη απόδοση εκχύλισης ελαίου.....	202
Σχήμα 52. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο ασαπωνοποίητο υλικό (USM%) του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού: υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές του ασαπωνοποίητου υλικού του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστο ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου).....	204
Σχήμα 53. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο συνολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές του συνολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστο TPC του ελαίου.	206
Σχήμα 54. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη αντιοξειδωτική δράση του ελαίου.....	207
Σχήμα 55. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας για την ανάκτηση της β-Σιτοστερόλης (α), της καμπεστερόλης (β), της στιγμαστερόλης (γ) και του σκουαλένιου (δ) που επηρεάζονται από τη θερμοκρασία της εκχύλισης και την αναλογία στερεού/υγρού.....	214
Σχήμα 56. Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε β-σιτοστερόλη (α), καμπεστερόλη (β), στιγμαστερόλη (γ) και σκουαλένιο (δ) στα εκχυλιζόμενα πυρηνέλαια.	216
Σχήμα 57. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση, τη συγκέντρωση ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα που επηρεάζονται από το είδος και τη συγκέντρωση του διαλύτη.....	223

Σχήμα 58. Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (α), αντιοξειδωτική δράση (β), και συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (γ), υδροξυτυροσόλης (δ), ρουτίνης (ε) και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (ζ) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα..... 225

Σχήμα 59. Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από τη συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) 229

Σχήμα 60. Χρωματογραφήματα των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth)..... 231

Σχήμα 61. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη απόδοση εκχύλισης..... 240

Σχήμα 62. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη αντιοξειδωτική δράση 241

Σχήμα 63. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην ελευρωπαΐνη των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη ελευρωπαΐνη..... 242

Σχήμα 64. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην υδροξυτυροσόλη των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη υδροξυτυροσόλη. 243

Σχήμα 65. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στη ρουτίνη των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη ρουτίνη..... 244

Σχήμα 66. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στο σύνολο των προσδιορισμένων φαινολικών

συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για διάφορους παράγοντες για μέγιστο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών.....	245
Σχήμα 67. Επίδραση της θερμοκρασίας στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από την υδατική εκχύλιση (UAEW) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) με εφαρμογή υπερήχων.....	248
Σχήμα 68. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) και με χρήση μικροκυμάτων για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και χρόνου.....	251
Σχήμα 69. Χρωματογραφήματα των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με υδατική εκχύλιση (MAEW), υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και με χρήση αιθανόλης 70% (MAEEth) και εφαρμογή μικροκυμάτων.....	253
Σχήμα 70. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAE), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) και με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και ταχύτητας ανάδευσης.....	257
Σχήμα 71. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με την υδατική εκχύλιση (HHPAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) με εφαρμογή υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης για διάφορες τιμές πίεσης και χρόνου.....	262
Σχήμα 72. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης.....	265
Σχήμα 73. Η επίδραση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ομογενοποίησης με εφαρμογή της HAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα.....	267
Σχήμα 74. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών ελαιοπυρήνα χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE). 1. Ελευρωπαΐνη (OL), 2. Υδροξυτυροσόλη (HY), 3. Καφεϊκό οξύ (CA), 4. Βανιλίνη (VA), 5. Ρουτίνη (RU), 6. Λουτεολίνη (LU).....	269
Σχήμα 75. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της MAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα.....	273
Σχήμα 76. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα.....	277
Σχήμα 77. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα.....	281
Σχήμα 78. Ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA).....	285

Σχήμα 79. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του (εκχυλίσματα χλωροφορμίου, εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού).....	290
Σχήμα 80. Φαινολικά συστατικά του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% με εξάνιο (Α), χλωροφόρμιο (Β), οξικό αιθυλεστέρα (Γ) και νερό (Δ).	291
Σχήμα 81. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του. 1. Ελευρωπαΐνη (OL), 2. Υδροξυτυροσόλη (HY), 3. Καφεϊκό οξύ (CA), 4. Βανιλίνη (VA), 5. Ρουτίνη (RU), 6. Λουτεολίνη (LU).....	292
Σχήμα 82. Αριθμός υπεροξειδίων (PV) του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του	293
Σχήμα 83. Αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (LAE).	295
Σχήμα 84. Αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του κατά τη θερμική οξείδωση του ηλιέλαιου.	296
Σχήμα 85. Ποσοστό μείωσης των επιμέρους φαινολικών ενώσεων του αρχικού ελαιόλαδου (OO) και των εμπλουτισμένων ελαίων κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C.....	302
Σχήμα 86. Μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων (PV) στο αρχικό ελαιόλαδο (OO) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C.	303
Σχήμα 87. Μεταβολή του αριθμού ανισιδίνης (p-AV) στο αρχικό ελαιόλαδο (OO) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C.	304
Σχήμα 88. Μεταβολή των δεικτών K232 και K270 στο αρχικό ελαιόλαδο (OO) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C.	305
Σχήμα 89. Μεταβολή της οξειδωτικής σταθερότητας του αρχικού ελαιόλαδου (OO) και των εμπλουτισμένων ελαίων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες με τη μέθοδο Oxitest®.....	306

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Κ. Τζιά. Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, σηματοδοτείται το τέλος μιας πολύ δημιουργικής περιόδου της ζωής μου κατά την οποία έμαθα πολλά και συνηδειotoποίησα ακόμα περισσότερα. Ο συνδυασμός τόσο των χαρούμενων, δημιουργικών, επιμορφωτικών αλλά και κουραστικών, δύσκολων, αγχωτικών στιγμών της περιόδου αυτής, την καθιστούν μοναδική στη μνήμη μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κα Κωνσταντίνα Τζιά για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αλλά και της αμέριστης εμπιστοσύνης που επέδειξε στο πρόσωπό μου κατά τη διάρκειά της. Από τις αμέτρητες ώρες συζητήσεων όλων αυτό τον καιρό, οι γνώσεις αλλά και ο τρόπος σκέψης που αποκόμισα ήταν και θα είναι πολύτιμες και καθοριστικές για τη μετέπειτα πορεία μου. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την υπομονή, την επιμονή, την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια για την ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος. Με τη συμπεριφορά και τη στάση της, όχι μόνο με βοηθούσε να δώσω λύση στους προβληματισμούς μου, αλλά με δίδαξε να σκέφτομαι και να πράττω με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο, τόσο σε επιστημονικά θέματα όσο και σε θέματα ζωής.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Βασιλική Ωραιοπούλου και τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κέκο, για τη συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή μου και τις παρατηρήσεις τους για τη διαμόρφωση του τελικού κειμένου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη (ΕΜΠ), την Καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα (ΕΜΠ), τον Καθηγητή Επαμεινώνδα Βουτσά (ΕΜΠ) και τον Καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο (ΓΠΑ) για την τιμή που μου έκαναν με τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Β. Γιάννου, Δρ. Ε. Δερμενσολούογλου και Δρ. Δ. Τσιμογιάννη για την υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες, Β. Πολυχιάτου, Π. Σφακιανάκη, Μ. Κατσούλη, Γ. Φρακολάκη και Τ. Κεκέ καθώς και τη Δρ. Χ. Χρανιώτη για το ευχάριστο κλίμα κατά τη συνεργασία μας. Επίσης ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Π. Σιαμανδούρα για την προσωπική συνεργασία και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο για την τέλεση της διπλωματικής εργασίας για το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών και ιδιαίτερα τη Δρ. Κ. Κυριακοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της στη χρήση της συσκευής μικροκυμάτων και το Δρ. Γ. Κατσαρό για την άριστη συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στη Μονάδα Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης, συνιδιοκτησίας του ΕΜΠ και του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας (ΕΛΚΕ) ΕΜΠ, καθώς τα τελευταία τρία χρόνια της διατριβής χρηματοδοτήθηκαν από αυτόν.

Ολοκληρώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τρία πολυαγαπημένα μου πρόσωπα: τους γονείς μου, Γιώργο και Κυριακή, και τον αδερφό μου, Πέτρο, που χωρίς την απέραντη αγάπη τους, την ηθική και υλική υποστήριξή τους δεν θα βρισκόμουν σε αυτή τη θέση.

Αθήνα, Ιούνιος 2019

Σοφία Γ. Χανιώτη

Περίληψη

Ο ελαιοπυρήνας είναι το στερεό παραπροϊόν που προκύπτει κατά την εξαγωγή του ελαιόλαδου από φυγοκεντρικά συστήματα δύο ή τριών φάσεων. Πρόκειται για ένα υλικό χαμηλού κόστους που παράγεται σε σημαντικές ποσότητες και έως τώρα χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του περιεχόμενου ελαίου (πυρηνέλαιου) σε μικρής κλίμακας βιομηχανικές μονάδες. Το πυρηνέλαιο εμφανίζει παρόμοια σύσταση με το ελαιόλαδο, έχει όμως υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασαπωνοποίητα συστατικά από αυτό, και ειδικότερα είναι πλουσιότερο σε ορισμένες στερόλες (β-σιτοστερόλη) και σε σκουαλένιο - συστατικά που διαθέτουν αξιόλογη βιολογική δράση. Ο ελαιοπυρήνας όμως, εκτός από πηγή ελαίου, αποτελεί επιπλέον σημαντική πηγή και άλλων βιοδραστικών συστατικών, όπως τα φαινολικά συστατικά. Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί η ανάκτηση αυτών των βιοδραστικών συστατικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικοί και αντιμικροβιακοί παράγοντες σε συστήματα τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αξιολόγηση καινοτόμων εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης έναντι της συμβατικής (με οργανικό διαλύτη) για την παραλαβή τόσο πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου ποιοτικά σε βιοδραστικά συστατικά, όπως στερόλες και σκουαλένιο, όσο και για την παραλαβή φαινολικών συστατικών, όπως κυρίως ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης και ρουτίνης, απευθείας από τον ελαιοπυρήνα που μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων και να προσφέρουν συγχρόνως οφέλη στην ανθρώπινη υγεία.

Η εκχύλιση με χρήση οργανικού διαλύτη μελετήθηκε ως η πλέον καθιερωμένη μέθοδος στη βιομηχανία τροφίμων για την ανάκτηση ελαίου από ελαιούχους σπόρους. Ο ελαιοπυρήνας είχε αρχική περιεκτικότητα σε υγρασία 45% w/w, ξ.β. και 4,5% w/w, ξ.β. μετά την ξήρασή του, και αλέστηκε σε μέγεθος 1 mm. Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη και μοντελοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης για την παραλαβή του πυρηνέλαιου τόσο ως προς την ποσοτική απόδοσή του όσο και ως προς το περιεχόμενο ασαπωνοποίητο υλικό του (USM% ελαίου). Οι εκχυλίσεις της κινητικής μελέτης πραγματοποιήθηκαν σε κλίμακα μεγέθους ξηρού ελαιοπυρήνα 25 g και με χρήση εξανίου ως διαλύτη, με σκοπό να διερευνηθούν οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία, όπως η θερμοκρασία ($T=40-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), η αναλογία στερεού/υγρού ($S:L=1:4-1:12\text{ g:mL}$), η ταχύτητα ανάδευσης ($AS=100-800\text{ rpm}$) και ο χρόνος εκχύλισης ($t=1-60\text{ min}$), καθώς και να εκτιμηθεί μαθηματικά η εξέλιξη της διεργασίας που επηρεάζει το κόστος της διεργασίας και να καταλήξει εάν είναι δυνατή η εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Από τα αποτελέσματα της εκχύλισης διερευνήθηκε ο μηχανισμός μεταφοράς μάζας του ελαίου, αλλά και του ασαπωνοποίητου υλικού του στο διαλύτη και βρέθηκε ότι κατά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης επικρατεί η ταχεία απομάκρυνση του ελαίου

από την εξωτερική επιφάνεια του σπόρου κατά την έκλουσή του με το εξάνιο (washing step), ενώ στη συνέχεια, ο ρυθμός εκχύλισης μειώνεται σημαντικά, καθώς η διάχυση αποτελεί το κυρίαρχο φαινόμενο που διέπει το στάδιο αυτό (diffusion step). Τα πειραματικά δεδομένα για το έλαιο και το ασαπωνοποίητο υλικό του (USM% ελαίου) χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των μεταβλητών δύο μαθηματικών μοντέλων: του μοντέλου των So & Macdonald, (1986): $Y_t = Y_e^w [1 - e^{-k_w t}] + Y_e^d [1 - e^{-k_d t}]$ και του μοντέλου των Sulaiman et al. (2013): $Y_t = Y_e [1 - e^{-(k \cdot a) t}]$. Όσον αφορά την κινητική μελέτη εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του, τα πειραματικά δεδομένα είχαν πολύ καλή προσαρμογή στο μοντέλο των So & Macdonald (1986) παρέχοντας υψηλές τιμές συντελεστή προσδιορισμού ($R^2 > 0,996$) και χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($0,40 < ARD < 3,05$). Ωστόσο, το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) παρείχε χαμηλότερες τιμές του συντελεστή προσδιορισμού ($R^2 > 0,981$) και υψηλότερες τιμές σχετικής απόκλισης ($3,75 < ARD < 5,73$). Από τις τιμές των συνθηκών που εξετάστηκαν, και από τα δύο μοντέλα προέκυψε ότι υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας (60°C), αναλογίας υγρού:στερεού (12:1 mL/g) και ταχύτητας ανάδευσης (800 rpm) οδήγησαν σε αυξημένη απόδοση ελαίου (5,83-7,11% ελαιοπυρήνα ξ.β.) και ευνόησαν την εκχύλιση του ασαπωνοποίητου υλικού στο εκχυλιζόμενο έλαιο (USM=3,40-4,23% ελαίου), ενώ παράλληλα αύξησαν τους συντελεστές μεταφοράς μάζας (k_w , k_d για το μοντέλο των So & Macdonald και $k \cdot a$ για το μοντέλο των Sulaiman et al.) κατά την εκχύλιση. Οι μεταβλητές του κινητικού μοντέλου των So & Macdonald (1986) για την εκχύλιση τόσο του ελαίου όσο και του ασαπωνοποίητου υλικού του σε διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας-T, αναλογίας στερεού:υγρού-S:L και ταχύτητας ανάδευσης-AS), επαλήθευσαν και πάλι την επικράτηση του σταδίου της έκπλυσης σε σχέση με το στάδιο της διάχυσης, δεδομένου ότι οι συντελεστές έκπλυσης ($1,05 < k_w < 2,27$) βρέθηκαν υψηλότεροι από τους συντελεστές διάχυσης ($0,11 < k_d < 0,21$). Οι τιμές της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) βρέθηκαν θετικές, ενώ οι τιμές της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG) ήταν αρνητικές, υποδεικνύοντας ότι η διεργασία ήταν ενδόθερμη, μη αντιστρεπτή και αυθόρμητη. Στις συνθήκες ισορροπίας, η απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο αυξάνεται κατά ένα συντελεστή περίπου 1,096 και 1,054 για τα μοντέλα των So & Macdonald και των Sulaiman et al., αντίστοιχα, για κάθε 10°C αύξηση της θερμοκρασίας.

Το κινητικό μοντέλο που προτάθηκε από τους So & Macdonald (1986) χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων για τα επιλεγμένα βιοδραστικά συστατικά του ασαπωνοποίητου υλικού του πυρηνέλαιου, όπως το σκουαλένιο και τις κύριες στερόλες (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη) (mg/g ελαίου), με τις ίδιες παραμέτρους της εκχύλισης ($T=40-60^\circ\text{C}$, $S:L=1:4-1:12$ g/mL, $AS=100-800$ rpm, και $t=1-60$ min). Όπως συνέβη και στην εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του, έτσι και η κινητική των επιμέρους αυτών συστατικών χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ στάδιο έκπλυσης και ένα ακόλουθο

βραδύτερο στάδιο διάχυσης, το οποίο φθάνει σε ισορροπία ανάλογα με τη βιοδραστική ουσία του ασαπωνοποίητου υλικού. Όσον αφορά τις μεταβλητές του κινητικού μοντέλου εκχύλισης για το σκουαλένιο, τη β-σιτοστερόλη, τη στιγμαστερόλη και την καμπεστερόλη σε διαφορετικές συνθήκες (T, S:L, AS) αποδείχθηκε και πάλι η επικράτηση του σταδίου έκπλυσης σε σχέση με το στάδιο της διάχυσης, δεδομένου ότι οι συντελεστές έκπλυσης (k_w) ήταν υψηλότεροι από τους αντίστοιχους για το στάδιο της διάχυσης (k_d). Από τις τιμές που εξετάστηκαν, υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας (60 °C), αναλογίας υγρού/στερεού (12:1 mL/g) και ταχύτητας ανάδευσης (800 rpm) οδήγησαν σε αυξημένη συγκέντρωση β-σιτοστερόλης (0,81-1,18 mg/g ελαίου), καμπεστερόλης (0,16-0,20 mg/g ελαίου), στιγμαστερόλης (0,10-0,14 mg/g ελαίου) και σκουαλένιου (3,95-4,20 mg/g ελαίου) στα εκχυλιζόμενα έλαια.

Ακολούθως εξετάστηκε η εκχύλιση με χρήση συν-διαλύτη με σκοπό την ανάκτηση και άλλων συστατικών διαφορετικής πολικότητας. Ως συν-διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η ισοπροπυλική αλκοόλη και αξιολογήθηκαν διάφορα μίγματα εξανίου (H): ισοπροπανόλης (I) σε διαφορετικές αναλογίες (H:I=3:1, H:I=3:2, H:I=4:1, H:I=9:1) ως προς την απόδοσή τους σε έλαιο, όπως και στο ασαπωνοποίητο υλικό, και τις κύριες στερόλες και το σκουαλένιο στο εκχυλιζόμενο έλαιο. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Soxhlet με κλίμακα μεγέθους ξηρού ελαιοπυρήνα 25 g με μέγεθος σωματιδίων (PS) 1 mm και αναλογία στερεού/υγρού (S:L) 1:8 g/mL για 8 h. Μεταξύ των μιγμάτων διαλυτών που εξετάστηκαν, το μίγμα H:I=3:2 εμφάνισε την υψηλότερη ανάκτηση ελαίου (13,70% ελαιοπυρήνα ξ.β.), τη μεγαλύτερη ποσότητα ασαπωνοποίητου υλικού στο εκχυλιζόμενο έλαιο (USM=4,92% ελαίου) και υψηλές περιεχόμενες στερόλες και σκουαλένιο (σύνολο σε ολικές προσδιοριζόμενες στερόλες: 1,706 mg/g ελαίου, σκουαλένιο: 5,217 mg/g ελαίου).

Στα πλαίσια της διερεύνησης «φιλικών προς το περιβάλλον» μεθόδων εκχύλισης που παρέχουν αποτελεσματική και εκλεκτική εκχύλιση ελαίου προστατεύοντας ταυτόχρονα την υποβάθμιση των βιοδραστικών συστατικών, εφαρμόστηκε η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (UAE) τόσο για την παραλαβή του πυρηνέλαιου αλλά και για την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών του ασαπωνοποίητου υλικού του όπως των στερολών και του σκουαλένιου. Με τη μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (RSM) και τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken προσδιορίστηκαν οι πολωνυμικές εξισώσεις που συσχετίζουν την απόδοση σε έλαιο, όπως και το ασαπωνοποίητο υλικό (USM%), το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών (TPC) και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου με τις παραμέτρους της διεργασίας (T=40-60 °C, S:L=1:4-1:12 g/mL και PS=0,5-2 mm). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με κλίμακα μεγέθους ξηρού ελαιοπυρήνα 25 g και με προκαθορισμένο όγκο εξανίου σε λουτρό υπερήχων για διάρκεια 1 h. Η μέγιστη απόδοση σε έλαιο (11,22% ελαιοπυρήνα ξ.β.) επιτεύχθηκε με T= 60 °C, S:L= 1:12 g/mL και PS= 0,5 mm. Η μέγιστη τιμή του USM% του ελαίου ήταν 4,50% και επιτεύχθηκε στις βέλτιστες συνθήκες

T=55 °C, S:L=1:12 g/mL και PS=0,5 mm. Η μέγιστη τιμή του TPC του πυρηνέλαιου ήταν 0,261 mg GA/g ελαίου και επιτεύχθηκε με εκχύλιση του ελαιοπυρήνα σε συνθήκες: T=50 °C, S:L=1:8 g/mL και PS= 0,9 mm. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του πυρηνέλαιου βρέθηκε ως 0,211 mg Trolox/g ελαίου και επιτεύχθηκε σε T= 55 °C, S:L=1:8 g/mL και PS= 0,9 mm. Μέσω του μοντέλου εξετάστηκε και η αριστοποίηση της ανάκτησης των κυριότερων στερολών (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη και στιγμαστερόλη) και του σκουαλένιου που αποτελούν τα κύρια συστατικά του ασαπωνοποιήτου κλάσματος του ελαίου και η επίδραση των βασικών παραμέτρων εκχύλισης (T=40-60 °C και S:L=1:4-1:12 g/mL). Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της β-σιτοστερόλης βρέθηκε 1,399 mg/g σε συνθήκες T=60 °C και S:L=1:12 g/mL. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της καμπεστερόλης ήταν 0,220 mg/g και επιτεύχθηκε σε T= 55 °C για S:L=1:10 g/mL. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της στιγμαστερόλης βρέθηκε 0,105 mg/g, με εφαρμογή T=50 °C και S:L=1:12 g/mL. Περαιτέρω, η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης του σκουαλένιου βρέθηκε 4,575 mg/g σε T=60 °C και S:L=1:12 g/mL.

Επιπλέον δοκιμάστηκε και ο συνδυασμός της χρήσης του μίγματος H:I = 3:2 και της εφαρμογής υπέρηχων στις βέλτιστες συνθήκες (T=50-60 °C, S:L=1:12 g/mL, t=1 h), ωστόσο έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα που προέκυψαν με χρήση εξανίου και εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης με υπέρηχους στις ίδιες συνθήκες ως προς την απόδοση ελαίου, το ασαπωνοποιήτο υλικό (USM%) και τις επιμέρους στερόλες του πυρηνέλαιου. Οι βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους (UAE) συγκρίθηκαν με τη συμβατική εκχύλιση Soxhlet (SE) (συνθήκες εκχύλισης: S:L=1:8 g/mL, T≈78m°C, t=8 h, PS=1 mm, διαλύτης=εξάνιο και το μίγμα H:I=3:2) όσον αφορά την απόδοση εκχύλισης σε πυρηνέλαιο, το USM%, τις επιμέρους κύριες στερόλες, το σκουαλένιο, το TPC και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του ανακτώμενου πυρηνέλαιου. Βρέθηκε ότι το πυρηνέλαιο υπό τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με υπέρηχους εμφάνισε υψηλότερη απόδοση (κατά 11%) και καλύτερη ποιότητα όσον αφορά το ασαπωνοποιήτο υλικό του (USM=4,51% ελαίου), το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC=0,255 mg GA/g ελαίου) και την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (DPPH=0,225 mg Trolox/g έλαιο) από την αντίστοιχη του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου με τη μέθοδο Soxhlet (SE) και διαλύτη εξάνιο (USM=3,68% ελαίου, TPC=0,207 mg GA/g ελαίου και DPPH=0,189 mg Trolox/g έλαιο, αντίστοιχα). Πρέπει να αναφερθεί ότι το εκχυλιζόμενο πυρηνέλαιο με υπέρηχους έφθασε περίπου το 82% της αντίστοιχης απόδοσης σε έλαιο και το 92% του συνολικού ασαπωνοποιήτου υλικού αυτού (USM%), ενώ παρουσίασε περισσότερα φαινολικά συστατικά (TPC) (κατά 5,5%) και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (κατά 8%) από εκείνο που ελήφθη με τη μέθοδο SE και διαλύτη το μίγμα H:I=3:2. Όσον αφορά τις επιμέρους στερόλες και το σκουαλένιο, η συγκέντρωση της β-σιτοστερόλης που ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες της UAE ήταν

υψηλότερη (1,349 mg/g ελαίου) από εκείνη που λαμβάνεται με τη μέθοδο SE και χρήση εξανίου (0,911 mg/g ελαίου) ή του μίγματος H:I=3:2 (1,121 mg/g ελαίου). Το εκχυλιζόμενο έλαιο με τη μέθοδο SE και το μίγμα H:I=3:2 είχε αρκετά παρόμοια συγκέντρωση καμπεστερόλης (0,228 mg/g ελαίου) με την αντίστοιχη του ελαίου από εκχύλιση με υπέρηχους (0,208 mg/g ελαίου) και μικρότερη συγκέντρωση στιγμαστερόλης (0,101 mg/g ελαίου) σε σχέση με εκείνη που λαμβάνεται με εκχύλιση με υπέρηχους (0,115 mg/g ελαίου). Η συγκέντρωση του σκουαλενίου στα εκχυλιζόμενα έλαια βρέθηκε να μειώνεται κατά την ακόλουθη σειρά: SE-H:I=3:2>UAE-εξάνιο≈UAE-H:I=3:2>SE-εξάνιο.

Περαιτέρω διερευνήθηκε η εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα. Εξετάστηκε η επίδραση του είδους του οργανικού διαλύτη και της συγκέντρωσής του σε νερό (% v/v) με συμβατική εκχύλιση στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων και στα κυριότερα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων. Εξετάστηκαν οι οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη και η ακετόνη σε διαφορετικές αναλογίες σε νερό (50, 70 και 90 % v/v), και πραγματοποιήθηκε αριστοποίηση της συμβατικής εκχύλισης μέσω του σχεδιασμού Box-Behnken δύο επιπέδων (T=60 °C, S:L=1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα=1 mm, t=4 h). Από τα αποτελέσματα της μελέτης επιλέχθηκε η αιθανόλη σε αναλογία 70% v/v σε νερό ως ο διαλύτης εκχύλισης που παρέχει εκχυλίσματα με το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC=23,061 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), με τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (DPPH=18,156 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), και με τη μέγιστη συγκέντρωση σε ελευρωπαΐνη (OL), υδροξυτυροσόλη (HY), ρουτίνη (RU) και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων (SUM) (OL=0,834 mg/g ελαιοπυρήνα, HY=1,04 mg/g ελαιοπυρήνα, RU=0,493 mg/g ελαιοπυρήνα και SUM=2,41 mg/g ελαιοπυρήνα).

Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της χρήσης ενζύμων στην απόδοση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν ήταν ένα μίγμα πηκτινάσης και πολυγαλακτουρονάσης με εμπορική ονομασία Novozym 33095, και αφού προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος (1% v/v), μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (T=40 και 60 °C) και του χρόνου (t=1 και 4 h) στην υδατική εκχύλιση (CEW), στην υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και στην εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση των φαινολικών του ενώσεων (S:L=1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα= 1 mm). Η υδατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος pH= 4,5. Η χρήση αιθανόλης 70% οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (TPC=23,88 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (DPPH=18,36 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH). Ωστόσο, εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση στους 60 °C, ελήφθησαν εκχυλίσματα περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά και με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική

δράση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της υδατικής εκχύλισης (TPC=11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEE και TPC=9,92 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEW, αντίστοιχα). Η υψηλότερη συγκέντρωση της OL προέκυψε με αιθανόλη (OL=0,868 mg/g ελαιοπυρήνα), ακολουθούμενη από την υδατική ενζυμική εκχύλιση (OL=0,549 mg/g ελαιοπυρήνα) για 4 h στους 60 °C. Επίσης, η αιθανόλη 70% ήταν ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση της HY, ωστόσο η χρήση ενζύμων παρείχε εκχυλίσματα με συγκέντρωση σε HY που έφθασε το 88% της αντίστοιχης με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη εκχύλισης.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η εφαρμογή των υπερήχων (UAE) για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα. Εξετάστηκαν παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (είδος του διαλύτη=αιθανόλη, μεθανόλη και ακετόνη, συγκέντρωση=50, 70 και 90 % v/v, T=40, 60, 80 °C) και αριστοποιήθηκε η UAE ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) και τα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα (S:L=1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα=1 mm, t=30 min, συχνότητα υπερήχων: 60 kHz). Το μέγιστο TPC βρέθηκε 21,77 mg GA/g ελαιοπυρήνα με εφαρμογή T= 60 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%. Η μέγιστη τιμή της αντιοξειδωτικής δράσης ήταν 20,95 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH με T= 60 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%. Η OL, η HY και το SUM εμφάνισαν τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης (OL=0,674 mg/g ελαιοπυρήνα, HY=1,161 mg/g ελαιοπυρήνα και SUM=2,32 mg/g ελαιοπυρήνα) στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με εφαρμογή T= 60 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση της RU βρέθηκε στα 0,421 mg/g ελαιοπυρήνα με εφαρμογή T= 70 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα της συμβατικής μεθόδου, βρέθηκε ότι το TPC του εκχυλίσματος που ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες με χρήση υπερήχων έφθασε το 93% του αντίστοιχου που ελήφθη με τη μέθοδο CE και ότι το εκχύλισμα από τους υπέρηχους εμφάνισε 13% μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (DPPH) σε σχέση με εκείνο από τη CE. Το εκχύλισμα που ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με υπέρηχους εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση σε HY κατά 11% και το SUM ήταν παρόμοιο (κατά 98%) με το αντίστοιχο με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης (CE). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το βέλτιστο αποτέλεσμα από την εκχύλιση με υπέρηχους ελήφθη σε μειωμένο χρόνο εκχύλισης (t=30 min), ενώ το αντίστοιχο αποτέλεσμα με τη μέθοδο CE ελήφθη για t=4 h.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση μικροκυμάτων (MAE) διερευνήθηκε ως μία ακόμη εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (T=40 και 60 °C) και του χρόνου (t=5 και 30 min) στην υδατική εκχύλιση (MAEW), στην υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και στην εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) (S:L=1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα=1

mm, ισχύς μικροκυμάτων=200 W). Η χρήση αιθανόλης 70% και μικροκυμάτων (MAEEth) οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε TPC [\sim 73% της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε TPC και \sim 5% λιγότερο δραστικά από αυτά με συμβατική μέθοδο (CEEth) εκχύλισης (στους 60 °C για 4 h), αντίστοιχα, τα οποία έχουν ληφθεί σε μικρότερο χρόνο ($t=30$ min)]. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (MAEE) στους 60 °C για 30 min, ελήφθησαν εκχυλίσματα κατά \sim 21% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά και με καλύτερη αντιοξειδωτική δράση κατά \sim 9% σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη συμβατική μέθοδο (CEE) στους 60 °C για 4 h (TPC=14,37 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. και DPPH=20,23 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για τη MAEE). Η αιθανόλη 70% με τη χρήση μικροκυμάτων (MAEEth) εκχύλισε αποτελεσματικά κατά \sim 83% περισσότερο την OL σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο (CEEth). Η χρήση μικροκυμάτων και ενζύμου (MAEE) για 30 min στους 60 °C έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση OL (OL=0,549 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σχέση με αυτά που προέκυψαν με χρήση ενζύμου και συμβατική εκχύλιση (CEE) στους 60 °C για 4h. Το SUM των εκχυλισμάτων με χρήση μικροκυμάτων εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερο και συγκεκριμένα για 30 min στους 60 °C ήταν κατά 64%, 27% και 28 % μεγαλύτερο με τη χρήση αιθανόλης 70% (SUM=7,040 mg/g ελαιοπυρήνα για MAEEth), υδατικής ενζυμικής (SUM=2,463 mg/g ελαιοπυρήνα για MAEE) και υδατικής εκχύλισης (SUM=1,975 mg/g ελαιοπυρήνα για MAEW) αντίστοιχα, σε σχέση με αυτό των αντίστοιχων εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο εκχύλισης.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE) αξιολογήθηκε ως μία καινοτόμος μέθοδος εκχύλισης για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και εξετάστηκε η επίδραση των παραμέτρων όπως της θερμοκρασίας ($T=40$ και 60 °C) και της ταχύτητας ανάδευσης ($AS=4000$ και 12000 rpm) στην υδατική εκχύλιση (HAEW), στην υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAE) και στην εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEth) ($S:L=1:12,5$ g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα=1 mm, $t=30$ min). Επιπλέον, εξετάστηκε η ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα (διάλυμα ενζύμου 1% v/v στους 40 °C για 1 h) πριν την εκχύλισή του με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας. Η χρήση αιθανόλης 70% και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAEth) οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (TPC=26,37 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), η οποία είναι κατά 12% μεγαλύτερη της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων με συμβατική μέθοδο εκχύλισης (CEEth) και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (DPPH=17,62 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), περίπου 5% πιο δραστικά από εκείνα που προέκυψαν με εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης (CEEth) στους 60 °C για 4 h και έχουν ληφθεί σε μικρότερο χρόνο ($t=30$ min). Εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής

ταχύτητας (HAEE) στους 60 °C στις 12000 rpm για 30 min, ελήφθησαν εκχυλίσματα κατά ~37% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά (TPC=18,38 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη συμβατική μέθοδο (CEE) στους 60 °C για 4 h και 20% περισσότερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAEE) στους 60 °C για 30 min. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για την ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα προέκυψε ότι δεν διαφοροποιήθηκαν από εκείνα της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης χωρίς προκατεργασία, άρα η δράση του μίγματος των ενζύμων είναι επαρκής κατά τη διάρκεια της ΗΑΕ. Η αιθανόλη 70% εκχύλισε με τη χρήση ομογενοποιητή ταχύτητας (HAEEth) αποτελεσματικά κατά ~86% περισσότερο την ΟΛ (ΟΛ=6,34 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο (CEEth). Η χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και ενζύμου (HAEE) έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση ΗΥ σε σχέση με αυτά που προέκυψαν με χρήση αιθανόλης 70% (HAEEth) (ΗΥ=0,32 mg/g ελαιοπυρήνα). Η συγκέντρωση της RU στα αιθανολικά εκχυλίσματα βρέθηκε μεγαλύτερη (0,66 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σύγκριση με την αντίστοιχη της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης (RU=0,33 mg/g ελαιοπυρήνα). Το SUM των εκχυλισμάτων με τη χρήση αιθανόλης 70%, (HAEEth) εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερο και συγκεκριμένα για 30 min στους 60 °C και στις 12000 rpm ήταν κατά 67% μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνο των αντίστοιχων εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο εκχύλισης (CEEth). Γενικά, ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμου και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAEE) συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με τη συμβατική εκχύλιση (CEW και CEE) και την εκχύλιση με μικροκύματα (MAEW και MAEE).

Στα πλαίσια της διερεύνησης καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης, μελετήθηκε η εφαρμογή της τεχνολογίας της υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (HHPAE) για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και εξετάστηκε η επίδραση της πίεσης (P=300 και 600 MPa) και του χρόνου (t=5 και 10 min) στην υδατική εκχύλιση (HHPAEW), στην υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE) και στην εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) (S:L=1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα= 1 mm, T=25 °C). Η χρήση αιθανόλης 70% (HHPAEEth) και η υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE) σε συνδυασμό με την υψηλή υδροστατική πίεση οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα (TPC=16,52 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) αποτελούν το ~71% της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων με συμβατική μέθοδο εκχύλισης (CEEth) και έχουν ληφθεί σε μικρότερο χρόνο (t=10 min). Ακόμη, εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (HHPAEE) στα 600 MPa για 10 min, ελήφθησαν εκχυλίσματα κατά ~23% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά

(TPC=14,84 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση και τη συμβατική μέθοδο (CEE) στους 60 °C για 4 h και 36% περισσότερο, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με την υδατική εκχύλιση και τη χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (HHPAEW) στα 600 MPa για 10 min (TPC=9,25 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.). Τα εκχυλίσματα με μέγιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης ελήφθησαν με εφαρμογή HHPAEE στα 600 MPa για 10 min (DPPH=20,32 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και ήταν περίπου κατά 90% το ίδιο δραστικά με εκείνα που προέκυψαν από την εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης με ένζυμα (CEE) στους 60 °C για 4 h, καθώς και κατά 73% και 32%, αντίστοιχα πιο δραστικά σε σύγκριση εκείνα που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (DPPH=35,21 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HHPAEW και DPPH=26,85 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HHPAEEth, αντίστοιχα). Η αιθανόλη 70% εκχύλισε με τη χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης αποτελεσματικά κατά ~84% περισσότερο την OL (OL=4,42 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο (CEEth). Η χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης και ενζύμου (HHPAEE) έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση HY (HY=0,38 mg/g ελαιοπυρήνα) και RU (RU=0,22 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σχέση με εκείνα που προέκυψαν με χρήση αιθανόλης 70% (HHPAEEth). Το SUM των εκχυλισμάτων με τη χρήση αιθανόλης 70%, εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερο και συγκεκριμένα στα 600 MPa για 10 min (SUM=5,13 mg/g ελαιοπυρήνα) ήταν κατά 52% μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των αντίστοιχων εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο εκχύλισης (CEEth) (στους 60 °C για 4 h).

Στα πλαίσια της διερεύνησης νέων «φιλικών προς το περιβάλλον» πράσινων διαλυτών, μελετήθηκε η εφαρμογή νέων πράσινων ευτηκτικών διαλυτών (NADES) σε συνδυασμό με τις εναλλακτικές καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης, όπως χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE), μικροκυμάτων (MAE), υπερήχων (UAE) και υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (HHPAE) για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά συστήματα ευτηκτικών διαλυτών (NADES) που αποτελούνται από μίγμα γλωριούχου χολίνης με μαλτόζη (DES-MA), γλυκερόλη (DES-GLY), κιτρικό οξύ (DES-CA) και γαλακτικό οξύ (DES-LA) και εφαρμόστηκαν διαφορετικές λειτουργικές παράμετροι, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης (S:L= 1:12,5 g/mL, PS ξηρού ελαιοπυρήνα= 1 mm, t= 30 min). Ο διαλύτης DES-CA έδειξε την καλύτερη απόδοση εκχύλισης όσον αφορά το TPC και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από την HAE (TPC=34,08 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β., DPPH=5,11 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και την UAE (TPC=20,14 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β., DPPH=20,69 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και ο DES-LA για την MAE (TPC=29,57 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β., DPPH=17,51 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και την HHPAE (TPC=25,96 mg

GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β., DPPH=15,67 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), αντίστοιχα. Η HAE αποδείχθηκε ότι είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος δίνοντας εκχυλίσματα με τις μέγιστες αποδόσεις, τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές δράσεις και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε OL (OL=12,86 mg/g ελαιοπυρήνα), RU (RU=1,71 mg/g ελαιοπυρήνα) καθώς και στο SUM (SUM=18,30 mg/g ελαιοπυρήνα) σε σύγκριση με τις MAE, UAE και HHPAE. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με HPLC έδειξε ότι σχεδόν όλα τα εκχυλίσματα με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) σε όλες τις μεθόδους που εξετάστηκαν ήταν περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικές ενώσεις από εκείνα με τους συμβατικούς διαλύτες [αιθανόλη 70%, νερό (ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,5)].

Στα πλαίσια της αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα εξετάστηκαν εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του (κλάσμα εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού) σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο (σε συγκέντρωση 200 ppm). Το αιθανολικό εκχύλισμα και το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (2,32 g εκχυλίσματος/g DPPH για το αιθανολικό εκχύλισμα και 1,20 g εκχυλίσματος/g DPPH για το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα) από ότι τα κλάσματα του εξανίου (247,2 g εκχυλίσματος/g DPPH), του χλωροφορμίου (5,41 g εκχυλίσματος/g DPPH) και του νερού (3,71 g εκχυλίσματος/g DPPH) έναντι της οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος (στους 40 °C για 140 h). Επιπλέον, η υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα στη θερμική οξείδωση του ηλιέλαιου παρατηρήθηκε με το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα που είχε την υψηλότερη συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά (TPC=108,41 mg GA/g εκχυλίσματος). Η αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος του ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του έναντι της θερμικής οξείδωσης (για 60 h στους 80 °C) ηλιέλαιου με βάση τον αριθμό υπεροξειδίων του ελαίου ήταν κατά σειρά: BHT >κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα >αιθανολικό εκχύλισμα >κλάσμα χλωροφορμίου >κλάσμα νερού >κλάσμα εξανίου >α-τοκοφερόλης >δείγμα αναφοράς.

Ακόμη, εφαρμόστηκε η ενσωμάτωσή των φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο) και διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική δραστηριότητα και η οξειδωτική σταθερότητά τους στα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα. Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα (με προσθήκη φαινολικών συστατικών TPC≈0,115 mg GA/g ελαίου) μελετήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους σε επιταχυνόμενες συνθήκες οξείδωσης (αποθήκευση στους 80 °C). Ο αριθμός υπεροξειδίων, ο αριθμός ανισιδίνης και οι συντελεστές απορρόφησης K232 και K270 όλων των εμπλουτισμένων ελαίων ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους του αρχικού ελαιόλαδου κατά τη διάρκεια των 15 ημερών αποθήκευσης, υποδεικνύοντας ότι και ο

ελαιοπυρήνας αποτελεί σημαντική πηγή φαινολικών συστατικών που είναι ικανά να βελτιώσουν την οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μεταβολής της οξειδωτικής σταθερότητας του αρχικού ελαιόλαδου και των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες με την ταχεία μέθοδο Oxitest® έδειξαν ότι το αρχικό ελαιόλαδο οξειδώθηκε πιο γρήγορα [περίοδος επαγωγής (IP)=22,13h], ενώ οι φαινολικές ενώσεις από τον ελαιοπυρήνα επέτυχαν να παρατείνουν την οξειδωτική σταθερότητα των εμπλουτισμένων ελαίων, παρουσιάζοντας υψηλότερες τιμές IP (IP=23,59 h-27,99 h) σε σύγκριση με το αρχικό ελαιόλαδο. Ως εκ τούτου, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι ενισχύουν την οξειδωτική σταθερότητα των τελικών προϊόντων.

Από τη μελέτη επομένως διαφαίνεται ότι υπάρχουν ενδιαφέρουσες εναλλακτικές προοπτικές στη συμβατική εκχύλιση για την παραλαβή τόσο πυρηνέλαιου ενισχυμένου ποιοτικά σε βιοδραστικά συστατικά (στερόλες και σκουαλένιο) όσο και για την παραλαβή φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με βελτιωμένες ιδιότητες, που μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή νέων/καινοτόμων προϊόντων υψηλών προδιαγραφών.

Innovative extraction techniques of oil and minor bioactive compounds from olive pomace

Olive pomace is the solid by-product resulting from the olive oil production by the continuous centrifugation process, performed through a three-phase or a two-phase system. It is a low-cost material produced in large quantities and the common practice for its valorization is the recovery of its oil (olive-pomace oil) in small-scale industrial plants. The olive pomace oil displays almost similar composition to olive oil, however olive pomace oil has higher unsaponifiable matter content than olive oil, and it is particularly richer in certain sterols (such as β -sitosterol) and in squalene; these bioactive compounds have a remarkable biological activity. Besides being a source of oil, olive pomace is also an important source of other bioactive compounds, such as phenolic compounds. In recent years, the recovery of these bioactive compounds has been proposed, which can be used as antioxidants and antimicrobial agents in food, pharmaceutical and cosmetic systems.

The aim of this PhD dissertation was to evaluate innovative alternative extraction methods against conventional (by organic solvent) to obtain high-quality olive-pomace oil enriched in bioactive compounds such as sterols and squalene, as well as to obtain phenolic compounds directly from the olive pomace with improved properties (bioactivity) that can be incorporated into food systems (to produce functional products) providing benefits for human health.

The extraction process using organic solvent was studied as the most established method in the food industry in order to recover oil from oilseeds. Olive pomace with initial moisture content of 45% w/w, d.w. was used and it was dried until moisture content 4.5% w/w, d.w. and ground to a particle size of 1 mm. A kinetic study and modeling of the extraction process was carried out to obtain both the olive pomace oil and its unsaponifiable matter (estimated as USM% of oil). The kinetic study extraction experiments were performed on a scale of 25 g of dried olive pomace and using hexane as a solvent to examine the main parameters affecting the process, such as temperature ($T=40-60$ °C), solid:liquid ratio ($S:L=1:4-1:12$ g/mL), agitation speed ($AS=100-800$ rpm) and extraction time ($t=1-60$ min), and the evolution of the process affecting its cost and to investigate its sustainability on an industrial scale. Based on the results, the mechanism of the mass transfer of the oil and its unsaponifiable compounds in the solvent was revealed and it was found that the fastest transfer of soluble components to the solvent was carried out at the beginning step of the process (washing step), followed by a transfer rate decrease step (diffusion step) until it reached equilibrium, corresponding to the maximum extraction yield. The experimental data for the oil and its unsaponifiable matter (USM% of oil) were used to estimate the variables of two mathematical models: the model of So & Macdonald, (1986): $Y_t = Y_a^{wv} [1 - e^{-k_w t}] + Y_a^d [1 - e^{-k_d t}]$ and the model of Sulaiman et al. (2013):

$Y_t = Y_e [1 - e^{-(k \cdot \alpha)t}]$. The experimental data showed a very good fit to the So & Macdonald model (1986) providing high determination coefficient values ($R^2 > 0.996$) and low values of relative deviations ($0.40 < \text{ARD} < 3.05$). However, the model of Sulaiman et al. (2013) provided lower determination coefficient ($R^2 > 0.981$) and higher values of relative deviations ($3.75 < \text{ARD} < 5.73$). From the designed parameters for both models, higher temperatures (60 °C), solid: liquid ratio (1:12 g/mL) and agitation speed (800 rpm) led to increased oil yield (5.83-7.11% olive pomace oil) and favored the extraction of unsaponifiable matter in the extracted oil (USM%=3.40-4.23% of oil), while the mass transfer coefficients were increased (k_w , k_d for the model of So & Macdonald and $k \cdot \alpha$ for the model of Sulaiman et al.) during the extraction. The So & Macdonald (1986) kinetic model variables for extracting both the oil and its unsaponifiable matter under different conditions (temperature-T, solid: liquid ratio-S:L and agitation speed-AS) proved again the predominance of the washing stage in relation to the diffusion stage, since the washing coefficients ($1.05 < k_w < 2.27$) were higher than the diffusion coefficients ($0.11 < k_d < 0.21$). The values of enthalpy change (ΔH) and entropy change (ΔS) were positive, while the values of Gibbs free energy change (ΔG) were negative, indicating that the process was endothermic, irreversible and spontaneous. Under equilibrium conditions, the oil yield increases by a factor of about 1.096 and 1.054 for the models of So & Macdonald and Sulaiman et al., respectively, for every 10 °C rise in temperature.

The kinetic model proposed by So & Macdonald (1986) was used to correlate experimental data for selected bioactive compounds of the unsaponifiable matter of olive pomace oil, such as squalene and major sterols (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol) (mg/g oil), using the same extraction parameters (T=40-60 °C, S: L=1:4-1:12 g/mL, AS=100-800 rpm, and t=1-60 min). Similarly to the extraction of the oil and its unsaponifiable matter, the kinetics of these individual components are characterized by a rapid washing step and a subsequent slower diffusion step. Regarding the kinetic extraction model variables for squalene, β -sitosterol, stigmasterol and campesterol under different conditions (T, S:L, AS), the washing step proved again the prevalent step in relation to the diffusion step, since the washing coefficients (k_w) were higher than the diffusion coefficients (k_d). Among the tested values, higher temperature (60 °C), solid: liquid ratio (1:12 g/mL) and agitation speed (800 rpm) resulted in an increased concentration of β -sitosterol (0.81-1.18 mg/g of oil), campesterol (0.16-0.20 mg/g oil), stigmasterol (0.10-0.14 mg/g oil) and squalene (3.95-4.20 mg/g oil) of the extracting oils.

Furthermore, extraction using a co-solvent was examined to recover components of different polarity. Isopropyl alcohol was used as co-solvent, and various mixtures of hexane (H):isopropanol (I) in various ratios (H:I=3:1, H:I=3:2, H:I=4:1, H:I=9: 1) were evaluated in terms of the oil yield, the unsaponifiable matter (USM%) as well as the major sterols and squalene content in the extracted oil. The extraction experiments were carried out on a Soxhlet

apparatus on a scale of 25 g of dried olive pomace with a particle size (PS) of 1 mm and a solid/liquid ratio (S:L) of 1:8 g/mL for 8 h. Among the solvent mixtures tested, the H:I=3:2 mixture exhibited the highest oil recovery (13.70% olive pomace), the largest unsaponifiable matter in the extracted oil (USM=4.92% of oil) and high sterols and squalene concentration (total sterols=1,706 mg/g oil, squalene=5,217 mg/g oil).

Ultrasonic assisted - extraction (UAE), an "eco-friendly" extraction method that provides efficient and selective oil extraction while protecting the bioactive components from degradation, was applied to extract both the olive pomace oil and to recover its bioactive compounds that constitute its unsaponifiable matter such as sterols and squalene. RSM and Box-Behnken experimental design identified polynomial equations correlating the oil yield, as well as the unsaponifiable matter (USM%), the total content of phenolic compounds (TPC) and the antioxidant activity (DPPH) of the extracted olive pomace oil with the process parameters (T=40-60 °C, S:L=1:4-1:12 g/mL and PS=0.5-2 mm). The extraction experiments were carried out on a scale of 25 g of dried olive pomace and a predetermined volume of hexane in an ultrasonic bath for 1 h. The maximum oil yield (11.22% olive pomace) was achieved with T=60 °C, S:L=1:12 g/mL and PS=0.5 mm. The maximum value of USM% of oil was 4.50% and was achieved at optimal conditions T=55 °C, S:L=1:12 g/mL and PS=0.5 mm. The maximum TPC value of the olive pomace oil was 0.261 mg GA/g of oil and was obtained by extraction of the olive pomace in conditions: T=50 °C, S:L=1:8 g/mL and PS=0.9 mm. The maximum antioxidant activity (DPPH) of the olive pomace oil was found to be 0.211 mg Trolox/g oil and was achieved at T= 55 °C, S:L=1:8 g/mL and PS=0.9 mm. Through the model, the optimization of the recovery of the major sterols (β -sitosterol, campesterol and stigmasterol) and squalene, that are the main components of the unsaponifiable fraction of the oil, and the effect of the main extraction parameters (T=40-60 °C and S:L=1:4-1:12 g/mL) were examined. The maximum β -sitosterol concentration was found to be 1.399 mg/g at T=60 °C and S:L=1:12 g/mL. The maximum concentration of campesterol was 0.220 mg/g and was achieved at T=55 °C for S:L=1:10 g/mL. The maximum concentration of stigmasterol was found to be 0.105 mg/g, by applying T=50 °C and S:L=1:12 g/mL. Furthermore, the maximum concentration of squalene was found to be 4.575 mg/g at T= 60 °C and S:L=1:12 g/mL.

In addition, the combination of H:I=3:2 mixture and ultrasound extraction under the optimal conditions (T=50-60 °C, S:L=1:12 g/mL, t=1 h) was examined and showed similar results to those obtained by applying UAE and using hexane under the same conditions in terms of oil yield, unsaponifiable matter (USM%) and the individual sterols of the olive pomace oil. The optimal conditions of ultrasonic assisted extraction (UAE) were compared with the conventional Soxhlet extraction (SE) (extraction conditions: S:L=1:8 g/mL, T \approx 78 °C, t=8h, PS=1 mm, solvent=hexane and H:I=3:2 mixture) with respect to the extraction yield of olive-pomace oil, USM%, individual major sterols, squalene, TPC and antioxidant activity (DPPH)

of recovered oil. It was found that the olive pomace oil under optimal UAE conditions showed higher yield (11%) and better quality compared to its unsaponifiable matter (USM=4.51% of oil), the total content of phenolic compounds (TPC=0.255 mg GA/g of oil) and the antioxidant activity of the extracted oil (DPPH=0.225 mg Trolox/g oil) from the corresponding extracted oil obtained by Soxhlet (SE) with hexane as solvent (USM=3.68% of oil, TPC=0.207 mg GA/g oil and DPPH=0.189 mg Trolox/g oil, respectively). It should be noted that olive pomace oil obtained by UAE reached about 82% of the corresponding oil yield and 92% of its total unsaponifiable matter (USM%) and showed higher TPC (5.5%) and antioxidant activity (DPPH) (by 8%) than that obtained by the SE method and the H:I=3:2 mixture as solvent. As far as the individual sterols and squalene are concerned, the β -sitosterol concentration obtained under optimal UAE conditions was higher (1.349 mg/g of oil) than that obtained by the SE method and using hexane (0.911 mg/g oil) or mixture H:I=3:2 (1.121 mg/g oil). The extracted oil by the SE method and the H:I=3:2 mixture had a similar concentration of campesterol (0.228 mg/g oil) to oil obtained by UAE (0.208 mg/g oil) and lower stigmaterol concentration 0.101 mg/g oil compared to the one obtained by UAE (0.115 mg/g oil). The concentration of squalene in the extracted oils was found to decrease in the following order: SE-H:I=3:2>UAE-hexane \approx UAE-H:I=3:2>SE-hexane.

Furthermore, the extraction of phenolic compounds directly from the olive pomace was investigated. The effect of the type of organic solvent and its concentration in water (% v/v) was examined by conventional extraction in terms of the total content of phenolic components (TPC), the antioxidant activity (DPPH) of the extracts as well as the main phenolic components of the extracts. Organic solvents such as ethanol, methanol and acetone in different ratios in water (50, 70 and 90% v/v) were examined, and the conventional extraction was optimized by two-level Box-Behnken design (T=60 °C, S:L=1:12.5 g/mL, PS of dried olive pomace=1 mm, t=4 h). According to the results of the study, ethanol 70% v/v was chosen as the extraction solvent providing extracts with the highest total content of phenolic compounds (TPC=23,061 mg GA/g olive pomace d.w.), the maximum antioxidant activity (DPPH=18,156 g of olive pomace d.w./g DPPH), and with the highest concentration of oleuropein (OL), hydroxytyrosol (HY), rutin (RU) and the total determined phenolic components of the extracts (SUM) (OL=0.834 mg/g olive pomace, HY=1.04 mg/g olive pomace, RU=0.493 mg/g olive pomace and SUM=2.41 mg/g olive pomace).

In addition, the effect of the enzymes on the yield of phenolic compounds from the olive pomace was investigated. The enzymes selected were a mixture of pectinase and polygalacturonase (Novozym 33095) and when the optimal concentration of the enzyme solution (1% v/v) was determined, the effect of temperature (T=40 and 60 °C) and time (t=1 and 4 h) on aqueous extraction (CEW), aqueous enzymatic extraction (CEE) and extraction using 70% ethanol (CEEth) for the recovery of its phenolic compounds (S:L=5 g/mL, PS of

dried olive pomace=1 mm) was evaluated. The aqueous extraction was performed using buffer pH=4,5. The use of ethanol 70% resulted in the recovery of extracts with the maximum total content of phenolic compounds (TPC=23.88 mg GA/g olive pomace d.w.) and the maximum antioxidant activity (DPPH=18.36 g olive pomace d.w./g DPPH). However, by applying the aqueous enzymatic extraction at 60 °C, more phenolic-enriched extracts with higher antioxidant activity compared to the aqueous extraction were obtained (TPC=11.41 mg GA/g olive pomace d.w. for the CEE and TPC=9.92 mg GA/ g olive pomace d.w. for CEW, respectively). The highest concentration of OL was obtained with ethanol (OL=0.868 mg/g olive pomace), followed by aqueous enzymatic extraction (OL=0.549 mg/g olive pomace) for 4 h at 60 °C. Also, ethanol 70% was the most effective solvent for HY extraction, however the use of enzymes provided extracts with a concentration of HY that reached 88% of the corresponding of extracts obtained by ethanol as solvent.

In addition, the application of ultrasound (UAE) was investigated for the extraction of phenolic compounds from olive-pomace. Process parameters that influence the effectiveness of the method (solvent type=ethanol, methanol and acetone, concentration=50, 70 and 90% v/v, T=40, 60, 80 °C) were tested and the UAE optimized in terms of total content of phenolic compounds (TPC), antioxidant activity (DPPH) and the main phenolic components of the extracts (S:L=1:12.5 g/mL, PS of dried olive pomace=1 mm, t=30 min, frequency=60 kHz). The maximum TPC was found to be 21.77 mg GA/g of olive pomace d.w. by applying T= 60 °C and ethanol at 70% concentration. The maximum value of the antioxidant activity was 20.95 g of olive pomace d.w./g of DPPH by applying T=60 °C and 70% ethanol. OL, HY and SUM exhibited the maximum concentration (OL=0.674 mg/g of olive pomace, HY=1.161 mg/g of olive pomace and SUM=2.32 mg/g of olive pomace) in the extracts obtained by applying T=60 °C and ethanol at a concentration of 70%, while the maximum concentration of RU was found at 0.421 mg/g of olive pomace by applying T=70 °C and 70% ethanol. Comparing the results with those obtained by the conventional method, it was found that the TPC of the extracts obtained under optimal conditions using UAE reached 93% of that obtained by the CE method and also the ultrasound extract showed 13% less antioxidant activity (DPPH) compared to that obtained by the CE. The extract obtained under optimal UAE conditions showed higher HY concentration of 11% and the SUM was similar (98%) to that of the conventional method (CE). However, it should be noted that the optimum result from UAE was obtained at reduced extraction time (t=30 min), whereas the corresponding result with the CE method was obtained for t=4 h.

Microwave assisted - extraction (MAE) was investigated as another alternative extraction method for the recovery of phenolic compounds from olive pomace and the effect of temperature (T=40 and 60 °C) and time (t=5 and 30 min) on aqueous extraction (MAEW), aqueous enzymatic extraction (MAEE), and extraction with ethanol 70% (MAEEth)

(S:L=1:12.5 g/mL, PS of dried olive pomace=1 mm, microwave power=200 W) was evaluated. The use of 70% ethanol and microwave (MAEEth) resulted in the recovery of extracts with maximum TPC [$\geq 73\%$ of TPC and $\geq 5\%$ less antioxidant activity than the one obtained by conventional extraction method (CEEth) at 60 °C for 4 h, respectively, which has been extracted in a shorter time (t=30 min)]. It is also worth noting that by applying the microwave aqueous enzymatic extraction (MAEE) at 60 °C for 30 min, the extracts showed ~ 21% more phenolic content (TPC) and better antioxidant activity of ~9% compared to the corresponding extracts obtained by the aqueous enzymatic extraction by the conventional method (CEE) at 60 °C for 4 h (TPC=14.37 mg GA/g olive pomace d.w. and DPPH=20.23 g olive pomace d.w./g DPPH for MAEE, respectively). By using ethanol 70% and MAE (MAEEth), OL was efficiently extracted [$\geq 83\%$ more OL compared to the conventional method (CEEth)]. The application of MAE and the use of enzymes (MAEE) for 30 min at 60 °C gave extracts of a similar OL concentration (OL=0.549 mg/g olive pomace) than those obtained using enzyme and conventional extraction (CEE) at 60 °C for 4h. The SUM of the MAE extracts appeared to be generally higher, and specifically for 30 min at 60 °C, it was 64%, 27% and 28% higher using 70% ethanol (SUM=7.040 mg/g olive pomace for MAEEth), aqueous enzymatic extraction (SUM=2,463 mg/g olive pomace for MAEE) and aqueous extraction (SUM=1,975 mg/g olive pomace for MAEW) respectively, compared to that of the corresponding extracts obtained by conventional extraction.

The homogenate assisted extraction (HAE) was evaluated as an innovative extraction method for the recovery of phenolic compounds from the olive pomace and the effect of parameters such as temperature (T=40 and 60 °C) and agitation speed (AS=4000 and 12000 rpm) on aqueous extraction (HAEW), aqueous enzymatic extraction (HEEE) and ethanol 70% extraction (HEEEEth) (S:L=1:12.5 g/mL, t=30 min) was evaluated. In addition, the enzyme pretreatment of the olive pomace (1% v/v enzyme solution at 40 °C for 1 h) was examined before extraction with a high speed homogenizer. The use of ethanol 70% and high speed homogenizer (HAEEth) led to the recovery of extracts with the maximum content of phenolic compounds (TPC=26.37 mg GA/g olive pomace d.w.), which is 12% higher than the corresponding content of the extracts by conventional extraction method (CEEth) and the maximum antioxidant activity (DPPH=17.62 g olive pomace d.w./g DPPH), about 5% more active than those obtained by conventional extraction (CEEth) at 60 °C for 4 h and obtained in less time (t=30 min). By applying aqueous enzymatic extraction and using a high-speed homogenizer (HAEE) at 60 °C at 12000 rpm for 30 min, extracts showed $\geq 37\%$ more total phenolic content (TPC=18.38 mg GA/g olive pomace d.w.) compared to the corresponding extracts obtained by the aqueous enzymatic extraction by the conventional method (CEE) at 60 °C for 4 h and 20% more total phenolic content than the corresponding extracts obtained by the aqueous enzymatic extraction using microwaves (MAEE) at 60 °C for 30 min. Comparing the

results for the enzyme pretreatment of the olive pomace, it was proved that they were not significantly different from those of the aqueous enzymatic extraction without pretreatment, thus the activity of the enzyme mixture is sufficient during the application of HAE. Ethanol 70% and high speed homogenizer (HAEEth) extracted effectively about 86% more OL (OL=6.34 mg/g olive pomace) compared to the conventional method (CEEth). The use of high speed homogenizer and enzymes (HAE) gave extracts of similar HY concentration compared to those obtained using 70% ethanol (HAEEth) (HY=0.32 mg/g olive pomace). The concentration of RU in ethanolic extracts was found to be higher (0.66 mg/g olive pomace) compared to the corresponding aqueous enzyme extraction (RU=0.33 mg/g olive pomace). The SUM of the extracts using 70% ethanol (HAEEth) appeared to be generally higher; in particular, for 30 min at 60 °C and 12000 rpm, it was 67% greater than that of the corresponding extracts obtained by conventional extraction method (CEEth). In general, the combination of enzymes and high-speed homogenizer (HAE) contributed to extracts with more enriched phenolic profiles and higher concentration of individual phenolic compounds compared to conventional extraction (CEW and CEE) and microwave extraction (MAEW and MAEE).

The application of HHPAE as an innovative extraction method for the recovery of phenolic compounds from olive pomace was investigated and the effect of pressure (P=300 and 600 MPa) and time (t=5 and 10 min) on aqueous extraction (HHPAEW), aqueous enzymatic extraction (HHPAEE) and ethanol 70% extraction (HHPEAEEth) (S:L=1:12.5 g/mL, PS of dried olive pomace=1 mm, T=25 °C). The use of ethanol 70% (HHPAEEth) and aqueous enzymatic extraction (HHPAEE) combined with high hydrostatic pressure led to the recovery of extracts with the maximum content of phenolic compounds. The ethanolic extracts (TPC=16.52 mg GA/g olive pomace d.w.) consisted of ~71% of the corresponding extracts by conventional extraction method (CEEth) and were obtained in less time (t=10 min). Furthermore, by applying aqueous enzymatic extraction and using high hydrostatic pressure (HHPAEE) at 600 MPa for 10 min, extracts were obtained by $\geq 23\%$ more total phenolic content (TPC=14.84 mg GA/g olive pomace d.w.) compared to the corresponding extracts obtained by the aqueous enzymatic extraction and the conventional method (CEE) at 60 °C for 4 h and 36% more total phenolic content, compared to the corresponding extracts obtained by the aqueous extraction and the use of high hydrostatic pressure (HHPAEW) at 600MPa for 10 min (TPC=9.25 mg GA/g olive pomace d.w.). The extracts with a maximum antioxidant activity were obtained by applying HHPAEE at 600MPa for 10 min (DPPH=20.32 g olive pomace d.w./g DPPH) and were about 90% as effective as those resulting from the application of conventional (CEE) extraction at 60 °C for 4 h as well as 73% and 32%, respectively more active compared to those obtained by aqueous extraction and extraction with 70% ethanol using HHP (DPPH=35.21 g olive pomace d.w./g DPPH for HHPAEW and DPPH=26.85 g olive pomace d.w./g DPPH for HHPAEEth, respectively). Ethanol 70% and HHP extracted

effectively ~84% more OL (OL=4.42 mg/g olive pomace) compared to the conventional method (CEEth). The use of HHP and enzymes (HHPAEE) gave extracts of similar HY concentration (HY=0.38 mg/g olive pomace) and RU (RU=0.22 mg/g olive pomace) than those obtained using ethanol 70 % (HHPAEEth). The SUM of the extracts using 70% ethanol was generally higher and in particular at 600 MPa for 10 min (SUM=5.13 mg/g olive pomace) was 52% higher than that of the corresponding extracts obtained by conventional method extraction (CEEth) (at 60 °C for 4 h).

New green eutectic solvents (NADES) have been studied in combination with alternative innovative extraction methods, such as the use of high-speed homogenizer (HAE), microwaves (MAE), ultrasounds (UAE) and high hydrostatic pressure (HHPAE) to recover phenolic compounds from olive pomace. Four different eutectic solvent systems (NADES) consisting of a mixture of choline chloride with maltose (DES-MA), glycerol (DES-GLY), citric acid (DES-CA) and lactic acid (DES-LA) and different process parameters, depending on the extraction method (S:L=1:12.5 g/mL, PS of dried olive pomace=1 mm, t=30 min). The DES-CA showed the best extraction yield with respect to TPC and the antioxidant activity (DPPH) of the extracts obtained by applying HAE (TPC=34.08 mg GA/g olive pomace d.w., DPPH=5.11 g olive pomace d.w./g DPPH) and UAE (TPC=20.14 mg GA/g olive pomace d.w., DPPH=20.69 g olive pomace d.w./g DPPH) and DES-LA by applying MAE (TPC=29.57 mg GA/g olive pomace d.w., DPPH=17.51 g olive pomace d.w./g DPPH) and HHPAE (TPC=25.96 mg GA/g olive pomace d.w., DPPH=15.67 g olive pomace d.w./g DPPH), respectively. HAE has been shown to be the most effective method achieving extracts with the highest yields, strongest antioxidant activity and highest concentration of OL (OL=12,86 mg/g olive pomace), RU (RU=1,71 mg/g olive pomace) as well as SUM (SUM=18.30 mg/g olive pomace) compared to MAE, UAE and HHPAE. HPLC analysis of the extracts showed that almost all of the extracts obtained by eutectic solvents (NADES) in all of tested methods were more enriched in phenolic compounds than those with conventional solvents [ethanol 70%, water (buffer pH=4.5)].

Moreover, applications in food systems were examined in order to evaluate antioxidant activity of the extracts of the phenolic compounds from olive pomace. In particular, the antioxidant activity of olive pomace extract and its fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, and water) was studied in a standard unsaturated fatty acid such as linoleic acid and in a vegetable oil such as sunflower oil (at a concentration of 200 ppm). The ethanolic extract and the ethyl acetate fraction had a stronger antioxidant activity (2.32 g extract/g DPPH for the ethanolic extract and 1.20 g extract/g DPPH for the ethyl acetate fraction) than the hexane fraction (247, 2 g extract/g DPPH), the chloroform fraction (5.41 g extract/g DPPH) and the water fraction (3.71 g extract/g DPPH) against linoleic acid oxidation (at 40 °C for 140 h). In addition, the higher antioxidant activity in thermal oxidation of sunflower oil was observed by the fraction of ethyl acetate having the highest concentration in total content of phenolic compounds (TPC= 08.41 mg GA/g

extract). The antioxidant activity of the ethanolic extract and its fractions on thermal oxidation of sunflower oil (for 60 h at 80 °C) based on the peroxide values was: BHT>ethyl acetate fraction>ethanol extract>chloroform fraction>water fraction>hexane fraction> α -tocopherol>control.

Furthermore, the incorporation of the phenolic compounds of the olive pomace as they are and/or encapsulated in emulsions based on olive oil (enriched olive oil) has been applied and their antioxidant activity and oxidative stability in enriched olive oils have been investigated. Enriched olive oils (with the addition of phenolic compounds TPC \approx 0,115 mg GA/g of oil) were studied under accelerated oxidation conditions (storage at 80 °C). The peroxide value, the p-anisidine value, and the absorption coefficients K₂₃₂ and K₂₇₀ of all the enriched olive oils were significantly lower than those of the original olive oil during the 15-day storage, indicating that the olive-pomace is also an important source of phenolic compounds that are capable of improving the oxidative stability of the oils. In addition, the results of the change of the oxidative stability of the original olive oil and the enriched olive oil under accelerated conditions with the Rapid Oxitest® method showed that the original olive oil was oxidized more rapidly [induction period-IP=22.13 h], while the phenolic compounds from the olive-pomace were able to prolong the oxidative stability of the enriched olive oils, showing higher IP values (IP=23.59 h-27.99 h) compared to the original olive oil. Therefore, the extracts from olive pomace could be used as natural additives in the food industry as they enhance the oxidative stability of the final products.

Therefore, the study reveals that there are interesting alternatives to conventional extraction in order to obtain high-quality olive-pomace oil enriched in bioactive compounds (sterols and squalene) as well as to obtain phenolic compounds (oleuropein, hydroxytyrosol, rutin etc.) directly from the olive pomace with improved properties that can be incorporated into food systems, leading to the production of new/innovative products.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Ελαιοπυρήνας: πηγή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών

1. Εισαγωγή

Το ελαιόδενδρο αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες για τις χώρες της Μεσογείου ενώ ο καρπός της ελιάς αξιοποιείται κυρίως για την ανάκτηση του περιεχόμενου ελαίου (10-25% w/w ελιάς). Σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνούς Ελαιοκομικού Συμβουλίου, η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα, κατά σειρά προτεραιότητας, παράγουν πάνω από το 97% της συνολικής ποσότητας ελαιόλαδου παγκοσμίως (International Olive Council, 2015). Το ελαιόλαδο παράγεται με φυσικές μεθόδους (μηχανική εξαγωγή) και είναι άμεσα καταναλώσιμο, χωρίς να απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία (εξευγενισμό) όπως συμβαίνει στα άλλα φυτικά έλαια. Είναι ιδιαίτερα γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακορεστότητα λιπαρά οξέα (ελαϊκό οξύ) καθώς και για το αξιολόγο περιεχόμενό του σε φαινολικά συστατικά (ελευρωπαΐνη, ελαιοκανθάλη), γεγονός που το καθιστά ως το καλύτερο βρώσιμο φυτικό έλαιο με υψηλή διατροφική αξία (Aragon & Palancar, 2001). Αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια αναπόσπαστο μέρος της μεσογειακής διατροφής, η οποία συνδέεται αποδεδειγμένα με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης παθήσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, ορισμένες μορφές καρκίνου, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, γεγονός που αποδίδεται στην κατανάλωση ελαιόλαδου (Bullo, Lamuela-Raventos, & Salas-Salvado, 2011, Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2009). Άλλωστε, αυτός είναι και ο λόγος που η κατανάλωση του ελαιόλαδου σε όλο τον κόσμο έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Το ελαιόλαδο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ελαϊκό οξύ (56-84%), διαθέτει υψηλή θρεπτική αξία, ενώ επιπλέον, λόγω των περιεχόμενων βιοδραστικών συστατικών στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του, χαρακτηρίζεται από υψηλή σταθερότητα και ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες γεύσης και αρώματος (Murkovic, Lechner, Pietzka, Bratacos, & Katzogiannos, 2004).

Η εξαγωγή του ελαιόλαδου παλαιότερα γινόταν σε ελαιοτριβεία μέσω μηχανικής συμπίεσης, ενώ σήμερα επιτυγχάνεται μέσω φυγοκέντρησης της επεξεργασμένης (με άλεση και μάλαξη) ελαιόμαζας με χρήση φυγοκεντρικών διαχωριστήρων δύο ή τριών φάσεων. Το παραλαμβανόμενο ελαιόλαδο ανέρχεται σε ποσότητα περίπου 25% κατά βάρος των επεξεργαζόμενων ελιών, ενώ από τη διαδικασία παραγωγής του προκύπτουν ταυτόχρονα το στερεό υπόλειμμα, γνωστό ως ελαιοπυρήνας, καθώς και υγρά απόβλητα. Ο ελαιοπυρήνας αποτελείται από μίγμα σάρκας, πυρήνα (κουκουτσιού) και φλοιού της ελιάς και μπορεί να φτάσει σε ποσότητα πάνω από το 30% της επεξεργαζόμενης μάζας ελιών. Από άποψη

σύστασης, ο ελαιοπυρήνας περιέχει υγρασία σε ποσοστό εξαρτώμενο από το χρησιμοποιούμενο σύστημα εξαγωγής του ελαιολάδου (30% για σύστημα μηχανικής συμπίεσης, και 45% ή 70% w/w, για τριφασικό ή διφασικό φυγοκεντρικό σύστημα, αντίστοιχα) και έλαιο (πυρηνέλαιο) που μπορεί να υπερβαίνει το 8-12% w/w (Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006). Η παραγωγή του ελαιολάδου αποτελεί μία σημαντική οικονομική και κοινωνική βιομηχανική δραστηριότητα για την Ελλάδα, καθώς η ετήσια παραγωγή του ανέρχεται κατά μέσο όρο σε 300.000 τόνους (International Olive Council, 2015). Από την άλλη πλευρά, οι ποσότητες ελαιοπυρήνα που προκύπτουν ανέρχονται αντίστοιχα σε 400.000 τόνους ετησίως, προερχόμενες κατά πλειοψηφία από φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων. Η συνήθης πρακτική αξιοποίησης του ελαιοπυρήνα είναι για ανάκτηση του περιεχόμενου πυρηνέλαιου με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (εξάνιο) και η περαιτέρω χρήση του ως εδώδιμο έλαιο μετά από εξευγενισμό, όπως και η χρήση του στερεού υπολείμματος, πυρηνόξυλου, ως πρόσθετο σε ζωοτροφές, ως καύσιμη βιομάζα ή τέλος και η άμεση διάθεσή του χωρίς κάποια επεξεργασία.

Το πυρηνέλαιο εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το ελαιόλαδο, καθώς και τα δύο έλαια προέρχονται από τον καρπό της ελιάς, με τη διαφορά ότι το μεν ελαιόλαδο λαμβάνεται από τις ελιές με μηχανική μέθοδο (συμπίεση ή φυγοκέντρωση, χωρίς χρήση διαλύτη), το δε πυρηνέλαιο από τον ελαιοπυρήνα με εκχύλιση με εξάνιο. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για το πυρηνέλαιο οφείλεται στα ενδογενή βιοδραστικά συστατικά του, τα οποία περιέχονται γενικά στο ασαπωνοποίητο κλάσμα αυτού, όπως οι στερόλες, οι λιπαρές αλκοόλες, οι τοκοφερόλες, οι τριτερπενικές αλκοόλες και το σκουαλένιο, αλλά και στα φαινολικά συστατικά του. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πυρηνέλαιο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασαπωνοποίητα συστατικά απ' ό,τι το ελαιόλαδο (Rodríguez-Gutiérrez, Lama-Muñoz, Ruiz-Méndez, Rubio-Senent, & Fernández-Bolaños, 2012) και ειδικότερα ότι είναι πλουσιότερο σε ορισμένες στερόλες (Rodríguez et al., 2008). Η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλες μπορεί να είναι ≥ 2500 mg/kg στο ακατέργαστο πυρηνέλαιο και ≥ 1600 mg/kg στο εξευγενισμένο πυρηνέλαιο. Πιο συγκεκριμένα, η β-σιτοστερόλη και η καμπεστερόλη αποτελούν το 93% και το 5% του ολικού κλάσματος στερολών του πυρηνέλαιου, αντίστοιχα. Άλλες στερόλες που υπάρχουν στο έλαιο αυτό σε πολύ μικρές ποσότητες ή ίχνη είναι η χοληστερόλη, η καμπεστανόλη, η στιγμαστερόλη, η σιτοστανόλη, η 5,24-στιγμασταδιενόλη, η Δ7-στιγμαστερόλη και η Δ7-αβεναστερόλη (Boskou, 2009). Επιπλέον, το πυρηνέλαιο περιέχει υψηλότερες ποσότητες ερυθροδιόλης και ουβαόλης ($> 4,5\%$ του ολικού κλάσματος στερολών) από ότι το ελαιόλαδο ($< 4,5\%$ του ολικού κλάσματος στερολών)· ως εκ τούτου, η συνολική ποσότητα στις δύο αυτές στερόλες αποτελεί μία ποιοτική παράμετρο για την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου με πυρηνέλαιο (Paiva-Martins & Kiritsakis, 2017). Επιπλέον, το σκουαλένιο είναι μία ουσία με μεγάλο ενδιαφέρον, η οποία συναντάται τόσο στο ελαιόλαδο όσο και στο πυρηνέλαιο σε

συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 7 έως 8,70 mg/g και έως 3,4 mg/g αντίστοιχα, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 50 % του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαίου (Beltran, Bucheli, Aguilera, Belaj, & Jimenez, 2016, Yuan et al., 2017, Ghanbari, Anwar, Alkharfy, & Gilani, 2012, Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Boskou, 2011, Firestone, 2001). Τα περισσότερα εξ αυτών των αναφερθέντων συστατικών θεωρούνται βιοδραστικά συστατικά καθώς διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα με ενδιαφέρουσες βιοδραστικές και θρεπτικές ιδιότητες, και συνεπώς προτείνονται ως λειτουργικά συστατικά αφού έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντι-φλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή και αντικαρκινική δράση (Aludatt et al., 2010).

Ο ελαιοπυρήνας θεωρείται ακόμη πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων (όπως φαινολικά οξέα και αλκοόλες, σεκοϊριδοειδείς γλυκοζίτες και παράγωγά τους, λιγνάνες και φλαβόνες), συγκεντρώνοντας το 98% των συνολικών φαινολικών συστατικών του ελαιόκαρπου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς παρέχουν οφέλη που προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν βιοδραστικές ιδιότητες, όπως αντική, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινογόνο δράση (Chanioti, Siamandoura, & Tzia, 2016, Fernández-bolaños, Rodríguez, Rodríguez, Guillén, & Jiménez, 2006).

Σήμερα, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα, τόσο για την ανάκτηση του πυρηνέλαιου καθώς και την κινητική μελέτη της διεργασίας εκχύλισης του με στόχο την αριστοποίησή της σε ποσοτική απόδοση σε έλαιο όσο και για την ταυτόχρονη παραλαβή των αξιόλογων βιοδραστικών συστατικών του, είτε μέσω του περιεχόμενου ελαίου είτε απευθείας από τον ελαιοπυρήνα, για την περαιτέρω χρήση και ενσωμάτωσή τους ως συστατικά σε νέα προϊόντα τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Συνεπώς, σύμφωνα με τη σύγχρονη τάση αναζήτησης νέων συστατικών από φυσικές πηγές, η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα προβάλλει ως ιδιαίτερα ελκυστική και προκλητική.

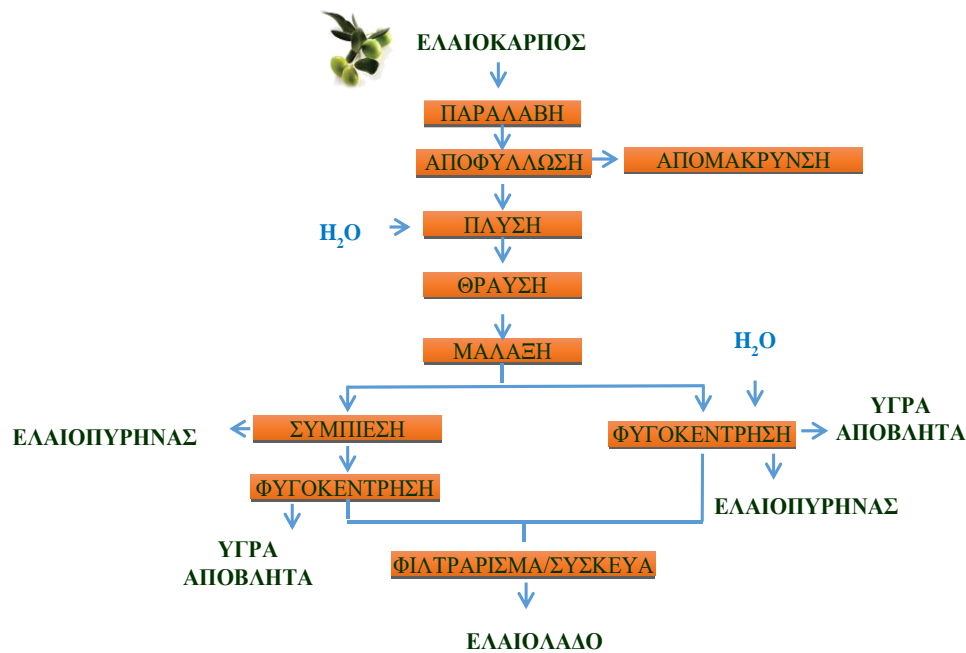
1.1 Ελαιοπυρήνας: πηγή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών

Η επεξεργασία του ελαιόκαρπου στα ελαιοτριβεία για την παραγωγή ελαιόλαδου αποδίδει ταυτόχρονα ένα στερεό παραπροϊόν σε μεγάλες ποσότητες, τον ελαιοπυρήνα, που αποτελείται από το φλοιό, τη σάρκα και τον πυρήνα (κουκούτσι) της ελιάς. Ο ελαιοπυρήνας διαφέρει σε σύσταση ανάλογα με την προέλευσή του, δηλαδή τον τύπο του ελαιοτριβείου και την εφαρμοζόμενη μέθοδο (τεχνολογία) εξαγωγής του ελαιόλαδου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ελαιοπυρήνας που προκύπτει από τα τριφασικά ελαιοτριβεία και ο διφασικός ή υγρός ελαιοπυρήνας που προκύπτει από τα διφασικά ελαιοτριβεία. Τόσο στον ελαιοπυρήνα από τριφασικό σύστημα όσο και στον υγρό ελαιοπυρήνα, περιέχεται σε κάποιο αξιόλογο ποσοστό έλαιο, το πυρηνέλαιο, το οποίο μπορεί να ανακτηθεί στα πυρηνελαιουργεία κυρίως

με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Επιπλέον, από τον ελαιοπυρήνα μπορούν να παραληφθούν και τα ανωτέρω αναφερθέντα βιοδραστικά συστατικά είτε μέσω του περιεχόμενου ελαίου με εκχύλιση, ή απευθείας από τον ελαιοπυρήνα. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά σχετικά με τον ελαιοπυρήνα που προκύπτει ανάλογα με την επιλεγόμενη διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου που ακολουθείται.

1.1.2 Ελαιοπυρήνας ανάλογα με την επιλεγόμενη διαδικασία παραγωγής ελαιόλαδου

Η παραγωγική διαδικασία για την εξαγωγή του ελαιόλαδου από τους καρπούς της ελιάς περιλαμβάνει τρία στάδια: i. τη σύνθλιψη (θραύση ή άλεση) του καρπού, ώστε να προκύψει μία ομοιογενής πάστα (ελαιοζύμη/ελαιομάζα), ii. τη μάλαξη αυτής (εφόσον θα ακολουθήσει φυγοκεντρικός διαχωρισμός του ελαίου) με σκοπό να αυξηθεί το ποσοστό του απελευθερούμενου ελαίου, καθώς μικρά σταγονίδια ελαίου συνενώνονται και διευκολύνεται έτσι ο διαχωρισμός των φάσεων ελαίου και ύδατος, και iii. το διαχωρισμό της ελαιώδους φάσης είτε μέσω υδραυλικής πίεσης (ασυνεχής μέθοδος) άμεσα από την ελαιομάζα (χωρίς προηγούμενη μάλαξη) η οποία έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί, είτε μέσω της σύγχρονης μεθόδου της φυγοκέντρωσης - ψυχρής εξαγωγής (συνεχής μέθοδος) με προσθήκη νερού για καλύτερο διαχωρισμό του ελαίου (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Παραγωγική διαδικασία ελαιόλαδου

Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και την ποιότητα του ελαιόλαδου και κατ' επέκταση και του πυρηνέλαιου είναι η περίοδος συγκομιδής, ο βαθμός ωρίμανσης των καρπών, ο τρόπος συγκομιδής (συλλογή χειρωνακτικά, με δίχτυα ή άλλα μέσα), η αποθήκευση των ελιών πριν από την επεξεργασία, η αποφύλλωση, η προκατεργασία της ελαιομάζας και το χρησιμοποιούμενο σύστημα εξαγωγής (μηχανικής εκχύλισης).

Παραδοσιακή μέθοδος πίεσης

Η εξαγωγή του ελαιόλαδου με χρήση υδραυλικής πρέσας (υδραυλικό πιεστήριο) είναι η παλαιότερη μέθοδος ανάκτησης αυτού. Η ελαιοζύμη που προκύπτει μετά τη σύνθλιψη απλώνεται σε ομοίμορφο στρώμα πάνω σε φίλτροπανα ή δίσκους, που τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο. Η πίεση που εφαρμόζεται επί των φίλτροπανων (ή δίσκων) συμπιέζει τη στερεή φάση της ελαιοζύμης και διαχωρίζει την υγρή φάση του ελαίου (μικρές ποσότητες αιωρούμενων συστατικών και νερού), η οποία διηθείται ακολούθως, προκειμένου να παραληφθεί το ελαιόλαδο (Σχήμα 2) (Boskou, 2011). Εκτός από το κύριο προϊόν που είναι το ελαιόλαδο, παράγονται παράλληλα το στερεό παραπροϊόν, γνωστό ως ελαιοπυρήνας και ποικίλουςες ποσότητες υγρών αποβλήτων. Αυτή η τεχνική αντικαταστάθηκε πρώτα από ένα σύστημα φυγοκεντρικών διαχωριστήρων τριών φάσεων και, πιο πρόσφατα, από ένα σύστημα δύο φάσεων.

Συνεχές φυγοκεντρικό σύστημα 3-φάσεων

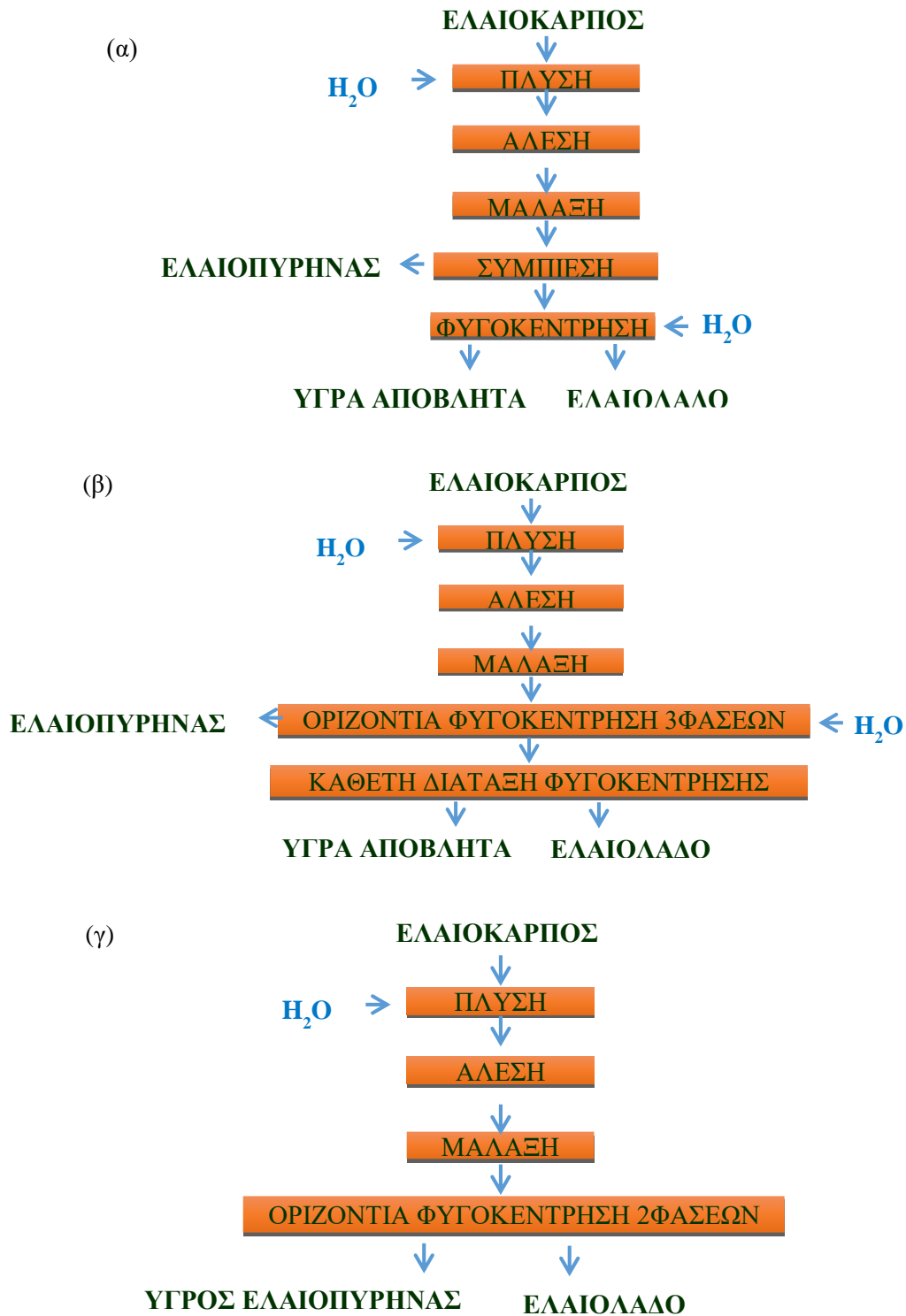
Η τριφασική διαδικασία (Σχήμα 2) συνιστά μία συνεχή διαδικασία (continuous process), η οποία έχει αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο εξαγωγής του ελαιόλαδου. Η ελαιοζύμη που προκύπτει μετά την άλεση και τη μάλαξη, αναμιγνύεται με νερό για τη βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων της πριν την εισαγωγή της σε οριζόντιους τριφασικούς φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες, γνωστούς ως decanters. Η αναλογία νερού ελαιοζύμης δεν είναι σταθερή και εξαρτάται από τη σύσταση της ελαιοζύμης μετά τη μάλαξη. Τα τριφασικά συστήματα καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες (πόσιμο) νερού κατά τη διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου. Από τη διαδικασία προκύπτουν ως προϊόν το ελαιόλαδο, και ως παραπροϊόν ο ελαιοπυρήνας καθώς και τα υγρά απόβλητα (απόνερα).

Συνεχές φυγοκεντρικό σύστημα 2-φάσεων

Το διφασικό σύστημα (Σχήμα 2) χρησιμοποιεί, ένα φυγοκεντρικό σύστημα, το οποίο διαχωρίζει την ελαιοζύμη, μετά την άλεση και τη μάλαξή της, με αραιώση με μικρότερες ποσότητες νερού από ότι στα τριφασικά συστήματα. Από τη διαδικασία προκύπτουν ως προϊόν το ελαιόλαδο και ως παραπροϊόν ο υγρός ελαιοπυρήνας.

Όλες οι διεργασίες περιλαμβάνουν το στάδιο διαύγασης του ελαιόλαδου, όπου το έλαιο καθαρίζεται από τα στερεά και αιωρούμενα σωματίδια και το νερό που έχουν απομείνει από

τα προηγούμενα στάδια της επεξεργασίας. Στα σύγχρονα ελαιουργεία, ο τελικός διαχωρισμός γίνεται με χρήση κάθετων διαχωριστήρων.



Σχήμα 2. Διάγραμμα της ‘παραγωγής’ ελαιοπυρήνα από τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου ανάλογα με χρήση: συστήματος πίεσης (α), φυγοκεντρικού συστήματος τριών φάσεων (β) και φυγοκεντρικού συστήματος δύο φάσεων (γ)

Οι τρεις διαφορετικές διαδικασίες εξαγωγής του ελαιόλαδου που περιγράφηκαν παραπάνω (παραδοσιακή, φυγοκέντρωση 3 και 2 φάσεων) διαφέρουν ως προς την ποσότητα αλλά και τη σύσταση του ελαιοπυρήνα που παράγουν.

Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί, παρουσιάζονται αναλυτικά τα διάφορα ισοζύγια μάζας που προκύπτουν για τις τρεις διαδικασίες παραγωγής ελαιόλαδου. Ειδικότερα, στα παραδοσιακά συστήματα πίεσης 1000 kg ελαιόκαρπου παράγουν 200 kg ελαιόλαδου, 400-600 kg ελαιοπυρήνα και 400-600 kg υγρών αποβλήτων. Η διαδικασία αυτή είναι φθηνή και τεχνικά απλή (Di Gionacchino, Sestili, & Di Vincenzo, 2002). Με τη χρήση πιεστηρίων παράγεται ελαιόλαδο καλής ποιότητας, όταν ο καρπός είναι σε καλή κατάσταση και τα φίλτρόπανα καθαρίζονται σωστά. Τα βασικά μειονεκτήματα της διαδικασίας αυτής είναι η ασυνεχής λειτουργία (batch type process) και το υψηλό εργατικό κόστος της.

Στα τριφασικά συστήματα αντίστοιχα η επεξεργασία 1000 kg ελαιόκαρπου αποδίδει 200 kg ελαιόλαδο, 500-600 kg ελαιοπυρήνα και 1000-1200 kg υγρά απόβλητα (Alburquerque, González, García, & Cegarra, 2004). Τα κύρια πλεονεκτήματα της τριφασικής διαδικασίας είναι ότι πρόκειται για μία πλήρως αυτοματοποιημένη συνεχή διαδικασία (continuous process) που έχει αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο και ότι από αυτήν προκύπτει ελαιοπυρήνας που έχει υψηλή εμπορική αξία με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, σε ποσοστό 45-55%. Παρουσιάζει όμως και σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η υψηλή κατανάλωση νερού και ενέργειας, η παραγωγή μεγάλης ποσότητας υγρών αποβλήτων, η έκπλυση (απώλεια) σημαντικών βιοδραστικών ουσιών που είναι ευεργετικές για την ποιότητα του ελαιόλαδου, όπως οι φαινόλες, λόγω της μεγάλης προσθήκης νερού, και το υψηλό κόστος εγκατάστασης (Roig, Cayuela, & Sánchez-Monedero, 2006, Rahmanian, Jafari, & Galanakis, 2014).

Στα διφασικά συστήματα τέλος, η επεξεργασία 1000 kg ελαιόκαρπου αποδίδει 200 kg ελαιόλαδο και 800-900 kg διφασικού (υγρού) ελαιοπυρήνα (Zbakh & El Abbassi, 2012). Το σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η οικονομία στην κατανάλωση νερού, η καλύτερη ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου που είναι πιο πλούσιο σε πολυφαινόλες, το μικρότερο κόστος λειτουργίας λόγω μικρότερης κατανάλωσης ενέργειας και νερού και η παραγωγή μικρών ποσοτήτων υγρών αποβλήτων στο στάδιο της παραλαβής του ελαιόλαδου. Ωστόσο, παρουσιάζει και μειονεκτήματα, όπως ο χαμηλής ποιότητας και εμπορικής αξίας διφασικός ελαιοπυρήνας που προκύπτει λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε υγρασία (65-75%), μεταφέροντας το πρόβλημα στα πυρηνελαιουργεία, με αποτέλεσμα να χρειάζεται μεγαλύτερο ενεργειακό κόστος για την περαιτέρω επεξεργασία του (ξήρανση και εκχύλιση ελαίου). Μολονότι το τριφασικό σύστημα δημιουργεί το μεγαλύτερο πρόβλημα από άποψη παραγωγής υγρών αποβλήτων, εξακολουθεί να είναι αυτό που εφαρμόζεται ευρέως στις κύριες ελαιοπαραγωγές χώρες (Dermeche, Nadour, Larroche, Moulti-mati, & Michaud, 2013).

Πίνακας 1. Ελαιοπυρήνας (παραπροϊόν) από τα διάφορα συστήματα παραγωγής ελαιόλαδου - Ισοζύγια μάζας

Μέθοδος	ΕΙΣΟΔΟΣ		ΕΞΟΔΟΣ	
	Εισαγωγή	Ποσότητα	Παραγωγή	Ποσότητα
Πίεση	Ελιές	1 t	Ελαιόλαδο	200 kg
	Νερό	100-120 L	Ελαιοπυρήνας (~26% νερό)	400-600 kg
	<i>Ενέργεια</i>	<i>40-160 kWh</i>	Υγρά απόβλητα (88% νερό)	400-600 L
Φυγοκέντρωση 3- φάσεων	Ελιές	1 t	Ελαιόλαδο	200 kg
	Νερό	100-120 L	Ελαιοπυρήνας (~40% νερό)	500-600 kg
	Νερό	700-1000 L	Υγρά απόβλητα (94% νερό, 1% έλαιο)	1000-1200 L
	<i>Ενέργεια</i>	<i>90-117 kWh</i>		
Φυγοκέντρωση 2- φάσεων	Ελιές	1 t	Ελαιόλαδο	200 kg
	Νερό	100-120 L	Ελαιοπυρήνας (~60% νερό)	800 kg
	<i>Ενέργεια</i>	<i><90-117 kWh</i>		

1.2 Στερεό παραπροϊόν παραγωγής ελαιόλαδου (ελαιοπυρήνας) - Υγρά απόβλητα

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά παραπάνω, κατά την παραγωγή ελαιόλαδου στα ελαιοτριβεία προκύπτει ταυτόχρονα ένα στερεό παραπροϊόν, ο ελαιοπυρήνας ο οποίος επιδέχεται περαιτέρω επεξεργασία προς την αξιοποίησή του. Ο ελαιοπυρήνας αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη πηγή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών υψηλής αξίας με ενδεχόμενη χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά σε τρόφιμα, όπως και σε καλλυντικά ή και σε διάφορες φαρμακευτικές εφαρμογές

(Rodríguez et al., 2008, Lesage-Meessen et al., 2001). Για το λόγο αυτό, η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και κρίνεται ως αναγκαία. Στις επόμενες υποενότητες, θα ακολουθήσει λεπτομερής περιγραφή της σύστασης και της επεξεργασίας του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση και παραλαβή του πυρηνέλαιου και των βιοδραστικών του συστατικών.

Όσον αφορά τα υγρά απόβλητα (Σχήμα 3), γνωστά και ως κατσίγαρος ή λιόζουμα, προκύπτουν κυρίως από τα παραδοσιακά ή τα τριφασικά ελαιοτριβεία. Ο συνολικός όγκος υγρών αποβλήτων και στους δύο τύπους ελαιοτριβείων αποτελείται από το υγρό κλάσμα του χυμού του ελαιόκαρπου και του νερού που προστίθεται κυρίως στην πλύση του καρπού και κατά τη φυγοκέντρηση σε οριζόντιο τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα. Συνολικά, εκτιμάται ότι παράγονται περίπου 4,6 εκατομμύρια τόνοι υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων ετησίως σε ευρωπαϊκό επίπεδο, το 80-83% των οποίων είναι νερό (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012). Οι οργανικές ουσίες περιέχονται στα απόβλητα (κυρίως φαινολικά συστατικά, χρωστικές και χλωροφύλλες) σε ποσοστό 15-18%, ενώ τα ανόργανα συστατικά (όπως τα άλατα καλίου και τα φωσφορικά άλατα) σε ποσοστό 2% αντίστοιχα (Notarnicola, Tassielu, Martino, & Nicoletti, 2004, Federici, Fava, Kalogerakis, & Mantzavinos, 2009). Το περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων σε φαινολικά συστατικά είναι αρκετά υψηλό (0,5-24 g/L), καθώς μόνο το 1-2% της συνολικής περιεκτικότητας των ελαιόκαρπων σε φαινόλες περνά στο ελαιόλαδο ενώ τα υπόλοιπα 53% και 45% παραμένουν στα υγρά απόβλητα και στον ελαιοπυρήνα, αντίστοιχα (Leouifoudi, Harnafi, & Ziad, 2015, Kalogerakis, Politi, Foteinis, Chatzisytheon, & Mantzavinos, 2013). Το ρυπαντικό φορτίο των ελαιοτριβείων υπολογίζεται για το BOD5 (βιολογικός απαιτούμενο οξυγόνο σε 5 ημέρες) και το COD (χημικός απαιτούμενο οξυγόνο) ότι είναι της τάξης των 20 και 35 g/L, αντίστοιχα (Notarnicola et al., 2004).



Σχήμα 3. Στερεό παραπροϊόν (ελαιοπυρήνας) και υγρά απόβλητα από τη διαδικασίας παραγωγής ελαιόλαδου από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρησης

1.2.1 Σύσταση του ελαιοπυρήνα

Το κύριο στερεό παραπροϊόν που προκύπτει από το σύστημα πίεσης, ή από τα τριφασικά και διφασικά συστήματα φυγοκεντρικής εξαγωγής του ελαιόλαδου είναι ο ελαιοπυρήνας. Ο ελαιοπυρήνας αποτελείται από σάρκα (21-33% w/w), πυρήνα (κουκούτσι) (42-54% w/w) και φλοιό ελιάς (10-11% w/w). Από άποψη σύστασης, ο ελαιοπυρήνας περιέχει έλαιο (~9% w/w) και υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, η τιμή της οποίας ποικίλει εξαρτώμενη από το σύστημα εξαγωγής του ελαιόλαδου [σύστημα πίεσης: 25-30% w/w, σύστημα φυγοκέντρωσης τριών φάσεων: 45% w/w και φυγοκέντρωσης δύο φάσεων: 70% w/w] (Elsa Uribe et al., 2012). Επίσης, περιέχει λιγνίνη, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη, υδατοδιαλυτούς υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη και έλαια, όπως και ανόργανα και φαινολικά συστατικά (Alburquerque et al., 2004) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Σύσταση του ελαιοπυρήνα ανάλογα με το σύστημα εξαγωγής του ελαιόλαδου (πηγή: Dermeche et al. 2013)

Χαρακτηριστικό	Σύστημα Πίεσης	Σύστημα Φυγοκέντρωσης 3-φάσεων	Σύστημα Φυγοκέντρωσης 2-φάσεων
<u>Σύνθεση</u>			
Πούλπα (σάρκα και φλοιός) (%)	11-25	12-35	10-15
Πυρήνες (κουκούτσια) (%)	40-65	15-45	12-18
<u>Χημική σύσταση (%)</u>			
Υγρασία	25-30	40-50	65-75
Λίπη και έλαια	6-9	3-7	2-5
Ολικές πρωτεΐνες	4,77-6,85	3,43-7,26	2,87-7,2
Ολικό άζωτο	0,71	0,2-0,3	0,25-1,85
Ολικοί υδατάνθρακες	1,38-2,12	0,99-1,38	0,83-1,93
Κυτταρίνη	24,1	17,37-24,14	14,54
Ημικυτταρίνη	11,1	7,92-11,00	6,63
Λιγνίνη	14,1	0,21-10,21	8,54
Τέφρα	2,36	1,7-4	1,42-4
Ολικός άνθρακας	42,9-43,2	29,03-42,9	25,37
Ασβέστιο ως CaO	0,61	0,44	0,37
Φωσφόρος ως P ₂ O ₅	0,07	0,05	0,04
Κάλιο ως K ₂ O	0,54	0,39	0,32
Ολικές φαινόλες	0,63-1,14	0,2-1,146	0,4-2,43

1.2.2 Αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα - Επεξεργασία για παραλαβή ελαίου

Η επεξεργασία του ελαιοπυρήνα που προκύπτει από τα ελαιοτριβεία πραγματοποιείται συμβατικά σε βιομηχανικές μονάδες (εκχυλιστήρια), τα πυρηνελαιουργεία. Οι μονάδες αυτές χρησιμοποιούν ποσότητες ελαιοπυρήνα από πολλά ελαιοτριβεία με σκοπό την εξαγωγή πυρηνέλαιου, ενώ παράλληλα προκύπτει ως παραπροϊόν το πυρηνόξυλο. Η βασική διεργασία είναι η εκχύλιση του πυρηνέλαιου με χρήση εξανίου, πλην όμως απαιτείται προκατεργασία του ελαιοπυρήνα που περιλαμβάνει ξήρανση με θέρμανση, άλεση ή/και εμπλουτισμό του. Έπειτα από την εκχύλιση, το πυρηνέλαιο ανακτάται μετά από απόσταξη του ελαιοδιαλύματος και την απομάκρυνση του εξανίου.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, οι κυριότερες διαφορές μεταξύ των ελαιοπυρήνων που προέρχονται από διαφορετικά συστήματα παραγωγής του ελαιόλαδου οφείλονται κυρίως στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε υγρασία. Αυτό οδηγεί στην εξασφάλιση ορισμένων απαιτήσεων πριν την εκχύλιση του ελαίου, όπως η άμεση μεταφορά στα πυρηνελαιουργεία, η αποθήκευση και η ξήρανση του ελαιοπυρήνα ανάλογα με την περίπτωση.

1.2.2.1 Αποθήκευση

Τα πυρηνελαιουργεία παραλαμβάνουν τον ελαιοπυρήνα, ο οποίος αποθηκεύεται και παραμένει για χρονικό διάστημα ανάλογα με τη δυναμικότητα του εκχυλιστήρα. Ο ελαιοπυρήνας που προκύπτει από διφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης αποθηκεύεται σε στεγανές δεξαμενές, λόγω της υψηλής υγρασίας του υλικού. Σε κάθε περίπτωση, η ποιότητα και η απόδοση σε πυρηνέλαιο που λαμβάνεται επηρεάζεται σημαντικά λόγω υδρολυτικών και οξειδωτικών μεταβολών του ελαίου (ενζυμικής, μικροβιακής ή χημικής προέλευσης) που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του ελαιοπυρήνα μέχρι την επεξεργασία του (Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006).

1.2.2.2 Ξήρανση

Η φάση της ξήρανσης είναι απαραίτητη πριν την εκχύλιση του ελαιοπυρήνα με εξάνιο, που είναι μη αναμίξιμο με το νερό. Αυτό το στάδιο απαιτεί αρκετή ενέργεια και σχεδιάζεται με στόχο την αριστοποίηση των παραμέτρων του χρόνου και της θερμοκρασίας ξήρανσης, ώστε να διασφαλίζεται η διατήρηση της ποιότητας του πυρηνέλαιου (Akgun & Doymaz, 2005, Freire, Figueiredo, & Ferrão, 2001, Göğüs & Maskan, 2001).

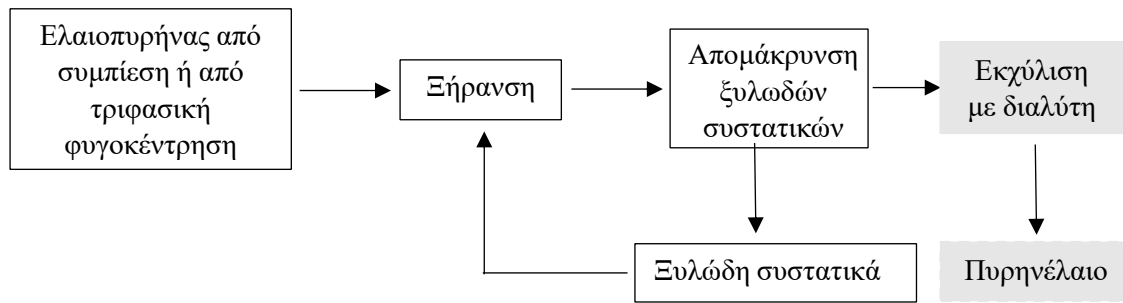
Η διεργασία της ξήρανσης γίνεται σε ξηραντήρα περιστρεφόμενου τυμπάνου (Σχήμα 4). Η ταχύτητα περιστροφής του κυλίνδρου εξαρτάται από το μέγεθός του, ενώ στο εσωτερικό του μία σειρά από λεπίδες εξασφαλίζουν την επαφή του ελαιοπυρήνα με τη θερμαινόμενη επιφάνεια, η οποία εξασφαλίζεται μέσω της διαβίβασης θερμών αέριων μαζών. Το περιεχόμενο νερό στον ελαιοπυρήνα εξατμίζεται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που αναπτύσσεται (~250°C) και η διαδικασία διαρκεί έως ότου το τελικό περιεχόμενο υγρασίας στο ξηραμένο υλικό να φτάσει στο ~ 8%. Ο ξηρός πλέον ελαιοπυρήνας οδηγείται προς τον εκχυλιστήρα με τη βοήθεια μεταφορικού κοχλίου. Οι θερμές αέριες μάζες μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές, όπως από την καύση του ίδιου του πυρηνόξυλου ή από φυσικό αέριο. Στο τέλος του ξηραντήρα, ο ατμός και τα αέρια της ξήρανσης πριν την εκπομπή τους στην ατμόσφαιρα περνούν από κυκλώνες για απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων (Espínola-Lozano, 2003, Arjona, Ollero, & Vidal, 2005, Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006).



Σχήμα 4. Ξηραντήρας ελαιοπυρήνα σε πυρηνελαιουργείο

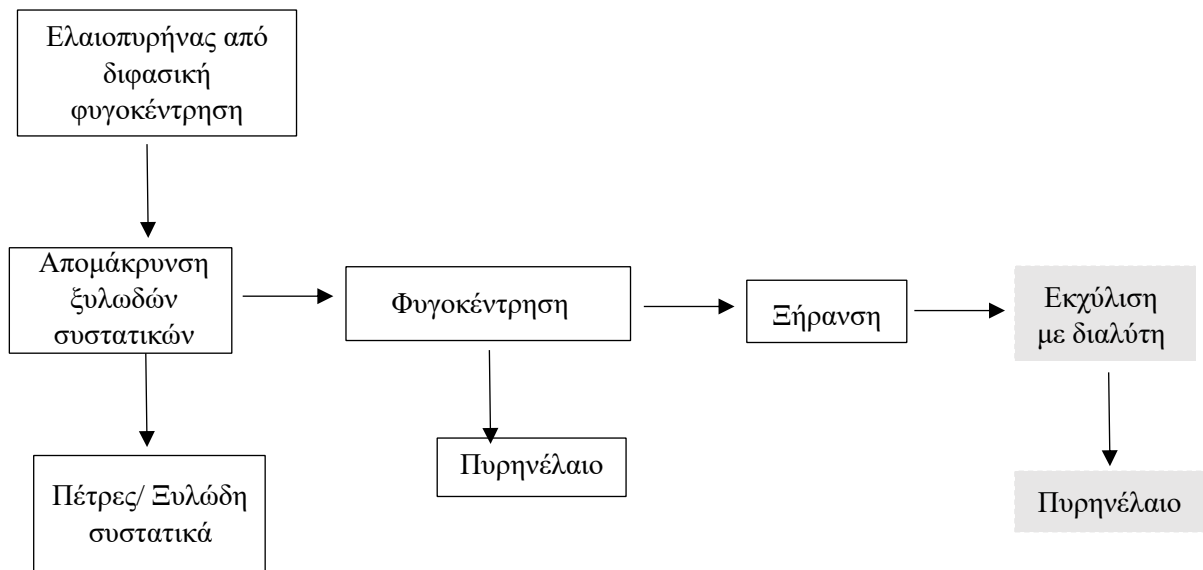
Ανάλογα με το ποσοστό υγρασίας του προς ξήρανση ελαιοπυρήνα, επιλέγονται διαφορετικές διαδικασίες ξήρανσης. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι ξήρανσης που εφαρμόζονται (León-Camacho, Viera-Alcaide, & Ruiz-Méndez, 2003). Η *άμεση ξήρανση σε ένα στάδιο*, η οποία είναι ιδανική για την ξήρανση ελαιοπυρήνα που προέρχεται από τριφασικό ή διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης. Η *άμεση ξήρανση σε δύο στάδια*, η οποία είναι ιδανική για ελαιοπυρήνα που προέρχεται από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρησης, ο οποίος πρόκειται να ξηραθεί σε χαμηλά επίπεδα θερμοκρασίας, προκειμένου να διατηρηθεί η ποιότητα του πυρηνέλαιου που θα παραληφθεί με εκχύλιση. Επίσης, είναι κατάλληλη για ελαιοπυρήνα από διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης, όπου κατά το πρώτο στάδιο ξήρανσης η υγρασία του μειώνεται κάτω από το 50% και στο δεύτερο στάδιο σε περίπου 10%, όπως απαιτείται για την εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Τέλος, η *άμεση ξήρανση σε ένα στάδιο με επανακυκλοφορία* του αποξηραμένου ελαιοπυρήνα και ανάμιξη, η οποία είναι χρήσιμη για ελαιοπυρήνα από διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης, όπου μέρος του αποξηραμένου ελαιοπυρήνα που εξάγεται από τον ξηραντήρα ανακυκλώνεται και αναμιγνύεται με υγρό ελαιοπυρήνα.

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται η προκατεργασία (ξήρανση-εμπλουτισμός) του ελαιοπυρήνα προερχόμενου από πίεση ή από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρησης, όπου γίνεται η απομάκρυνση των ξυλωδών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα αμέσως μετά την ξήρανση με χρήση αέριου κυκλώνα που διαχωρίζει τα υλικά με βάση το ειδικό βάρος, ώστε να εμπλουτιστεί ο ξηρός ελαιοπυρήνας και να αυξηθεί η απόδοση της μονάδας παραγωγής πυρηνέλαιου.



Σχήμα 5. Διάγραμμα ροής παραγωγής πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από πίεση ή από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η προκατεργασία του ελαιοπυρήνα που προκύπτει από διφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης, προκειμένου να ληφθεί έλαιο με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Στην περίπτωση αυτή η απομάκρυνση των ξυλώδων συστατικών διαφέρει καθώς γίνεται πριν από την ξήρανση σε μύλους που διαθέτουν φίλτρα με μέγεθος πόρων περίπου 3 mm. Επιπλέον, μία ποσότητα ελαίου, που αντιστοιχεί στο 40-60% του περιεχόμενου στον ελαιοπυρήνα ελαίου, είναι ανακτήσιμη με φυγοκέντρωση πριν την ξήρανσή του, η οποία πραγματοποιείται περίπου στους 40 °C και το πυρηνέλαιο που προκύπτει έτσι είναι γνωστό ως "έλαιο δεύτερης φυγοκέντρωσης" (Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006).



Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής παραγωγής πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από διφασικό σύστημα φυγοκέντρωσης

1.2.2.3 Επίδραση της ξήρανσης στα συστατικά του πυρηνέλαιου

Οι λειτουργικές παράμετροι της ξήρανσης, όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος ξήρανσης του ελαιοπυρήνα πρέπει να ελέγχονται στη βιομηχανία. Συνήθως, χρησιμοποιούνται σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες αέρα, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη προστασία του ελαίου και των βιοδραστικών συστατικών έναντι της υποβάθμισής τους κατά την ξήρανση. Ωστόσο, η ξήρανση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μία αργή διαδικασία που απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα εφαρμογής, κατά το οποίο μπορεί να διασπαστούν οι βιοδραστικές ενώσεις, αλλοιώνοντας έτσι την ποιότητα του παραγόμενου πυρηνέλαιου (Fennell, Light, Sparg, Stafford, & Van Staden, 2004). Για αυτό το λόγο, ορισμένες μελέτες συνιστούν για την ξήρανση του ελαιοπυρήνα τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών για σύντομο χρονικό διάστημα (Göğüş & Maskan, 2006). Οι υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν την κινητική της ξήρανσης, η οποία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγικότητας σε βιομηχανική κλίμακα (Ahmad-qasem et al., 2013), αλλά ταυτόχρονα απαιτεί τη χρήση μεγάλων ποσών ενέργειας ενώ μπορεί να προάγει την οξειδωτική υποβάθμιση των συστατικών του (Gomes & Caponio, 1997).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ελαιοπυρήνας ξηραίνεται με θερμό αέρα (θερμοκρασία εισόδου: 250 °C και θερμοκρασία εξόδου: 70-90 °C περίπου). Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προωθήσει και το βαθμό οξείδωσης του πυρηνέλαιου. Συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο μέρος της οξείδωσης λαμβάνει χώρα ενδεχομένως κατά τη διάρκεια της ξήρανσης του ελαιοπυρήνα, όπου η αύξηση της θερμοκρασίας από 70 στους 150 °C οδηγεί σε πυρηνέλαιο με αυξημένη περιεκτικότητα σε οξειδωμένα τριγλυκερίδια (περίπου κατά 35%), σε ολιγομερή τριγλυκερίδια (περίπου κατά 45%) και σε τιμές οξύτητας αντίστοιχα που κυμαίνονται από 6 έως 11 % εκφραζόμενες σε ελαϊκό οξύ. Περαιτέρω, ο αριθμός υπεροξειδίων του πυρηνέλαιου φαινομενικά φαίνεται να αυξομειώνεται, ενώ ο δείκτης K232 και ο αριθμός ανισιδίνης (p-AV) παρουσιάζουν σημαντική αύξηση που μπορεί να αποδοθεί στην διάσπαση των υπεροξειδίων και το σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης (Gomes & Caponio, 1997).

Γενικότερα, ο ελαιοπυρήνας είναι ευαίσθητος σε αλλοιώσεις, καθώς παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ενζυμικών και μικροβιακών δραστηριοτήτων και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν χρησιμοποιείται ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Η ξήρανση σταθεροποιεί την πρώτη ύλη κατά την αποθήκευσή της και περιορίζει ορισμένες αντιδράσεις υποβάθμισης, αλλά μπορεί να επηρεάσει το βιοδραστικό δυναμικό του πυρηνέλαιου μεταβάλλοντας την ολική περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά (Total Phenolic Content - TPC) όπως και την αντιοξειδωτική ικανότητα του πυρηνέλαιου (Ahmad-qasem et al., 2013, Que, Mao, Fang, & Wu, 2008). Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την ξήρανση και ο χρόνος έκθεσης του ελαιοπυρήνα μπορεί επίσης να επηρεάσει τα φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου (Erbay & Icier, 2009). Δεν συνιστάται η ξήρανση του ελαιοπυρήνα να υπερβαίνει τα 30 min στους 150 °C (Ahmad-qasem et al., 2013). Με βάση τη βιβλιογραφία, μπορεί να

θεωρηθεί ότι υπάρχει μία θερμοκρασία ως κατώτατο όριο από το οποίο και μετά ο χρόνος ξήρανσης αυξάνει την περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Αυτή η συμπεριφορά θα μπορούσε να εξηγηθεί θεωρώντας ότι οι υψηλές θερμοκρασίες προάγουν την αδρανοποίηση οξειδωτικών ενζύμων (Sanjuán et al. 2000), αποφεύγοντας την υποβάθμιση των αντιοξειδωτικών ενώσεων στο στάδιο της εκχύλισης. Επιπλέον, σε υψηλές θερμοκρασίες, ο σχηματισμός μελανοϊδινών που προκύπτουν από αντιδράσεις Maillard μπορεί να έχουν κάποιο βαθμό αντιοξειδωτικής δράσης, που ενδεχομένως να ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πυρηνέλαιου (Que et al., 2008).

1.2.2.4 Άλεση

Μετά τη διεργασία της ξήρανσης, απαιτείται περαιτέρω προκατεργασία του ελαιοπυρήνα για μεγιστοποίηση της απόδοσης της εκχύλισης που περιλαμβάνει το στάδιο της άλεσης. Η άλεση του ελαιοπυρήνα έχει ως σκοπό να αυξήσει τη διείδυση του διαλύτη στο στερεό υλικό, διευκολύνοντας επομένως την εκχύλιση του πυρηνέλαιου. Ωστόσο, η άλεση του ελαιοπυρήνα με υψηλή περιεκτικότητα σε έλαιο πραγματοποιείται δύσκολα.

1.2.2.5 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη επιτυγχάνεται σε τρεις φάσεις: παρασκευή του λιπαρού πολτού και, εκχύλιση με εξάνιο, ανάκτηση του ελαίου με απόσταξη του ελαιοδιαλύματος (miscella) και απομάκρυνση του διαλύτη (desolventising) από τον εκχυλισμένο ελαιοπυρήνα (Ortega, Palomar, Mata, Cruz, & Montoro, 2001). Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του ελαιοπυρήνα είναι το η-εξάνιο. Τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι η εκλεκτικότητα, η απόδοση εκχύλισης, η αμελητέα επίδραση στην ποιότητα του ελαίου, οι φυσικές του ιδιότητες (λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης, σημείο ζέσεως: 60 °C) και οι χημικές του ιδιότητες (ήπια διαβρωτική δράση για τον εξοπλισμό).

Η εκχύλιση του πυρηνέλαιου με χρήση οργανικού διαλύτη μπορεί να επιτευχθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους εκχυλιστήρων: τους ασυνεχείς, τους ημι-συνεχείς και τους συνεχείς εκχυλιστήρες.

Ασυνεχείς εκχυλιστήρες

Οι ασυνεχείς εκχυλιστήρες διαθέτουν βασικό εξοπλισμό, όπου τόσο η εκχύλιση όσο και η απόσταξη του ελαιοδιαλύματος (miscella) πραγματοποιείται με ασυνεχή τρόπο. Αυτός ο τύπος εκχύλισης δεν χρησιμοποιείται πλέον για οικονομικούς και τεχνικούς λόγους.

Ημι-συνεχείς εκχυλιστήρες

Αυτό το σύστημα είναι το πιο διαδεδομένο για την παραλαβή πυρηνέλαιου. Στην περίπτωση αυτή, γίνεται εκχύλιση μέσω του βαθμιαίου εμπλουτισμού του ελαιοδιαλύματος (miscella),

χρησιμοποιώντας ένα σύστημα εκχυλιστήρων με πολλές βαθμίδες. Το σύστημα περιλαμβάνει μία σειρά κυλινδρικών εκχυλιστήρων που διαθέτουν ακροφύσια φόρτωσης και εκφόρτωσης, παροχές εισόδου εξάνιου ή ελαιοδιαλύματος, εισόδου ατμού για την απομάκρυνση του διαλύτη και εξόδου αέρα. Οι εκχυλιστήρες αυτού του τύπου φορτώνονται με τον ελαιοπυρήνα μέσω χοάνης και φρέσκος διαλύτης εισάγεται στη βαθμίδα του εκχυλιστήρα, όπου το στερεό έχει αποστραγγιστεί από έλαιο, ρέοντας μέσα από τις διάφορες βαθμίδες και αφήνοντας το σύστημα μέσω της πιο πρόσφατα γεμισμένης βαθμίδας (αντροπή διαλύτη-στερεού υλικού). Ο εξαντλημένος από έλαιο ελαιοπυρήνας εκφορτώνεται μέσω μηχανικής πίεσης και ακολουθεί απομάκρυνση των υπολειμμάτων του διαλύτη, ενώ η παραλαβή του ελαίου επιτυγχάνεται μετά από διαδικασία απόσταξης του ελαιοδιαλύματος. Η λειτουργία του συστήματος αυτού λόγω της ύπαρξης πολλών εκχυλιστήρων είναι παρόμοια με αυτή μίας μονάδας συνεχούς εκχύλισης, καθώς όταν ο ένας εκχυλιστήρας γεμίζει με φρέσκο ελαιοπυρήνα, άλλοι βρίσκονται στο στάδιο της εκχύλισης με εξάνιο ή εμπλουτίζονται με ελαιοδιάλυμα, ενώ κάποιοι είναι στη διαδικασία απομάκρυνσης του διαλύτη και εκφόρτωσης του ελαιοπυρήνα.

Συνεχείς εκχυλιστήρες

Στο σύστημα αυτό, η βασική λειτουργία της εκχύλισης πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών βαθμίδων εκχυλιστήρων με αντίθετη ροή στερεού-υγρού. Ο ελαιοπυρήνας εισάγεται από τη μία πλευρά της εισόδου και ο διαλύτης από την άλλη πλευρά της εξόδου του συστήματος. Το στερεό σταδιακά εξαντλείται από το λιπαρό του περιεχόμενο από το πρώτο προς το τελικό στάδιο της εκχύλισης, ενώ το ελαιοδιάλυμα εμπλουτίζεται βαθμιαία από το τελευταίο προς το πρώτο στάδιο. Οι πιο διαδεδομένοι εκχυλιστήρες είναι αυτοί με συνεχή κινητή στοιβάδα (στερεή φάση) (immersion) και οι εκχυλιστήρες διήθησης (percolation). Οι πιο γνωστοί εκχυλιστήρες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση του πυρηνέλαιου είναι οι εξής: ο εκχυλιστήρας Belt - DeSmet, ο εκχυλιστήρας Rotocel, ο εκχυλιστήρας Bollman - Lurgi, και ο εκχυλιστήρας Bonotto (Σχήμα 7).

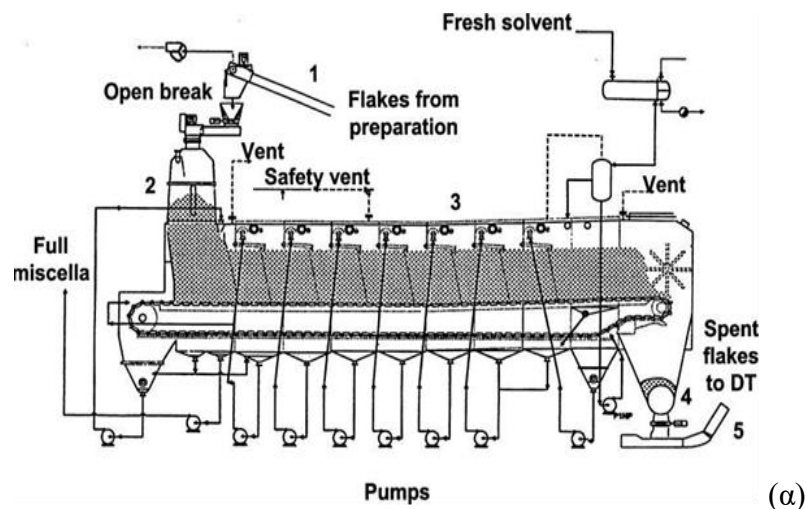
Ο εκχυλιστήρας Belt - DeSmet είναι ένα συνεχές σύστημα που έχει προσφάτως αναπτυχθεί, όπου ο ελαιούχος σπόρος τροφοδοτείται συνεχώς μέσω χοάνης και ρέει στο διάτρητο μίαντα του εκχυλιστήρα που κινείται αργά σχηματίζοντας πάνω σε αυτόν ένα παχύ στρώμα. Φρέσκος διαλύτης ψεκάζεται στο σπόρο στο τμήμα που βρίσκεται κοντά στο άκρο εκφόρτωσης και το εκχύλισμα συλλέγεται στο κάτω μέρος αυτού του τμήματος.

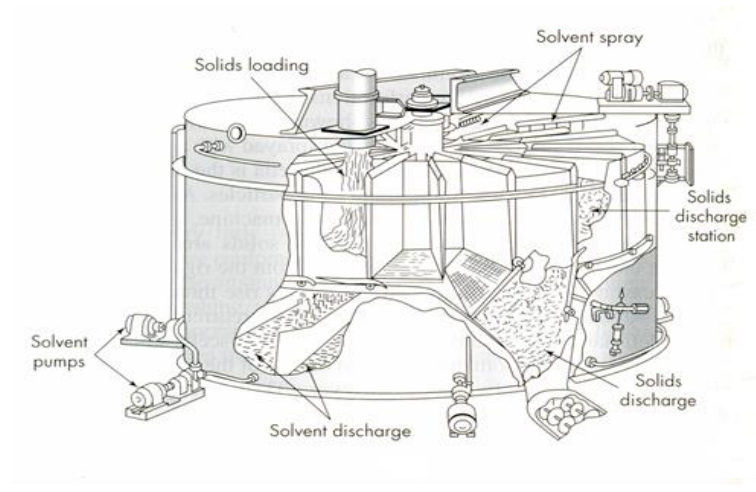
Ο εκχυλιστήρας Rotocel είναι ένα σύστημα διήθησης που επιτυγχάνει εκχύλιση του ελαιούχου σπόρου με αντίθετη ροή μέσω μίας σειράς ανάμιξης στερεού-υγρού. Αποτελείται από ένα ρότορα χωρισμένο σε 'κυψέλες' ο οποίος επιτρέπει τη συνεχή εισαγωγή και την απομάκρυνση του στερεού. Κάθε 'κυψέλη' περνά κάτω από μία ειδική συσκευή τροφοδοσίας του σπόρου και κάτω από μία σειρά ψεκαστήρων του διαλύτη, καθώς ο ρότορας περιστρέφεται. Το

ελαιοδιάλυμα μεταφέρεται από τη μία κυψέλη στην άλλη με αντίθετη ροή ως προς τη ροή της πρώτης ύλης και εμπλουτίζεται συνεχώς με έλαιο που εκχυλίζεται. Στο τέλος, το ελαιοδιάλυμα διηθείται σε κάθε κυψέλη.

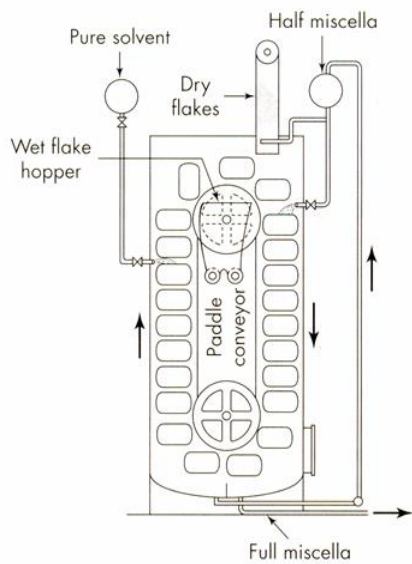
Ο εκχυλιστήρας Bollman είναι ένας εκχυλιστήρας συνεχούς κινούμενου στρώματος τύπου διάτρητου καλαθιού. Ο ελαιούχος σπόρος φορτώνεται σε καλάθια προσαρμοσμένα σε ένα μεταφορέα αλυσίδας, ψεκάζεται με το ελαιοδιάλυμα και η διαδικασία της εκχύλισης με διήθηση του διαλύτη μέσω του σπόρου αρχίζει καθώς τα καλάθια κινούνται προς τα κάτω. Το ελαιοδιάλυμα συλλέγεται στο κάτω μέρος του συστήματος.

Ο εκχυλιστήρας Bonotto είναι ένας σύστημα εκχύλισης που αποτελείται από ένα υψηλό κυλινδρικό δοχείο με μία σειρά από αργά περιστρεφόμενες οριζόντιες πλάκες και χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του ελαιούχου σπόρου με τη μέθοδο εμβάπτισης με αντίθετη ροή στερεού/υγρού. Το στερεό τροφοδοτείται συνεχώς στην κορυφή της στήλης και πέφτει διαδοχικά από ένα άνοιγμα σε κάθε πλάκα. Ο διαλύτης εισάγεται στον πυθμένα της στήλης και ρέει προς τα πάνω. Το ελαιοδιάλυμα εγκαταλείπει τη στήλη από την κορυφή.

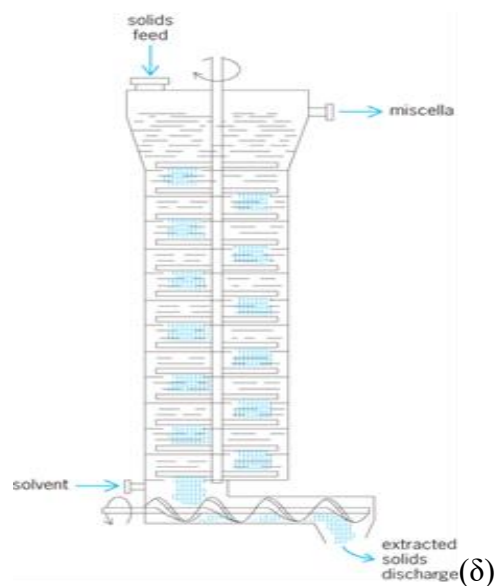




(β)



(γ)



(δ)

Σχήμα 7. Εκχυλιστήρες (α) Belt - De Smet, (β) Rotocel, (γ) Bollman - Lurgi, και (δ) Bonotto

1.2.2.6 Παραλαβή πυρηνέλαιου και ανάκτηση εξανίου

Για να παραληφθεί το πυρηνέλαιο από το ελαιοδιάλυμα απαιτείται η απομάκρυνση του εξανίου η οποία πραγματοποιείται σε αποστακτικές στήλες, όπου με τη βοήθεια ατμού αποστάζει ως προϊόν κορυφής το εξάνιο, ενώ το έλαιο παραλαμβάνεται από τον πυθμένα της αποστακτικής στήλης παρασύροντας και ορισμένη ποσότητα εξανίου (Peña, Cárdenas, Gallego, & Valcarcel, 2003). Το μίγμα ατμών, νερού και εξανίου ψύχεται, ώστε να συμπυκνωθεί και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε δεξαμενές καθίζησης, όπου διαχωρίζεται το εξάνιο από το νερό ως πιο ελαφρύ, καθαρίζεται και επαναχρησιμοποιείται.

1.2.3 Το προϊόν (πυρηνέλαιο) και το παραπροϊόν (πυρηνόξυλο) των πυρηνελαιουργείων

Στα πυρηνελαιουργεία παράγεται ως κύριο προϊόν το πυρηνέλαιο, ενώ παράλληλα προκύπτει ως παραπροϊόν το πυρηνόξυλο.

- Πυρηνέλαιο: Γενικά, το πυρηνέλαιο που εκχυλίζεται από ξηρό ελαιοπυρήνα (υγρασία περίπου 8%) με χρήση οργανικού διαλύτη αναφέρεται ως "ακατέργαστο πυρηνέλαιο". Γενικότερα, δύο τύποι πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα είναι διαθέσιμοι: i) το έλαιο που εξάγεται με εκχύλιση χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη (κλασική μέθοδος), ii) το έλαιο που λαμβάνεται μέσω φυγοκέντρωσης (δεύτερη φυγοκέντρωση) από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από διφασικό σύστημα, που όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη υποενότητα καλείται πυρηνέλαιο δεύτερης φυγοκέντρωσης.

Το ακατέργαστο πυρηνέλαιο δεν μπορεί να διατεθεί προς κατανάλωση απ'ευθείας, λόγω του μεγάλου ποσοστού ελεύθερων λιπαρών οξέων που περιέχει. Τα πυρηνέλαια χαμηλής οξύτητας (μέχρι 10%) μπορούν μετά από εξευγενισμό να αναμιχθούν με ελαιόλαδο ή να μετεστεροποιηθούν για την παραγωγή μαργαρίνης και άλλων βιομηχανικών μαγειρικών λιπών (shortenings). Υψηλής οξύτητας πυρηνέλαια που παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες έχουν μικρότερη αξία, ενώ έλαια με οξύτητα μεγαλύτερη από 50% χρησιμοποιούνται στη σαπωνοποιία. Γενικώς τα πυρηνέλαια οξύτητας μέχρι 30% μπορούν να καταστούν εδώδιμα, μετά από εξευγενισμό.

Ο εξευγενισμός των πυρηνέλαιων περιλαμβάνει μία σειρά χημικών και φυσικών διεργασιών που έχουν ως σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαίου και την αύξηση του χρόνου ζωής τους. Η σειρά των διεργασιών εξευγενισμού αποτελείται από τα στάδια: α) αποκομμίωση, β) απομάκρυνση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (εξουδετέρωση), γ) αποχρωματισμό και δ) απόσπηση. Στην αποκομμίωση επιτυγχάνει απομάκρυνση των φωσφατιδίων (κομμιωδών συστατικών) με χρήση κυρίως διαλύματος φωσφορικού οξέος σε ήπιες θερμοκρασίες (40-45 °C). Η αποκομμίωση με φωσφορικό οξύ χρησιμοποιείται και σε συνδυασμό με αλκαλική εξουδετέρωση. Στην αλκαλική εξουδετέρωση πραγματοποιείται εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με τη βοήθεια διαλύματος καυστικού νατρίου σε θερμοκρασίες 60-80 °C και ακολουθεί διαχωρισμός των σχηματιζόμενων σαπώνων με φυγοκέντρωση. Ακολούθως στο στάδιο του αποχρωματισμού επιτυγχάνεται αφαίρεση των χρωστικών και οξειδωμένων συστατικών μέσω προσρόφησής τους σε αποχρωστικές γαίες ή/και ενεργό άνθρακα σε θερμοκρασίες (120-140 °C υπό ελαττωμένη πίεση), παρέχοντας έτσι ένα προϊόν με ανοικτό χρώμα. Τέλος, κατά την απόσπηση με απόσταξη με τη βοήθεια υδρατμών σε κατάλληλες συνθήκες (4-8 mmHg

και 180-200 °C) επιτυγχάνεται απομάκρυνση των οσμηρών συστατικών (κυρίως αλδεΐδες και κετόνες), οπότε προκύπτει το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Antonopoulos, Valet, Spiratos, & Siragakis, 2006).

- Πυρηνόξυλο: Το πυρηνόξυλο αποτελεί μία εξαιρετική καύσιμη ύλη με μεγάλη θερμογόνο δύναμη (4000 kcal/Kg) που διατίθεται στο εμπόριο ή μέρος του χρησιμοποιείται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του ίδιου του πυρηνελαιουργείου. Η μεγάλη ζήτηση του πυρηνόξυλου ως καύσιμη ύλη οφείλεται στα πολλά και σημαντικά πλεονεκτήματά του, όπως η μηδενική συμβολή του στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, καθώς είναι ένα ετησίως ανανεώσιμο καύσιμο, η τιμή του δεν υπόκειται σε διακυμάνσεις της αγοράς και η καύση του παράγει θερμά αέρια με σταθερό εύρος θερμοκρασιών, που μπορεί να φθάσει τους 800 °C, τα οποία με προσεκτικό έλεγχο καύσης συμμορφώνονται με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία για τους αέριους ρύπους. Το πυρηνόξυλο που προκύπτει πρέπει να ακολουθεί ορισμένες προδιαγραφές για τη μετέπειτα χρήση του, όπως η παραγωγή τέφρας κατά την καύση του να είναι μικρότερη από 1,5% και η υγρασία του να είναι μικρότερη από 8%.

1.3 Σύσταση του πυρηνέλαιου

1.3.1 Λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και φυσικοχημικές ιδιότητες

Το πυρηνέλαιο (εξευγενισμένο) περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια (~99%) και ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο-γλυκερίδια και δι-γλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα που απαντώνται στη σύστασή του είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), το στεατικό οξύ (C18:0), το ελαϊκό οξύ (C18:1), το λινελαϊκό οξύ (C18:2) και το λινολενικό οξύ (C18:3). Όπως έχει αναφερθεί, το πυρηνέλαιο και το ελαιόλαδο παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες ως προς τη σύστασή τους. Η σύσταση των λιπαρών οξέων του πυρηνέλαιου και του ελαιόλαδου (% w/w μεθυλεστέρες) παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Σύσταση λιπαρών οξέων πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (μέσω προσδιορισμού με αέρια χρωματογραφία (% w/w μεθυλεστέρες) (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ollivier, Artaud, Pinatel, Durbec, & Guéère, 2006)

Λιπαρό οξύ		Πυρηνέλαιο	Ελαιόλαδο
Μυριστικό οξύ	C14:0	0,03-0,04	0,0-0,1
Παλμιτικό οξύ	C16:0	10,40-20,00	7,5-15,80
Παλμιτελαϊκό οξύ	C16:1	0,68-0,94	0,3-1,5
Επταδεκανοϊκό οξύ	C17:0	0,07-0,13	0,05-0,20
Επταδεκαενοϊκό οξύ	C17:1	0,06-0,15	0,05-0,38
Στεατικό οξύ	C18:0	3,00-3,67	2,17-3,01
Ελαϊκό οξύ	C18:1	70,00-80,25	55,0-83,0
Λινελαϊκό οξύ	C18:2	8,46-11,50	6,5-14,0
Λινολενικό οξύ	C18:3	0,53-0,87	0,51-0,96
Αραχιδονικό οξύ	C20:0	0,33-0,42	0,29-0,44
Εικοσαενοϊκό οξύ	C20:1	0,08-0,26	0,22-0,35
Μπεγενικό οξύ	C22:0	0,11-0,16	0,07-0,15
Λιγνοσερικό οξύ	C24:0	0,07-0,12	0,02-0,08

Η σύσταση των λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου και κατ' επέκταση του πυρηνέλαιου μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το κλίμα και το γεωγραφικό πλάτος της ζώνης καλλιέργειας του ελαιόδενδρου, την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, αλλά και το σύστημα εξαγωγής του ελαιόλαδου από το οποίο προκύπτει ο ελαιοπυρήνας. Όπως έχει αποδεχθεί πειραματικά, πυρηνέλαια προερχόμενα από ελαιοπυρήνες με περιεχόμενη υγρασία 8% και 9% τα οποία έχουν εκχυλιστεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες (20-50 °C) παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα (Ollivier et al., 2006, Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006). Επιπλέον, με βάση τη βιβλιογραφία παρουσιάζεται η σύσταση των κυριότερων λιπαρών οξέων για πυρηνέλαιο από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από τριφασικό και διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης: ελαϊκό οξύ (71%), παλμιτικό οξύ (12%), λινελαϊκό οξύ (9%), παλμιτελαϊκό οξύ (4%) και λινολενικό οξύ (2%) για τον ελαιοπυρήνα από τριφασικό σύστημα φυγοκέντρησης και ελαϊκό οξύ (75%), παλμιτικό οξύ (10%), λινελαϊκό οξύ (9%), παλμιτελαϊκό οξύ (1%) και λινολενικό οξύ (1%) για πυρηνέλαιο από ελαιοπυρήνα προερχόμενο από διφασικό σύστημα φυγοκέντρησης (Nunes et al., 2018, Uribe et al., 2014).

Η σύσταση των τριγλυκεριδίων του πυρηνέλαιου και του ελαιόλαδου παρουσιάζεται στον Πίνακα 4 (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ollivier et al., 2006). Τα κυριότερα τριγλυκερίδια

είναι το τριελαϊκό (OOO), ελαϊκό-ελαϊκό-παλμιτικό (OOP) και το λινελαϊκό-ελαϊκό-ελαϊκό (LOO).

Πίνακας 4. Σύσταση τριγλυκεριδίων πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (% του συνόλου των τριγλυκεριδίων) (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ollivier et al., 2006)

Τριγλυκερίδιο	Πυρηνέλαιο	Ελαιόλαδο
LLL	0,7	0,06-0,47
LnLO	0,6	0,45-0,89
OLL+PoLO	4,0	0,19-0,53
PLL+LnOO	2,5	0,07-1,15
POLn	1,0	0,67-1,11
LOO	16,1	11,52-18,13
LOP	6,2	4,94-10,58
LPP	0,2	0,44-2,20
OOO	38,3	27,71-45,01
OOP	17,9	18,70-24,76
POP	2,3	2,41-4,40
SOO	6,3	2,53-4,46
POS	1,1	0,59-1,38
AOO	2,0	0,98-1,98

P: παλμιτικό, Po: παλμιτελαϊκό, M: μυριστικό, S: στεατικό, O: ελαϊκό, L: λινελαϊκό, Ln: λινολενικό, και A: αραχιδονικό οξύ

Οι φυσικοχημικές και άλλες ιδιότητες του πυρηνέλαιου και του ελαιόλαδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Γενικά, η οξύτητα του ακατέργαστου πυρηνέλαιου μπορεί να φτάνει έως 22-25% εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, ενώ έπειτα από τον εξευγενισμό η τιμή της οξύτητας είναι μικρότερη από 0,1% σε ελαϊκό οξύ. Ο αριθμός ιωδίου, που συνδέεται με την καλή ποιότητα και τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του ελαίου έχει παρόμοιες τιμές με του ελαιόλαδου (Ortega-Nieblas, Molina-Freaner, Robles-Burguenño, & Vázquez-Moreno, 2001). Ο αριθμός σαπωνοποίησης που είναι δείκτης του μέσου μοριακού βάρους των λιπαρών οξέων λαμβάνει επίσης τιμές παρόμοιες με του ελαιόλαδου. Τέλος, ο αριθμός υπεροξειδίων που επηρεάζεται

από την ηλικία των ελαίων πρέπει να έχει τιμή μικρότερη από 20 meq O₂/kg ελαίου, ώστε να θεωρείται κατάλληλο προς κατανάλωση (Azlan et al., 2010).

Πίνακας 5. Φυσικοχημικές και άλλες ιδιότητες πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (Nunes et al., 2018, Azlan et al., 2010, Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Boskou, 2011)

Φυσικοχημικές ιδιότητες	Πυρηνέλαιο	Ελαιόλαδο
Οξύτητα (% σε ελαϊκό οξύ)	<1	<1
Δείκτης Διάθλασης (nD)	1,468-1,4707	1,4677-1,4705
Αριθμός ιωδίου (g ιωδίου/ 100g ελαίου)	75-92	75-94
Αριθμός σαπωνοποίησης (mgKOH/g ελαίου)	182-193	182-198
K232	<2,60	<2,50
K270	<2	<0,90
Αριθμός υπεροξειδίων (meq O ₂ /kg ελαίου)	<15	<15

Επιπρόσθετα, το πυρηνέλαιο περιέχει πλήθος βιοδραστικών συστατικών, όπως στερόλες, φαινολικά συστατικά, τοκοφερόλες, χρωστικές, κ.α. που όπως έχει αποδειχθεί έχουν ευεργετική επίδραση στην προστασία του ελαίου έναντι οξειδωτικών παραγόντων. Στις ενότητες που ακολουθούν θα περιγραφούν λεπτομερώς τα βιοδραστικά συστατικά του πυρηνέλαιου.

1.3.2 Βιοδραστικά συστατικά πυρηνέλαιου και ελαιοπυρήνα

Το ενδιαφέρον για το πυρηνέλαιο αυξάνεται λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει όπως ότι προέρχεται από τον ελαιόκαρπο, εμφανίζει, όπως ήδη έχει αναφερθεί, μεγάλη ομοιότητα ως προς τη σύσταση με το ελαιόλαδο και είναι φθηνότερο από αυτό. Επιπλέον, το πυρηνέλαιο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασαπωνοποίητα συστατικά από το ελαιόλαδο (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012) και είναι επίσης πλουσιότερο σε ορισμένες στερόλες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Rodríguez et al., 2008). Το πυρηνέλαιο ακόμη περιέχει βιοδραστικά συστατικά που συναντώνται στο παρθένο ελαιόλαδο, όπως διάφορα πολυφαινολικά συστατικά (De la Puerta, Marquez-Martin, Fernandez-Arche, & Ruiz-Gutierrez, 2009, Ruiz-Méndez, López, & Fernández, 2008). Οι στερόλες, το σκουαλένιο, οι τοκοφερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, και

οι τριτερπενικές διακλοόλες είναι οι ενώσεις που καθιστούν τα μικρότερα συστατικά του πυρηνέλαιου ένα ενδιαφέρον κλάσμα από την άποψη των βιοδραστικών ενώσεων (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Σύσταση του κλάσματος των ασαπωνοποίητων συστατικών σε κύρια βιοδραστικά πυρηνέλαιου και ελαιόλαδου (%) (Kiritsakis, 2007)

Κατηγορία ασαπωνοποίητων συστατικών (%)	Πυρηνέλαιο	Ελαιόλαδο
Σκουαλένιο και άλλοι υδρογονάνθρακες	20-50	30-50
Στερόλες	17-25	15
Τριτερπενικές διακλοόλες	12	10
Ανώτερες αλειφατικές αλκοόλες (λιπαρές αλκοόλες)	16	-
Καροτενοειδή, τοκοφερόλες και άλλα συστατικά	35	25-45

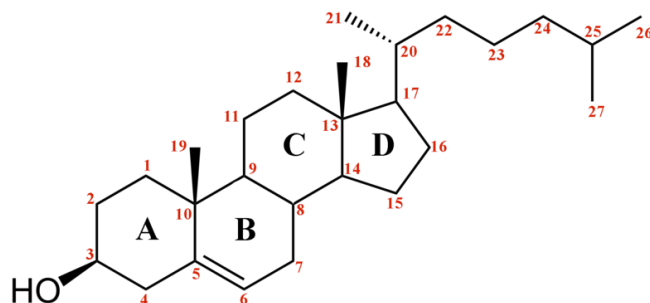
Η συνολική περιεκτικότητα στερολών στο πυρηνέλαιο κυμαίνεται μεταξύ 1600 και 2500 mg/kg ενώ έχουν βρεθεί δείγματα πυρηνέλαιων με στερόλες που κυμαίνονται σε ποσοστό από 17-25% επί του συνολικού ασαπωνοποίητου κλάσματος. Η σύσταση των στερολών είναι περίπου ίδια στο πυρηνέλαιο και στο ελαιόλαδο παρουσιάζοντας ελάχιστες διαφορές. Η αναλογία των περιεχόμενων στερολών επί του συνόλου αυτών στο πυρηνέλαιο αναφέρεται στα εξής όρια: χοληστερόλη: <0,5 %, βρασικαστερόλη: <0,2%, στιγμαστερόλη <3%, καμπεστερόλη: <4,0%, Δ-7-στιγμαστενόλη: <0,5% και β-σιτοστερόλη: >93,0% (International Olive Council, 2015). Το σκουαλένιο έχει βρεθεί σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται έως 7 mg/g στο παρθένο ελαιόλαδο και μέχρι 3,4 mg/g στο πυρηνέλαιο αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 50% του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαίου (Ghanbari et al., 2012, Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Boskou, 2011). Ακόμη οι τριτερπενικές διακλοόλες εμφανίζονται αυξημένες στο πυρηνέλαιο, ειδικά η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη οι οποίες έχουν βρεθεί κατά 10-20% αυξημένες στο πυρηνέλαιο από ότι στο ελαιόλαδο, και αυτή η διαφορά, όπως έχει αναφερθεί, επιτρέπει τη διάκριση των δύο αυτών ελαίων. Το πυρηνέλαιο παρουσιάζει επίσης παρόμοιο πολυφαινολικό προφίλ με εκείνο του ελαιόλαδου και έχει υψηλή συγκέντρωση σε απλές φαινόλες όπως σε υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βανιλικό οξύ, βανιλίνη, κουμαρικό οξύ και λιγνάνες όπως 1-ακετοξυπυρινορεζινόλη και πινορεζινόλη. Η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και η κατεχόλη εμφανίζουν συγκεντρώσεις που φτάνουν μέχρι 600 mg/kg ελαίου,

γεγονός που καθιστά την ανάκτησή τους ιδιαίτερα ελκυστική για την προσθήκη τους σε τρόφιμα, καλλυντικά ή φάρμακα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανάκτηση αυτών των πολύτιμων ενώσεων και η περαιτέρω αξιοποίησή τους ως πρόσθετα σε νέα προϊόντα για τους βιομηχανικούς κλάδους των τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων είναι κάτι περισσότερο από σημαντικό. Συνεπώς, σύμφωνα με τη σύγχρονη τάση αναζήτησης νέων συστατικών από φυσικές πηγές, η αξιοποίηση του πυρηνέλαιουπροβάλλει ως ιδιαίτερα ελκυστική.

1.3.2.1 Στερόλες

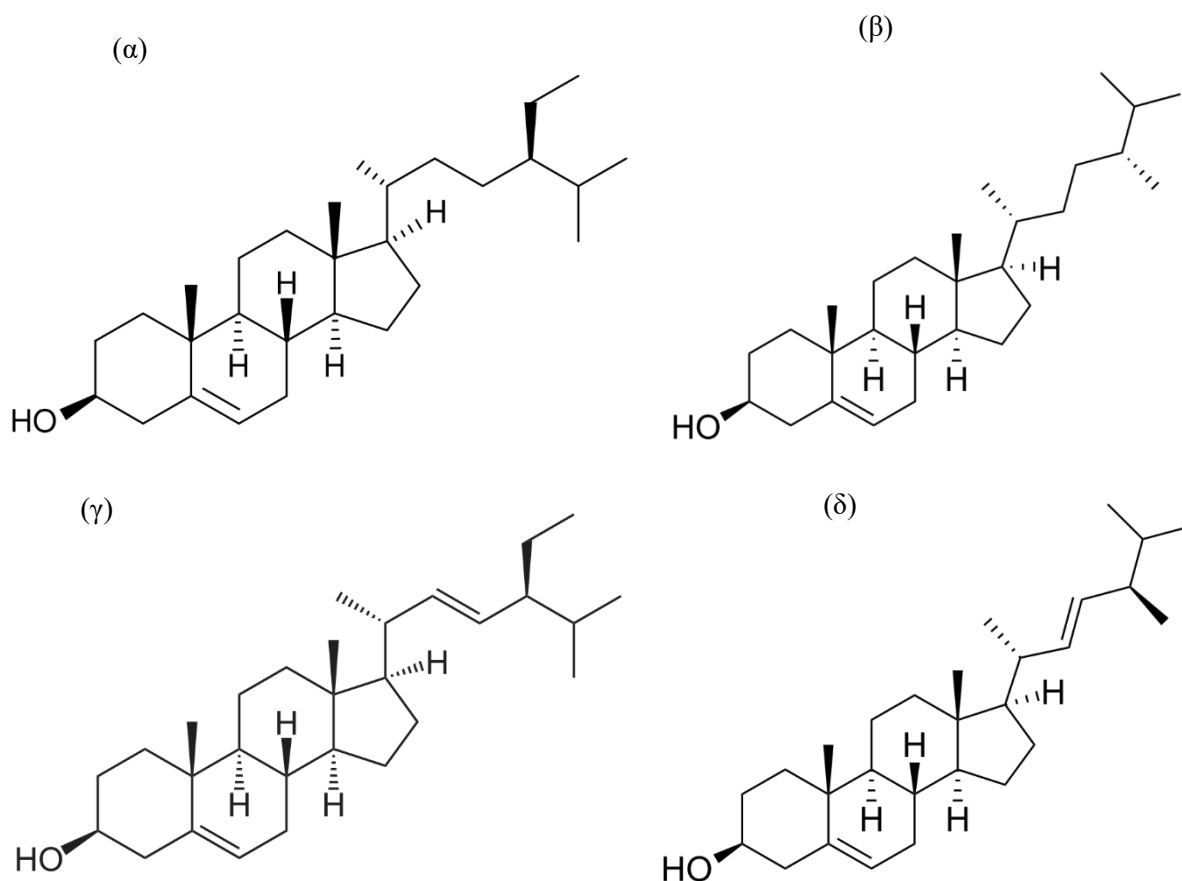
Οι στερόλες χαρακτηρίζονται ως μεγάλο μοριακού βάρους μονοσθενείς δευτεροταγείς αλκοόλες. Οι στερόλες περιέχοντας στο μόριό τους τρεις κυκλοεξανικούς δακτυλίους και ένα κυκλοπεντανικό, έχουν επτά ασύμμετρα άτομα άνθρακα, τα οποία αυξάνονται ανάλογα με τον αριθμό των ασύμμετρων ατόμων άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας. Η δομή τους παρουσιάζεται στο Σχήμα 8. Περιλαμβάνουν 27-29 άτομα άνθρακα και έχουν μία μόνο υδροξυλομάδα στον C-3 και από μία μεθυλική ομάδα στους C-10 και C-13. Οι μεταξύ τους διαφορές συνίστανται στο βαθμό ακορεστότητας αυτών και στην κατασκευή της πλευρικής αλυσίδας, η οποία είναι υποκατεστημένη στον C-17.



Σχήμα 8. Χημική δομή στερόλης

Στα φυτικά έλαια, οι στερόλες εμφανίζονται κυρίως σε ελεύθερη μορφή (Yuan, Ju, Jin, Ren, & Liu, 2015). Οι κύριες φυτικές στερόλες (φυτοστερόλες) είναι η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη και η στιγμαστερόλη και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή δύο ατόμων άνθρακα στην πλευρική αλυσίδα, συνδεδεμένων στον C-24 (Σχήμα 9). Η καμπεστερόλη και η σιτοστερόλη φέρουν ομάδα μεθυλίου ή αιθυλίου, αντίστοιχα, συνδεδεμένη στον C-24. Η στιγμαστερόλη περιλαμβάνει μία πιο ακόρεστη πλευρική αλυσίδα. Η κυριότερη ζωική στερόλη είναι η χοληστερόλη.

Οι στερόλες είναι χαρακτηριστικές για κάθε έλαιο και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της νοθείας των ελαίων (Sanchez-Machado, López-Hernández, Paseiro-Losada, & López-Cervantes, 2004). Η κυριότερη στερόλη με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο πυρηνέλαιο είναι η β-σιτοστερόλη. Η αναφερόμενη περιεκτικότητα β-σιτοστερόλης στο πυρηνέλαιο είναι κατ' ελάχιστο 93% επί του συνόλου των στερολών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το πυρηνέλαιο εμφανίζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα β-σιτοστερόλης (339-430 mg/100 g ελαίου) σε σχέση με το ελαιόλαδο (181-226 mg/100 g ελαίου) (Seçmeler, Güçlü, Fernández-bolaños, & Rodríguez-gutiérrez, 2018). Επιπλέον, η συγκέντρωση της καμπεστερόλης, δεν ξεπερνά το 4% του συνόλου των περιεχόμενων στερολών, και η στιγμαστερόλη απαντάται σε μικρότερη ποσότητα από την καμπεστερόλη (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000). Στο πυρηνέλαιο ακόμη μπορεί να βρεθούν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις η χοληστερόλη και η βρασσικαστερόλη.



Σχήμα 9. Χημική δομή των κύριων φυτοστερολών: β-σιτοστερόλη (α), καμπεστερόλη (β), στιγμαστερόλη (γ) και βρασσικαστερόλη (δ) (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000)

Η σύσταση των στερολών του ελαιόλαδου και κατ' επέκταση του πυρηνέλαιου όπως και η συνολική περιεκτικότητα σε στερόλες επηρεάζονται από την καλλιέργεια, το έτος συγκομιδής, το βαθμό ωριμότητας των καρπών, το χρόνο αποθήκευσής τους πριν την παραλαβή του ελαίου, και επίσης από γεωγραφικούς παράγοντες (Aparicio & Luna, 2002, Rivera del Álamo, Fregarane, Aranda, Gómez-Alonso, & Salvador, 2004). Στο ακατέργαστο πυρηνέλαιο αναφέρεται συγκέντρωση στερολών 2,5 mg/g και στο εξευγενισμένο πυρηνέλαιο 1,8 mg/g αντίστοιχα.

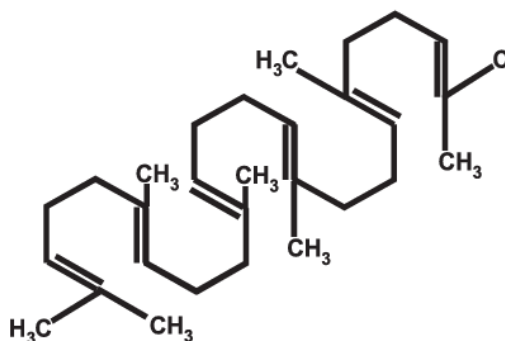
Επιπρόσθετα, οι στερόλες είναι χημικά σταθερές ενώσεις και δεν οξειδώνονται εύκολα. Όπως έχει φανεί πειραματικά σε κάποια έλαια δεν παρατηρείται σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των στερολών τους κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Rastrelli, Passi, Ippolito, Vacca, & De Simone, 2002). Αλλα έλαια με υψηλή συγκέντρωση σε στερόλες είναι το ρυζέλαιο (έως 10.5 mg/g ελαίου) και το κραμβέλαιο (έως 11 mg/g ελαίου), αλλά η πιο διαδεδομένη πηγή στερολών είναι το σογιέλαιο (έως 4.8 mg/g ελαίου) (Güçlü-Üstündag & Temelli, 2005).

Οι φυτικές στερόλες έχουν μεγάλη σημασία για την υγεία, διότι σε αντίθεση με τη χοληστερόλη (Koricová & Vavreϊnová, 2007), δεν αφομοιώνονται εξίσου από τον οργανισμό, και μάλιστα μειώνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα (Jiménez-Escrig, Santos-Hidalgo, & Saura-Calixto, 2006). Η χοληστερόλη, ως γνωστό, έχει συνδεθεί με αθηρωματικές εναποθέσεις στο ανθρώπινο καρδιαγγειακό σύστημα και η μείωσή της στη διατροφή αποτελεί προτεραιότητα στις χώρες του δυτικού πολιτισμού. Όσον αφορά όμως τις φυτικές στερόλες, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές εμφανίζουν έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως των ωθηκών, του μαστού, του στομάχου, του προστάτη και του καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό οφείλεται στην υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση η οποία οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης και της εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων. Ακόμα, ιδιαίτερος είναι ο ρόλος των στερολών στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματική θεραπεία σε χρόνιες καρδιαγγειακές παθήσεις και στον καρκίνο. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ευεργετικά αποτελέσματα των στερολών για την προστασία του δέρματος ενάντια της γήρανσης καθώς ενισχύουν την παραγωγή κολλαγόνου που επιβραδύνεται από την έκθεση του δέρματος στον ήλιο (Rawal, Yadav, & Nagayach, 2015).

1.3.2.2 Σκουαλένιο

Το σκουαλένιο είναι φυσικός τερπενοειδής υδρογονάνθρακας (C₃₀H₅₀) που έχει έξι μονάδες ισοπρενίου (Σχήμα 10). Είναι ένας πρόδρομος της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης και της βιταμίνης D και είναι άφθονος στο έλαιο του συκωτιού (*Squaluss spp.*) φτάνοντας σε συγκεντρώσεις 40-75 % (w/w) επί του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαίου (Lu, Jiang, & Chen, 2004, Ryan, Galvin, Connor, & Maguire, 2007). Αρκετοί ερευνητές έχουν επισημάνει

το ενδιαφέρον της εν λόγω ουσίας σε εναλλακτικές φυτικές πηγές, όπως ο σπόρος του αμάραντου, ο ελαιοπυρήνας και τα φύλλα της ελιάς. Είναι επίσης σημαντικό συστατικό σε πολλά εδώδιμα έλαια όπως το ελαιόλαδο, το σογιέλαιο και το έλαιο ρυζιού.



Σχήμα 10. Απεικόνιση του μορίου του σκουαλενίου

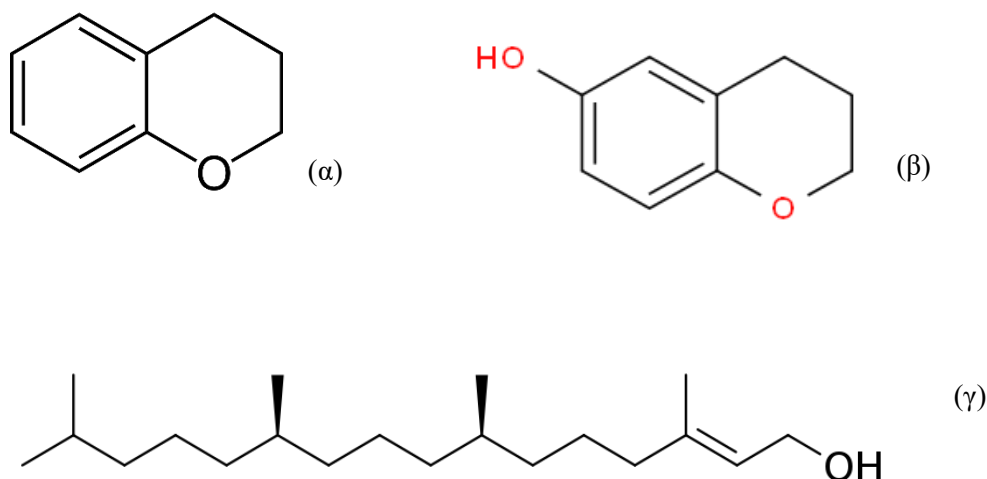
Το σκουαλένιο αντιπροσωπεύει πάνω από το 50% του ασαπωνοποίητου συστατικού του ελαιόλαδου και του πυρηνέλαιου. Η περιεκτικότητά του στο ελαιόλαδο μπορεί να κυμαίνεται από 200 έως 7500 mg/kg ελαίου, ενώ σε δείγματα ελληνικού ελαιόλαδου έχουν βρεθεί και πολύ υψηλότερα επίπεδα (έως 12000 mg/kg ελαίου) (Murkovic et al., 2004), και στο πυρηνέλαιο πάνω από 3400 mg/kg ελαίου (Ketenoglu, Sahin, Yorulmaz, & Tekin, 2018).

Το σκουαλένιο είναι άχρωμο και άοσμο. Ενεργεί ως αντιοξειδωτικό και προστατεύει τα έλαια στα οποία περιέχεται. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων του παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Το σκουαλένιο έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων και για την αύξηση της διαλυτότητας ορισμένων φαρμάκων σε γαλακτώματα ελαίου/νερού. Πέραν αυτού, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το σκουαλένιο είναι ένας σημαντικός χημειο-προληπτικός παράγοντας του καρκίνου. Η προστατευτική δράση του σκουαλενίου μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά του να χρησιμεύει ως αντιοξειδωτικό, να ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος και να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Lu et al., 2004). Έχει αναφερθεί ότι βοηθά στην καλή λειτουργία του ήπατος. Επίσης σε συνδυασμό με τις στερόλες του ελαιόλαδου, έχει παρατηρηθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από τις μεταλλάξεις του DNA και τον καρκίνο του δέρματος. Κατ' άλλους προστατεύει το συκώτι από την τοξικότητα ορισμένων φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται σε χημειοθεραπείες, χωρίς παράλληλα να προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα, σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες και προστατεύει από το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επιπλέον, το σκουαλένιο έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει ευεργετική δράση ενάντια στην αθηροσκλήρωση (Guillén et al., 2008, Bullon et al., 2009), στη δερματίτιδα (Kelly, 1999) και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος και του εντέρου (Rao, Newmark, & Reddy, 1998). Ακόμη, μετά την απορρόφησή του από την επιφάνεια του ανθρώπινου δέρματος,

το σκουαλένιο δρα ως άμυνα έναντι της έκθεσης στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία από το ηλιακό φως.

1.3.2.3 Τοκοφερόλες

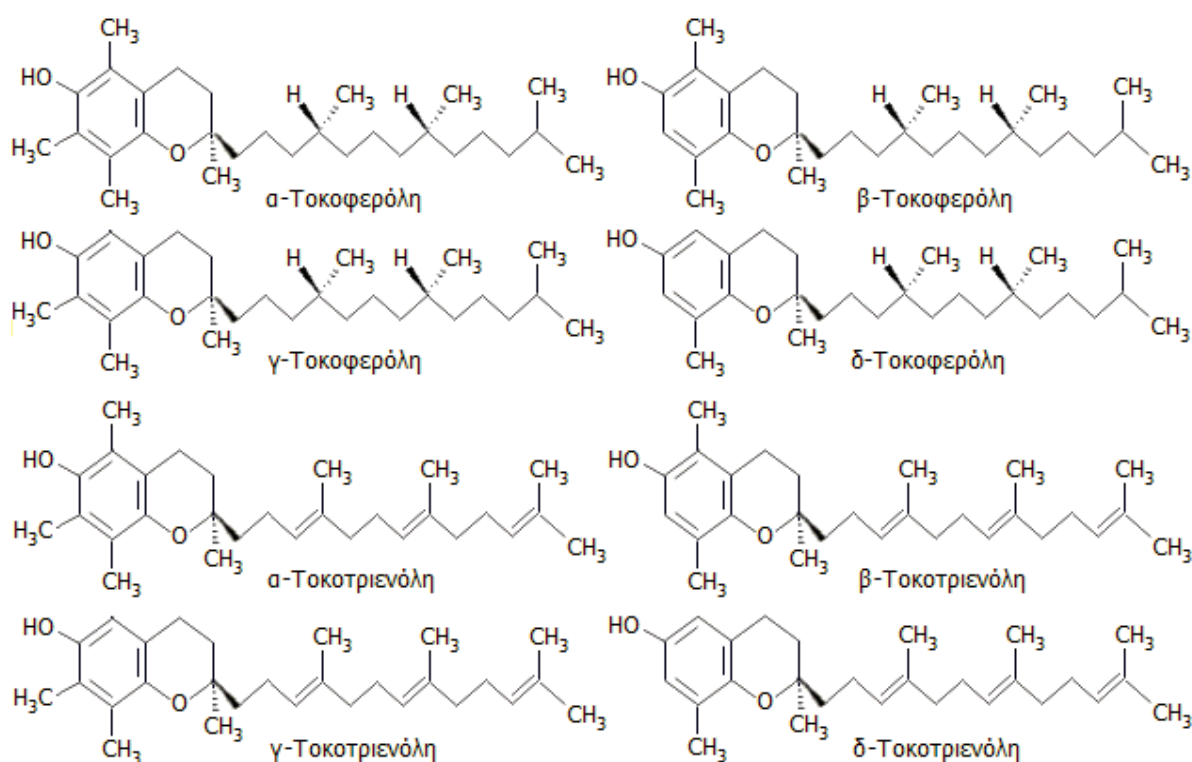
Οι τοκοφερόλες είναι μία ομάδα λιποδιαλυτών χημικών ενώσεων παρόμοιας χημικής δομής (ομόλογες ενώσεις) με έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Απαντώνται σε 4 ομάδες, α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ύπαρξη μίας ομάδας χρωμανίου, η οποία στη θέση 6 περιέχει ένα υδροξύλιο, σχηματίζοντας την 6-χρωμανόλη (6-chromanol), και στη θέση 2 περιέχει μία πλευρική αλειφατική αλυσίδα, η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ουρά φυτυλίου (phytyl tail) (Σχήμα 11). Ο αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των τοκοφερολών οφείλεται στο υδροξύλιο του χρωμανίου, ενώ ο έντονα λιπόφιλος χαρακτήρας τους οφείλεται στην ουρά φυτυλίου.



Σχήμα 11. Η ομάδα χρωμανίου (α), 6-χρωμανόλης (β) και η ουρά φυτυλίου (γ) που συνιστούν τις τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι άχρωμες έως υποκίτρινες ουσίες. Απαντώνται στα φυτικά έλαια και είναι γνωστές με το όνομα βιταμίνη Ε, που αποτελεί το γενικό όρο για τοκοφώλες και τοκοτριενόλες που παρουσιάζουν συμπεριφορά βιταμίνης παρόμοια με αυτή της α-τοκοφερόλης (Yuan et al., 2017). Οι τοκοτριενόλες (ανάλογα με τις τοκοφερόλες ονομάζονται: α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλες) θεωρούνται και αυτές ως κανονικά συστατικά της βιταμίνης Ε. Διαφέρουν από τις αντίστοιχες τοκοφερόλες ως προς το ότι η πλευρική υδρόφοβη αλειφατική αλυσίδα περιλαμβάνει και τρεις διπλούς δεσμούς και αναφέρεται ως ουρά φαρνεσυλίου (farnesyl tail) (Σχήμα 12).

Από τις οκτώ γνωστές βιταμίνες E (τέσσερις τοκοφερόλες και τέσσερις τοκοτριενόλες), η α-τοκοφερόλη αποτελεί το 90% της συνολικής περιεκτικότητας τοκοφερολών και ακολουθούν η β-τοκοφερόλη που πλησιάζει το 40% της α-τοκοφερόλης και οι γ- και δ- που βρίσκονται στο 1-11% της α-τοκοφερόλης, αντίστοιχα (Farhoosh, Tavassoli-kafrani, & Hossein Sharif, 2011, Charan, Bavisetty, & Narayan, 2015). Είναι εξαιρετικά άπολες ενώσεις και παρουσιάζουν σταθερότητα απουσία οξυγόνου, φωτός και θερμότητας, παρόλο που έχουν υψηλό σημείο ζέσεως (200-220°C). Η έλλειψή τους από τον ανθρώπινο οργανισμό έχει συνδεθεί με προβλήματα κατά την κύηση, αιμόλυση και μυϊκή δυστροφία (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000). Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα και ζωοτροφές (71%), στη φαρμακοβιομηχανία (24%) και για την παραγωγή τροφίμων (2%) και καλλυντικών (3%) (Güçlü-Üstündag & Temelli, 2005).



Σχήμα 12. Χημική δομή των κύριων τοκοφερολών και τοκοτριενολών (Lercker & Rodriguez-Estrada, 2000)

Στη φύση συναντώνται συχνά σε ελαιούχους σπόρους σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έρευνες αναφέρουν ότι στο ελαιόλαδο η περιεκτικότητα της α-τοκοφερόλης είναι της τάξης των 36-314 mg/kg ελαίου. Η περιεκτικότητα των β- και γ-τοκοφερολών κυμαίνεται σε 1-17 και 0,5-22 mg/kg ελαίου, αντίστοιχα. Στο πυρηνέλαιο, η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες κυμαίνεται από 100 έως 250 mg/kg ελαίου και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως οι συνθήκες αποθήκευσης του ελαιοπυρήνα και οι διεργασίες προκατεργασίας, για παράδειγμα η ξήρανση με θερμό αέρα (Ketenoglu et al., 2018). Με βάση τα όρια που έχουν καθοριστεί από το Διεθνές

Ελαιοκομικό Συμβούλιο, το περιεχόμενο της α-τοκοφερόλης στο πυρηνέλαιο πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 200 mg/kg ελαίου.

Οι τοκοφερόλες γενικά μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά συστατικά και ειδικά ο ρόλος της α-τοκοφερόλης και της δραστηριότητάς της έχει αποδειχθεί σε σχέση με χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, καρδιαγγειακά νοσήματα, την καταπολέμηση του καρκίνου, τη βελτίωση του μυϊκού και κυτταρικού συστήματος, του καταρράκτη και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών και τη γήρανση των κυττάρων (Güçlü-Üstündag & Temelli, 2005).

1.3.2.4 Αλειφατικές αλκοόλες

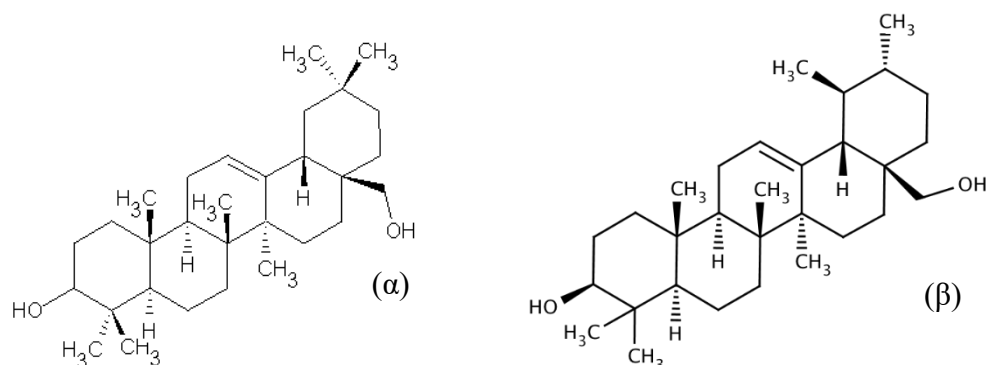
Οι πιο σημαντικές αλειφατικές αλκοόλες είναι οι λιπαρές αλκοόλες και οι διτερπενικές αλκοόλες. Οι λιπαρές αλκοόλες αποτελούνται από κορεσμένες γραμμικές αλκοόλες με 16 άτομα άνθρακα και οι κυριότερες από αυτές που βρίσκονται στο πυρηνέλαιο είναι: η C26 ή εξακοσανόλη, η C28 ή οκτακοσανόλη και η C30 ή τριακοντανόλη. Στο ελαιόλαδο, το περιεχόμενο των λιπαρών αλκοολών δεν υπερβαίνει τα 250 mg/kg ελαίου (Boskou, 2011). Πολύ υψηλότερο είναι το περιεχόμενο στο ακατέργαστο πυρηνέλαιο, ωστόσο το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο περιέχει λιπαρές αλκοόλες σε παρόμοια επίπεδα με εκείνα που βρίσκονται στο ελαιόλαδο (Blekas, Tsimidou, & Boskou, 2006). Οι λιπαρές αλκοόλες μακράς αλυσίδας που ελήφθησαν από το πυρηνέλαιο έχουν δείξει δραστηριότητα στη μείωση διαφόρων φλεγμονών (Fernández-Arche et al., 2008), μειώνοντας τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και τη χοληστερόλη (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012).

Οι εστέρες λιπαρών οξέων με μονοσθενείς αλκοόλες σχετικά υψηλού μοριακού βάρους (κηροί) είναι σημαντικά μικρά συστατικά του ελαιόλαδου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήριο για τη διαφοροποίηση των διαφόρων τύπων ελαιόλαδου (Κανονισμός EOK 2568, 1991). Οι κηροί που συνήθως ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο είναι εστέρες του ελαιϊκού οξέος ή του παλμιτικού οξέος με 36, 38, 40, 42, 44 και 46 άτομα άνθρακα (Reiter & Lorbeer, 2001). Το ελαιόλαδο περιέχει κηρούς σε περιεκτικότητα μικρότερη από 150 mg/kg ελαίου, ενώ το ακατέργαστο και το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο εμφανίζει περιεκτικότητα σε κηρούς μεγαλύτερη από 2000 mg/kg ελαίου (Blekas et al., 2006). Η διαφορά αυτή χρησιμοποιείται και επισήμως για τη διάκριση μεταξύ των δύο τύπων ελαίου (ελαιόλαδου και πυρηνέλαιου).

1.3.2.5 Τριτερπενικές αλκοόλες

Οι δύο κύριες τριτερπενικές αλκοόλες του ελαιόλαδου και του πυρηνέλαιου είναι η ερυθροδιόλη (ομο-ολεστρανόλη, 5α-ολεαν-12-εν-3β, 28-διόλη) και ουβαόλη (Δ-12-ουρσεν-3β, 28-διόλη) (Σχήμα 13). Οι συγκεντρώσεις της ερυθροδιόλης και της ουβαόλης κυμαίνονται από 1-20 mg/100 g στο ελαιόλαδο και σε υψηλότερες τιμές από 280 mg/100 g στο πυρηνέλαιο (Blekas et al., 2006). Είναι ενεργοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες (Perona, Arcemis, Ruiz-Gutierrez, & Catalá, 2005), και εμφανίζουν θετικές επιδράσεις σε φλεγμονές (Marquez-Martin,

Puerta, Fernandez-Arche, Ruiz-Gutierrez, & Yaqoob, 2006), και στην πρόληψη και θεραπεία όγκων του εγκεφάλου και άλλων καρκίνων (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012).



Σχήμα 13. Απεικόνιση των μορίων της ερυθροδιόλης (α) και της στυβάλης (β)

1.3.2.6 Φαινολικά συστατικά

Το ελαιόλαδο έχει μία μοναδική θέση μεταξύ των άλλων φυτικών ελαίων, εξαιτίας των βιοδραστικών συστατικών του. Οι μελέτες συνδέουν αυτά τα συστατικά με τον ευεργετικό ρόλο του ελαιόλαδου στην ανθρώπινη υγεία (Visioli et al., 2000, Boskou, 2009).

Τα φαινολικά συστατικά είναι μία σημαντική κατηγορία βιοδραστικών συστατικών που συνδέονται με τη γεύση και τη διατήρηση του ελαιόλαδου και χαρακτηρίζονται ως «πολυφαινόλες». Οι πολυφαινόλες είναι οι ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον ένα βενζολικό δακτύλιο και ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο βενζολικό δακτύλιο, και αποτελούν μέρος του πολικού κλάσματος που λαμβάνεται συνήθως από το έλαιο με εκχύλιση με μεθανόλη-νερό.

Οι ενώσεις που εμφανίζονται συχνά ως φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου αλλά και του πυρηνέλαιου είναι: το 4-ακετοξυ-αιθυλο-1,2-διυδροξυβενζόλιο, η 1-ακετοξυ-πινореζινόλη, η απιγενίνη, το καφεϊκό οξύ, το κινναμικό οξύ, τα ο- και p-κουμαρικά οξέα, ελαλελικό οξύ, το φερούλικό οξύ, το γαλικό οξύ, το ομοβανιλικό οξύ, το υδροξυβενζοϊκό οξύ, το p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, η υδροξυτυροσόλη, η λουτεολίνη, η ελευρωπαΐνη, η πινореζινόλη, το πρωτοεαχοϊκό οξύ, το σιναπικό οξύ, το συγγενικό οξύ, η τυροσόλη, το βανιλικό οξύ και η βανιλίνη (Boskou, 2011, Morales & Tsimidou, 2000, García, Ruiz-Méndez, Romero, & Brenes, 2006).

Οι κατηγορίες των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο και στο πυρηνέλαιο είναι οι εξής (Paiva-Martins & Kiritsakis, 2017):

Φαινολικά οξέα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος. Τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν μία γενική δομή ατόμων άνθρακα τύπου C6-C1 και προέρχονται από το βενζοϊκό

οξύ. Οι διαφορετικές δομές οφείλονται στην υδροξυλίωση και τη μεθοξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου. Τα κυριότερα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος που απαντώνται στο ελαιόλαδο και το πυρηνέλαιο είναι το βανιλλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Φαινολικά οξέα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία έχουν βασική δομή ατόμων άνθρακα τύπου C6-C3 (κινναμικό οξύ) και είναι κυρίως το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το συναπικό οξύ.

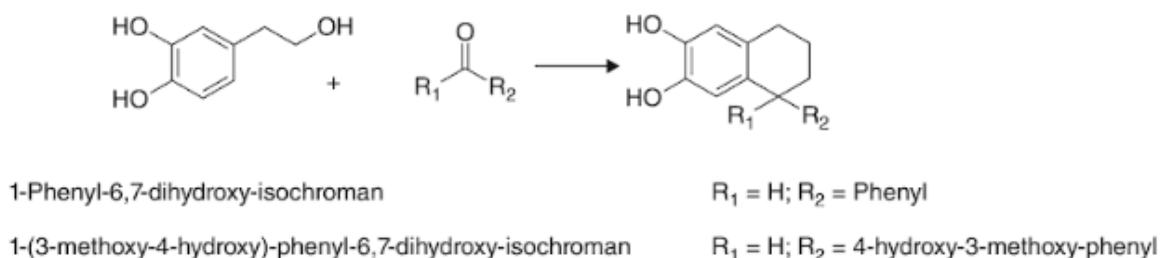
Φλαβονοειδή. Η ρουτίνη που ανήκει στις φλαβονόλες, και η λουτεολίνη και η απιγενίνη που ανήκουν στις φλαβόνες είναι τα κύρια φλαβονοειδή που συναντώνται στα έλαια αυτά.

Φαινυλικές αλκοόλες. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν μόρια που περιέχουν τη δομή C6-C2 και αντιστοιχούν είτε στη 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλη (τυροσόλη) είτε στη 2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη).

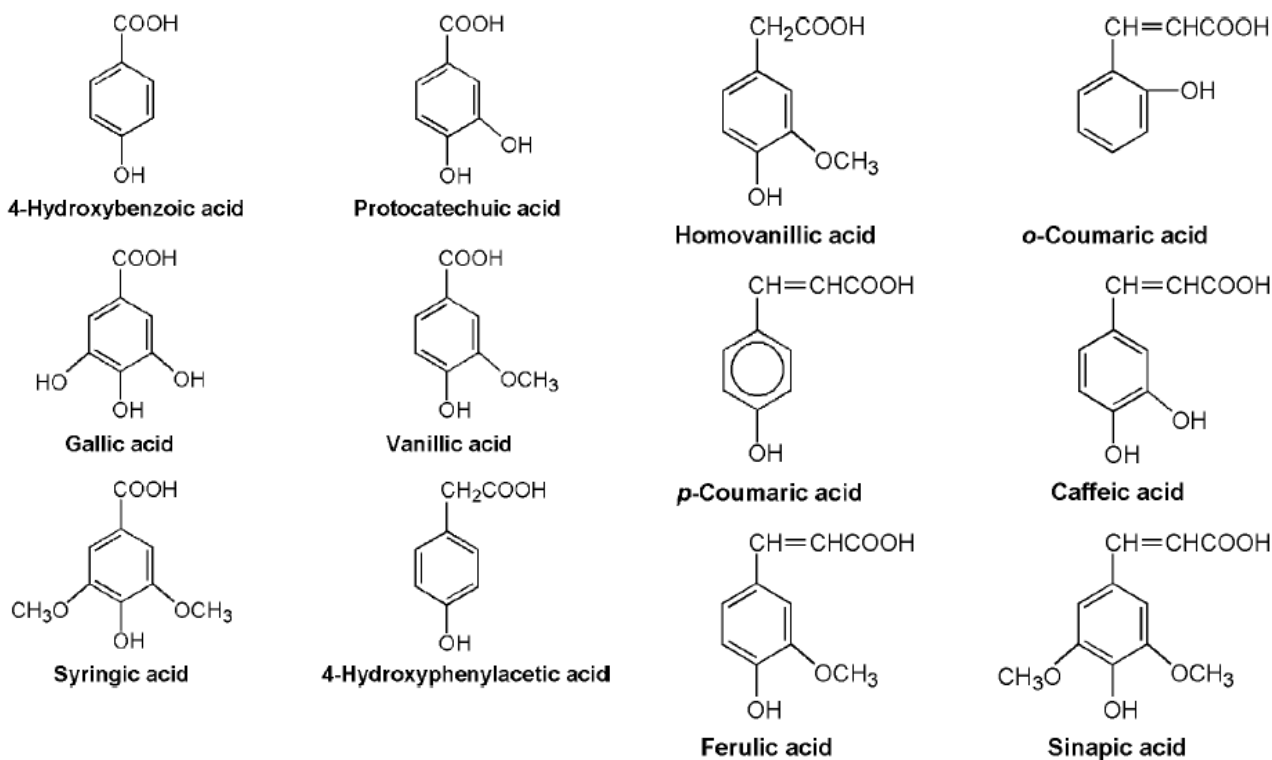
Σεκοϊροειδή. Δομικά, είναι δικυκλικά συντηγμένα κυκλοπεντανο-πυράνια. Η διάσπαση ενός δεσμού στο δακτύλιο κυκλοπεντανίου δημιουργεί την κατηγορία γνωστή ως σεκοϊροειδή. Κύριες ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η ελευρωπαΐνη και οι γλυκοζίτες της.

Λιγνάνες. Οι ενώσεις αυτές είναι προϊόντα του διμερισμού δύο φαινυλοπροπενίων ή πρόδρομων φαινυλοπροπενίων (C6-C3 διμερή). Οι λιγνάνες πινορεξινόλη και 1-ακετοξυπινορεξινόλη απαντώνται στο ελαιόλαδο και στο πυρηνέλαιο.

Υδροξυ-ισοχρωμάνες. Πρόκειται για ενώσεις που προέρχονται από την αντίδραση μεταξύ της υδροξυτυροσόλης και των αρωματικών αλδευδών (όπως η βανιλίνη) και συνήθως χρησιμοποιείται το ελαϊκό οξύ ως καταλύτης (Σχήμα 14). Η 1-φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνη και η 1-(3'-μεθοξυ-4'-υδροξυ)φαινυλ-6,7-διυδροξυισοχρωμάνη βρίσκονται στο ελαιόλαδο και στο πυρηνέλαιο σε πολύ μικρές ποσότητες.



Σχήμα 14. Σύνθεση της υδροξυ-ισοχρωμάνης

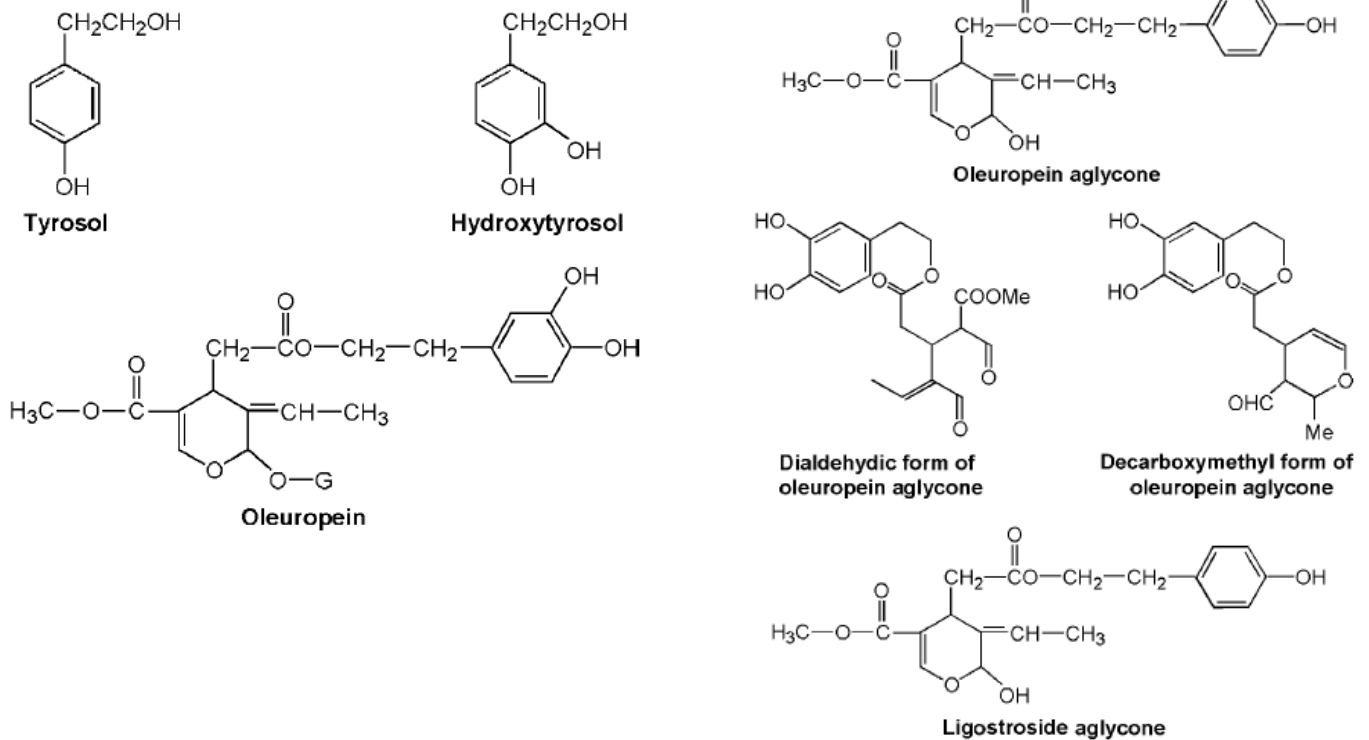


Σχήμα 15. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: φαινολικά οξέα

Για την απομόνωση και την ανάλυσή τους, διαχωρίζεται το πολικό μέρος του εκχυλίσματος μεθανόλης-νερού που περιέχει ελεύθερες φαινόλες και φαινολικά οξέα (Σχήμα 15) και το λιγότερο πολικό μέρος που περιέχει αγλυκόνες ελευρωπαΐνης, διακετοξυ- και διαλδεϋδικές μορφές των αγλυκονών, φλαβονοειδή (λουτεολίνη, απιγενίνη), λιγνάνες: 1-ακετοξυπινορεζινόλη και πινορεζινόλη, ελενολικό οξύ και κιναμωμικό οξύ (Σχήμα 16-19).

Οι Litridou et al., 1999 ανέφεραν την παρουσία ενός εστέρα τυροσόλης με ένα δικαρβοξυλικό οξύ σε εκχύλισμα φαινολικών συστατικών από ελαιόλαδο. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι το συνολικό περιεχόμενο των φαινολών και των ο-διφαινολών ήταν υψηλότερο στο λιγότερο πολικό τμήμα των εκχυλισμάτων μεθανόλης- νερού. Οι γλυκοζίτες βρέθηκαν ότι υπάρχουν μόνο σε ίχνη.

Tyrosol, hydroxytyrosol and derivatives

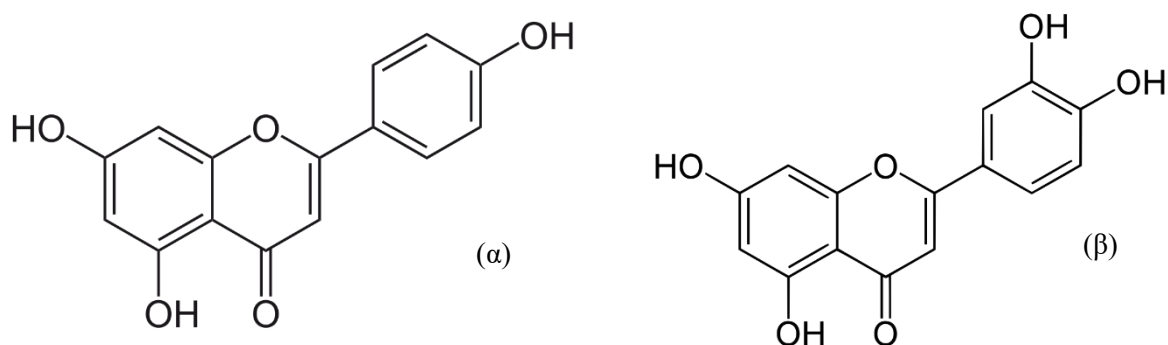


Σχήμα 16. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη και παράγωγα

Η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ελαίου. Έχει αναφερθεί μεγάλο εύρος τιμών (50-1000 mg/kg ελαίου), αλλά οι τιμές είναι συνήθως μεταξύ 100 και 300 mg/kg ελαίου. Η ποικιλία, το σύστημα εξαγωγής και οι συνθήκες επεξεργασίας του ελαιόλαδου αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για το περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών. Υπάρχουν αναφορές ότι το ελαιόλαδο ή και το πυρηνέλαιο μπορεί να έχουν πικρή γεύση, όταν η περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά υπερβαίνει τα 300 mg/kg ελαίου. Ωστόσο, μία υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά ενισχύει τη διάρκεια ζωής του ελαιόλαδου, και υπάρχει μία καλή συσχέτιση μεταξύ της σταθερότητας και της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινόλες. Μεταξύ των διαφόρων φαινολικών ενώσεων που εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση, η υδροξυτυροσόλη βρέθηκε ότι είναι πιο ισχυρή και πιο αποτελεσματική από το εμπορικό αντιοξειδωτικό βουτυλιωμένο υδροξυ τολουόλιο (BHT) (Boskou, 2011).

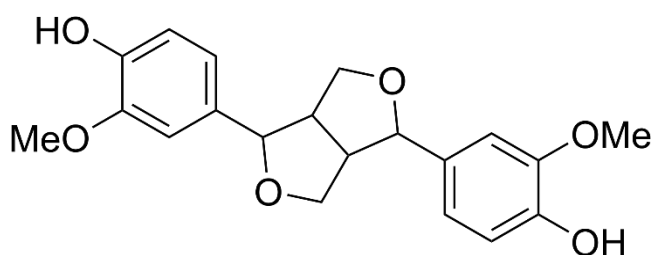
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από το σύστημα που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Τα συστήματα πίεσης και φυγοκέντρησης δύο φάσεων δίνουν έλαιο με υψηλότερο περιεχόμενο φαινολικών συστατικών.

Στα τριφασικά φυγοκεντρικά συστήματα, η ελαιόμαζα αραιώνεται με νερό και μέρος των φαινολών χάνεται στο νερό (Di Giovacchino et al., 2002).



Σχήμα 17. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: φλαβονοειδή, απιγενίνη (α) και λουτεολίνη (β)

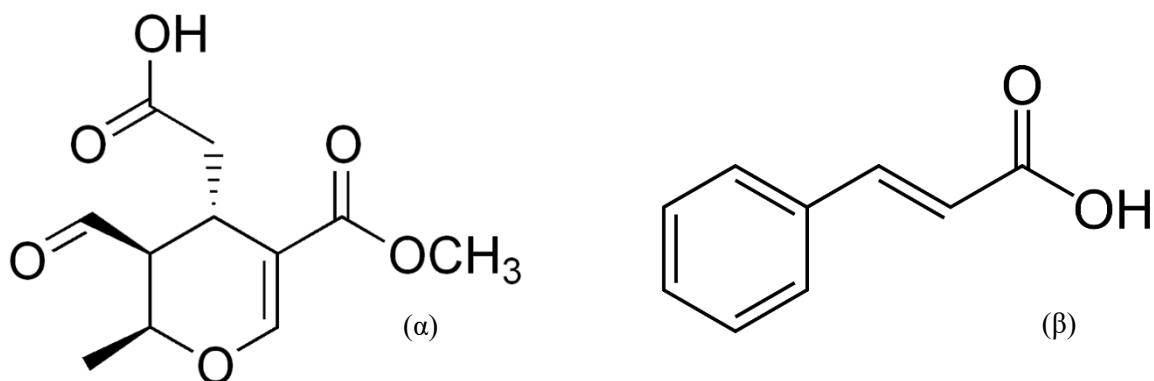
Η μέθοδος επεξεργασίας των ελαιόκαρπων είναι επίσης σημαντική. Οι πετρόμυλοι δίνουν έλαιο με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, ενώ οι θραυστήρες με χρήση σφυριών δίνουν έλαια με χαρακτηριστικά υψηλή περιεκτικότητα σε αυτά. Αυτό υποδηλώνει μία διαφορά στην ενζυμική υδρολυτική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του θρυμματισμού, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναβάθμιση της ποιότητας των εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων (Boskou, 2011).



Σχήμα 18. Δομές των κυριότερων φαινολικών ενώσεων που αναφέρονται στο ελαιόλαδο: λιγνάνες (πινορεσινόλη)

Οι περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις προσδίδουν οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες στο ελαιόλαδο και κατ' επέκταση στο πυρηνέλαιο. Οι μεταβολές στις πτητικές και φαινολικές ενώσεις λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και του χρόνου μάλαξης του ελαιόκαρπου έχουν μελετηθεί εκτεταμένα από τους (Kalua, Bedgood, Bishop, & Prenzler, 2006). Οι Servili et al., 2008 έδειξαν ότι ο έλεγχος της συγκέντρωσης οξυγόνου στην ελαιόμαζα κατά τη διάρκεια της μάλαξης μπορεί να είναι μία νέα τεχνολογική παράμετρος που ρυθμίζει τη δραστηριότητα των

ενζύμων (λιποξειγενάση, υπεροξειδάση, φαινολοξειδάση) και επηρεάζει τη σύσταση σε φαινολικά και πτητικά συστατικά των παραγόμενων ελαίων, και προτείνει μία προσέγγιση που βασίζεται στην παρακολούθηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα και του οξυγόνου κατά τη βιομηχανική μάλαξη της ελαιόμαζας, και στην καθιέρωση της σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης των αερίων και της σύστασης των φαινολικών συστατικών.



Σχήμα 19. Συγγενείς μη φαινολικές ενώσεις εκχυλισμένες με φαινόλες (α: ελενολικό οξύ, β: κινναμωμικό οξύ)

Η σύσταση των κύριων φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου και του πυρηνέλαιου παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συγκέντρωση των κυριότερων φαινολικών συστατικών ελαιόλαδου και πυρηνέλαιου

Φαινολικό συστατικό (mg/kg)	Πυρηνέλαιο	Ελαιόλαδο
Γαλλικό οξύ	11-13	34-44
Υδροξυτυροσόλη	8-10	37-41
Τυροσόλη	20-22	24-35
Καφεϊκό οξύ	7-14	20-30
Συριγγικό οξύ	-	15-19
Ελευρωπαΐνη	80-83	120-140
Γλυκοζίτης λιγστροζίδης	27-31	23-35
Γλυκοζίτης ελευρωπαΐνης	23-24	19-24
Φερουλικό οξύ	12-13	4-6
Βανιλικό οξύ	8-11	

Εκτός από το πυρηνέλαιο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μόνο το 1-2% της συνολικής περιεκτικότητας των ελαιοκαρπων σε φαινολικά συστατικά μεταβαίνει στο ελαιόλαδο και το υπόλοιπο 53% και 45% παραμένει στα υγρά απόβλητα και στερεά παραπροϊόντα (ελαιοπυρήνας), αντίστοιχα (Takac & Karakaya, 2012). Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του ελαιοπυρήνα κυμαίνεται από 10 έως 40 mg γαλλικού οξέος (GAE)/g ξηρής πρώτης ύλης (Seçmeler et al., 2018). Η συγκέντρωση των κυριότερων επιμέρους φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Συγκέντρωση των κυριότερων φαινολικών συστατικών ελαιοπυρήνα

Φαινολικό συστατικό (mg/g)	Ελαιοπυρήνας
Υδροξυτυροσόλη	0,6-8,7
Καφεϊκό οξύ	0,002-0,03
Ελευρωπαΐνη	1,2-13,5
Φερουλικό οξύ	0,05-0,71
Βανιλλικό οξύ	0,07-1,01
Βανιλίνη	0,9-3,6
Κουμαρικό οξύ	0,09-0,49
Απιγενίνη	0,4-0,6
Ρουτίνη	0,2-1,7
Λουτεολίνη	0,02-0,14

Κεφάλαιο 2. Εκχύλιση στερεού-υγρού

2.1 Εισαγωγή

Η εκχύλιση (extraction) είναι μία διεργασία κατά την οποία ορισμένες ουσίες ενός στερεού ή ενός υγρού μίγματος διαλύονται ή εκκλύονται με τη βοήθεια ενός υγρού διαλύτη. Το εκχύλισμα αποτελείται από το διαλύτη και τις βασικές/πολύτιμες ουσίες, που μεταφέρονται στο διαλύτη από την πρώτη ύλη. Σε σύγκριση με άλλες διεργασίες διαχωρισμού απαιτείται απομάκρυνση του διαλύτη και καθαρισμός των πολύτιμων ουσιών (Aguilera, 2003, Sancey, 2002, Sattler & Feidt, 1995).

Η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μία διαδικασία διαχωρισμού, όπου ορισμένες ουσίες διαλύονται από μία στερεή μήτρα με τη βοήθεια ενός διαλύτη δημιουργώντας ένα εκχύλισμα. Ο διαλύτης εκχύλισης θα πρέπει να είναι ικανός (έχοντας κατάλληλες ιδιότητες) για να διαλύσει τις ουσίες-στόχους από το αδιάλυτο διαπερατό στερεό, καθιστώντας την επιλογή του σημαντική για την ποσοτική απομάκρυνσή τους και την απόδοση της μεθόδου. Το εκχυλιζόμενο διαλυτό κλάσμα ονομάζεται «διαλυμένη ουσία» (solute, extrate) και το προκύπτον διάλυμα της διαλυμένης ουσίας ονομάζεται «εκχύλισμα» (extract). Ο διαλύτης ανακτάται και επαναχρησιμοποιείται περαιτέρω στη διαδικασία της εκχύλισης.

Η εκχύλιση στερεού-υγρού έχει ποικίλες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, όπου χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία πολλών προϊόντων τροφίμων, όπως η ζάχαρη, τα εδάδια έλαια κλπ., ή για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών ή/και την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών από πρώτες ύλες. Ειδικότερα, η εκχύλιση εφαρμόζεται στην ελαιουργική βιομηχανία για την ανάκτηση ελαίων και άλλων σημαντικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους (αρωματικά, αντιοξειδωτικά συστατικά κλπ.).

Ο σκοπός μίας διεργασίας εκχύλισης συνδέεται με τη χρησιμότητα ή μη της διαλυμένης ουσίας. Έτσι, ορισμένα θρεπτικά συστατικά μπορεί να αποτελούν τη διαλυμένη ουσία σε μία διεργασία εκχύλισης, τα οποία έχουν διαχωριστεί από κάποιες πηγές τροφίμων και έπειτα από καθαρισμό ή εξευγενισμό δύνανται να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για κατανάλωση π.χ. τα έλαια που εκχυλίζονται από ελαιούχους σπόρους. Η εκχύλιση εφαρμόζεται βιομηχανικά για την ανάκτηση λιπιδίων από ελαιούχους σπόρους, από καρπούς και υπολείμματα αγροτικής παραγωγής, για την παραλαβή πρωτεϊνών, φαρμακευτικών ουσιών από φυτά και υδροκολλοειδών από άλγη ή για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών και τοξινών από τρόφιμα και ζωοτροφές. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η εκχύλιση συμβαίνει ως αποτέλεσμα της επίδρασης της εκλεκτικότητας του διαλύτη στη διαλυμένη ουσία (Aguilera, 2003, Sattler & Feidt, 1995, Coulson, Richardson, Backhurst, & Harker, 1993). Ωστόσο, ο σχεδιασμός και

η σωστή λειτουργία της εκχύλισης είναι κρίσιμες παράμετροι, ώστε η διεργασία να είναι οικονομικά αποδοτική.

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης είναι επίσης σημαντική. Πρόσφατα, η ανάπτυξη και χρήση φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης είναι όλο και πιο δημοφιλείς, δεδομένου ότι αυτές βελτιώνουν την απόδοση της εκχύλισης, μειώνοντας παράλληλα την υποβάθμιση των ενώσεων της διαλυμένης ουσίας. Διάφορες τεχνικές υποβοηθούμενης εκχύλισης έχουν εφαρμοστεί για την ανάκτηση πολύτιμων ουσιών από φυτικές πηγές όπως με χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων, ενζύμων, ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και υπερυψλής υδροστατικής πίεσης (Bagherian, Ashtiani, Fouladitajar, & Mohtashamy, 2011, Minjares-Fuentes et al., 2014, Bosiljkov et al., 2017, Prasad, Yang, Zhao, Ruenroengklin, & Jiang, 2009, Shouqin, Jun, & Changzheng, 2005).

Οι τεχνικές εκχύλισης για την παραλαβή εκχυλισμάτων που προορίζονται για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων σχεδιάζονται, ώστε να μεγιστοποιούν το εκχύλισμα βασικών συστατικών, ενώ παράλληλα να ελαχιστοποιούν τα συν-εκχυλιζόμενα ανεπιθύμητα συστατικά που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα και τη δραστικότητα τους. Ακόμη, επιλέγονται μέθοδοι, οι οποίες δεν υποβαθμίζουν τα συστατικά μέσω θερμικής, οξειδωτικής και άλλου τύπου αποικοδόμησης και ελαχιστοποιούν την παρουσία τοξικών διαλυτών. Ενώ, τέλος, οι τεχνικές που εφαρμόζονται στη βιομηχανία πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια, όπως να είναι βιώσιμες, οικονομικά εφικτές και μη χρονοβόρες διαδικασίες.

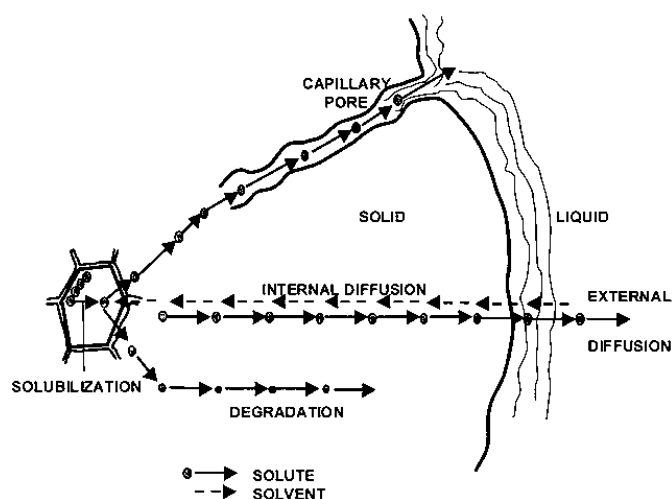
Οι περισσότερες εμπορικές τεχνολογίες, που είναι διαθέσιμες ως τώρα, βασίζονται στην ξήρανση του στερεού υλικού, την άλεσή του και την εκχύλισή του με διαλύτες κατάλληλους για τη βιομηχανία τροφίμων με στόχο την ανάκτηση εκχυλισμάτων πλούσιων στις ενώσεις-στόχους. Τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται, εν συνεχεία συμπυκνώνονται σε ένα τελικό προϊόν εμπλουτισμένο στις επιθυμητές δραστικές ενώσεις (Mello, Petrus, & Hubinger, 2010, Shofinita, Feng, & Langrish, 2015). Η εφαρμογή τεχνολογιών εκχύλισης πρέπει να είναι σύμφωνη με την ποιότητα του προϊόντος, τις εμπορικές προδιαγραφές και απαιτήσεις, και το συγκεκριμένο τεχνολογικό επίπεδο που διατίθεται. Στις επόμενες ενότητες αναπτύσσονται οι βασικές αρχές της εκχύλισης, τα κύρια βήματα της μεθοδολογίας και η βασική θεωρία των συμβατικών και των καινοτόμων μεθόδων ανάκτησης, που μελετήθηκαν και αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

2.2 Αρχή μεθόδου εκχύλισης στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού- υγρού είναι μία διαδικασία διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά των διαλυμένων ουσιών από μία στερεή ύλη σε ένα διαλύτη. Από την άποψη της μηχανικής, αποτελεί μία πολυσύνθετη, πολλών φάσεων και μη σταθερή διαδικασία μεταφοράς μάζας (Aguilera, 2003).

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, μία σειρά από παράλληλα και διαδοχικά στάδια λαμβάνουν χώρα μεταξύ του διαλύματος και του διαλύτη που περιλαμβάνουν (Aguilera, 2003) (Σχήμα 20):

- Τη διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μάζα,
- Τη διαλυτοποίηση των ενώσεων
- Την κίνηση του διαλύματος από το εσωτερικό της στερεής μάζας στην επιφάνειά του
- Τη μετακίνηση των εκχυλισμένων ενώσεων από την εσωτερική επιφάνεια του στερεού προς την όγκο του διαλύματος και τέλος
- Το διαχωρισμό του εκχυλίσματος από το διαλύτη.



Σχήμα 20. Τα βασικά στάδια της εκχύλισης ενός στερεού σώματος με χρήση διαλύτη

Ο χρόνος που απαιτείται από το διαλύτη για να επιδράσει με το στερεό υλικό είναι σημαντικός για την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών και εξαρτάται όχι μόνο από τη διαλυτότητά τους, αλλά και από τη θερμοκρασία της εκχύλισης, την επιφάνεια του στερεού υλικού, το ιξώδες του διαλύτη και τη ροή του διαλύτη (Takeuchi et al., 2009). Σε πολυσύνθετα υλικά, οι διαφορετικές χημικές ενώσεις απομακρύνονται από το βασικό υλικό προς το εκχύλισμα με διαφορετικό ρυθμό. Συνεπώς, ο συνολικός ρυθμός της διαδικασίας εκχύλισης καθορίζεται από το βήμα που έχει τον αργότερο ρυθμό (στάδιο ελέγχου ταχύτητας). Σε εκχυλίσματα τροφίμων, το στάδιο ελέγχου του ρυθμού είναι συνήθως η μεταφορά διαλύτη από το διάλυμα στην επιφάνεια και στο εσωτερικό της στερεής μήτρας (Aguilera, 2003, Takeuchi et al., 2009, Kemper, 2005). Η ικανότητα ανάκτησης των βασικών ενώσεων-στόχων εξαρτάται από τη

διαλυτότητα των ενώσεων στον επιλεγμένο διαλύτη, την αλληλεπίδρασή τους, την επίδραση επί του πορώδους του μίγματος και τη θέση αυτών των ενώσεων μέσα στη μάζα του στερεού. Ως εκ τούτου, η επιλογή του διαλύτη και τα δομικά χαρακτηριστικά του φυτικού ιστού που υπόκειται εκχύλιση είναι μείζονος σημασίας.

2.2.1 Μεταφορά μάζας σε διεργασίες εκχύλισης στερεού-υγρού

Ο ρυθμός της εκχύλισης από ένα πορώδες στερεό σωματίδιο είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, καθώς είναι δύσκολο να καθοριστεί το μέγεθος των πόρων, μέσω των οποίων πρέπει να λάβει χώρα η μεταφορά μάζας. Η μεταφορά της διαλυμένης ουσίας (solute) στο εσωτερικό των στερεών σωματιδίων συμβαίνει λόγω της βαθμίδας της συγκέντρωσης στη διεπιφάνεια στερεού-υγρού και περιγράφεται μαθηματικά με την εξίσωση της διάχυσης. Η εξίσωση που περιγράφει αυτό το φαινόμενο βασίζεται στον νόμο του Fick: (Takeuchi et al., 2009, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994, Coulson et al., 1993):

$$\frac{N_C}{A_T} = -D \frac{dC_C}{dz} \quad (\text{Εξ. 1})$$

Όπου N_C είναι ο ρυθμός διάλυσης της διαλυμένης ουσίας C στο διάλυμα (kg/s)

A_T είναι το εμβαδό της διεπιφάνειας στερεού-υγρού (m^2)

C_C είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας C στο διάλυμα (kg/m^3),

Z είναι η απόσταση μέσα στο πορώδες της στερεής μήτρας (m)

D είναι ο συντελεστής διάχυσης (m^2/s).

Το αρνητικό σύμβολο παρέχει ένα θετικό όρο ροής, καθώς η κλίση είναι αρνητική (η ροή λαμβάνει χώρα μειώνοντας τη βαθμίδα συγκέντρωσης, από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση).

Ο συντελεστής διάχυσης (D) είναι μία σημαντική παράμετρος στο μοντέλο της διάχυσης και η τιμή του κυμαίνεται μεταξύ 10^{-9} - $10^{-10}m^2/s$ για τα στερεά. Σε στερεά τρόφιμα, η μεταφορά μάζας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος, το σχήμα και τον αριθμό των πόρων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η διάχυση εκφράζεται ως αποτελεσματική διάχυση D_{eff} και ορίζεται ως (Takeuchi et al., 2009, Aguilera, 2003):

$$D_{eff} = \frac{\varepsilon}{\tau} D \quad (\text{Εξ. 2})$$

Όπου ε είναι ο χώρος του κενού κλάσματος ή του πορώδους του στερεού

τ είναι ο συντελεστής δαιδαλώδους ή στρεβλότητας των πόρων.

Για τα στερεά, η τιμή του τ κυμαίνεται μεταξύ 2-6 και του πορώδους μεταξύ 0,3-0,8, οπότε η αποτελεσματική διάχυση D_{eff} μπορεί να είναι 6 έως 15 φορές χαμηλότερη από τη διάχυση D .

Για μία ασυνεχή λειτουργία κατά παρτίδες, όπου ο συνολικός όγκος V του διαλύματος θεωρείται ότι παραμένει σταθερός, η μεταφορά μάζας της διαλυμένης ουσίας στην επιφάνεια του στερεού σωματιδίου λαμβάνει χώρα με ταυτόχρονη μοριακά και τυρβώδη φαινόμενα μεταφοράς. Έτσι, ο ρυθμός μεταφοράς της μάζας μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη εξίσωση (Takeuchi et al., 2009, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994, Coulson et al., 1993):

$$N_C = \frac{VdC_C}{dt} = A_T k_L (C_{CS} - C_C) \quad (\text{Εξ. 3})$$

Όπου k_L είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας σε m/s

C_{CS} είναι η συγκέντρωση αναφοράς της διαλυμένης ουσίας C στο διάλυμα σε kg/m^3

C_C είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας C στο διάλυμα κατά τη χρονική στιγμή t σε kg/m^3 .

Ο χρόνος t που παρεμβάλλεται για να αυξηθεί η συγκέντρωση του διαλύματος από την αρχική του τιμή C_{C0} στην τιμή C_C επιτυγχάνεται με ολοκλήρωση της εξίσωσης 3, υποθέτοντας ότι το A παραμένει σταθερό:

$$\int_{C_0}^C \frac{dC_C}{C_{CS} - C_C} = \frac{Ak_L}{V} \int_{t=0}^t dt \quad (\text{Εξ. 4})$$

$$\frac{C_{CS} - C_C}{C_{CS} - C_{C0}} = e^{-(k_L A/V)t} \quad (\text{Εξ. 5})$$

Εάν αρχικά χρησιμοποιείται καθαρός διαλύτης, $C_{C0} = 0$, επομένως:

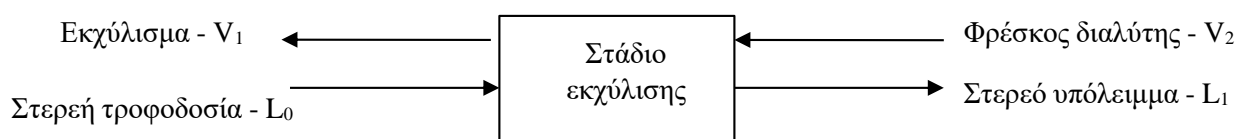
$$1 - \frac{C_C}{C_{CS}} = e^{-(k_L A/V)t} \quad (\text{Εξ. 6})$$

$$C_C = C_{CS} \left(1 - e^{-(k_L A/V)t}\right) \quad (\text{Εξ. 7})$$

2.2.2 Λειτουργία των εκχυλιστήρων με χρήση διαλυτών

Οι τύποι ροής που χρησιμοποιούνται στα συστήματα εκχύλισης μπορεί να περιλαμβάνουν ένα ή πολλαπλά στάδια, όπως επίσης ομορροή ή αντιρροή του διαλύτη.

Η διαδικασία εκχύλισης ενός σταδίου (Σχήμα 21) περιλαμβάνει μόνο ένα στάδιο επαφής της στερεής τροφοδοσίας (L_0) και του φρέσκου διαλύτη (V_2) και διαχωρισμό του προκύπτοντος αδιάλυτου στερεού με φυσικό τρόπο. Η εκχύλιση παράγει δύο εκροές: το εκχύλισμα (V_1), το οποίο αποτελείται από σχετικά μεγάλη ποσότητα διαλύτη και το υπόλειμμα (L_1) που περιέχει το αδιάλυτο στερεό. Λόγω της χαμηλής ανάκτησης της παραγόμενης διαλυμένης ουσίας και του αραιού διαλύματος που παράγεται, αυτός ο τύπος ροής χρησιμοποιείται σπάνια σε βιομηχανική κλίμακα (Couper, Penney, Fair, & Walas, 2012, Tandon & Rane, 2008, Xu & Diosady, 2003, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994).



Σχήμα 21. Εκχύλιση στερεού-υγρού ενός σταδίου

Η συνολική εξίσωση του ισοζυγίου μάζας είναι:

$$L_0 + V_2 = L_1 + V_1 = M \quad (\text{Εξ. 8})$$

Όπου M είναι το σημείο του μίγματος στο ενιαίο στάδιο

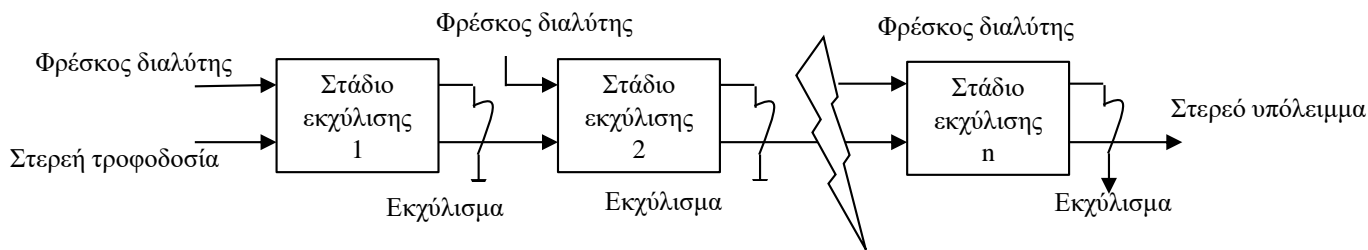
για τη διαλυμένη ουσία A :

$$L_0 y_{A0} + V_2 x_{A2} = L_1 y_{A1} + V_1 x_{A1} = M x_{Am} \quad (\text{Εξ. 9})$$

Όπου y_{A0} , x_{A2} , y_{A1} και x_{A1} είναι τα κλάσματα μάζας της ουσίας A στην τροφοδοσία, στο διαλύτη, στο υπόλειμμα και στο εκχύλισμα, αντίστοιχα.

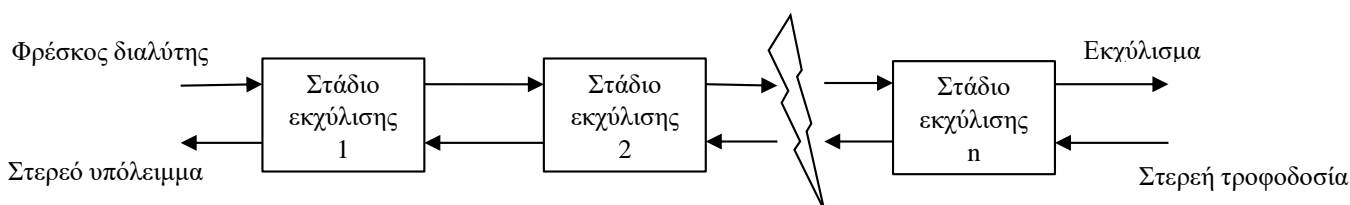
Στην εκχύλιση πολλαπλών σταδίων (Σχήμα 22), φέρονται συνεχώς φρέσκες παρτίδες τροφοδοσίας διαλυτών και στερεών. Οι παραπάνω εξισώσεις ισχύουν για τον υπολογισμό των πολλαπλών σταδίων, καθώς επαναλαμβάνεται η διαδικασία, όπως για ένα μόνο στάδιο. Η εκροή από το πρώτο στάδιο, αποστέλλεται στο δεύτερο στάδιο, όπου αναμιγνύεται με περισσότερο φρέσκο διαλύτη. Ωστόσο, απαιτείται μεγάλη ποσότητα διαλύτη για τη διεργασία

αυτή και στα τελευταία στάδια της εκχύλισης παράγονται αραιά διαλύματα της διαλυμένης ουσίας (Couper et al., 2012, Takeuchi et al., 2009, Tandon & Rane, 2008, Xu & Diosady, 2003, Prabhudesai, 1997).



Σχήμα 22. Εκχύλιση στερεού-υγρού πολλαπλών σταδίων με ομορροή του διαλύτη

Στο σύστημα εκχύλισης πολλαπλών σταδίων με αντιρροή του διαλύτη (Σχήμα 23), η ροή εκροής και υπερχειλίσης ρέει αντίστροφα η μία προς την άλλη. Το σύστημα επιτρέπει υψηλή ανάκτηση από το αρχικό στερεό με εξαιρετικά συμπυκνωμένο τελικό εκχύλισμα, χρησιμοποιώντας τη μικρότερη ποσότητα διαλύτη. Έτσι, η εκχύλιση με αντιρροή μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα του διαλύτη και συνεπώς το λειτουργικό κόστος (Couper et al., 2012, Takeuchi et al., 2009, Tandon & Rane, 2008, Xu & Diosady, 2003, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994).



Σχήμα 23. Εκχύλιση στερεού-υγρού πολλαπλών σταδίων με αντίθετη ροή διαλύτη

2.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εκχύλισης

Η διατήρηση σταθερής ροής ρευστού, πίεσης και θερμοκρασίας και η παροχή επαρκούς χρόνου επαφής μεταξύ του διαλύτη και των στερεών είναι σημαντικές παράμετροι για τις περισσότερες διεργασίες εκχύλισης. Ο έλεγχος του εξοπλισμού και των οργάνων καταγραφής αποτελεί χρήσιμο μέσο για τη μελέτη της απόδοσης των εγκαταστάσεων εκχύλισης. Παράγοντες, όπως το μέγεθος των σωματιδίων του στερεού και ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης πρέπει να λαμβάνονται επίσης υπόψη κατά το σχεδιασμό της λειτουργίας της εκχύλισης.

Η φύση της προς εκχύλιση ουσίας, καθώς και η πρώτη ύλη που πρόκειται να υποβληθεί σε επεξεργασία, θα πρέπει να είναι γνωστές, προκειμένου να επιλεγεί η καλύτερη τεχνολογία εκχύλισης, που θα επιτύχει υψηλή απόδοση ανάκτησης και επίσης υψηλή σταθερότητα της διαλυμένης ουσίας. Έτσι, η επιλογή μίας κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης πηγών/υλικών τροφίμων ή υπολειμμάτων βιομηχανικής επεξεργασίας τροφίμων, υποδεικνύει ποιοτικές και ποσοτικές μελέτες του ακατέργαστου εκχυλίσματος που οδηγούν στην ταυτοποίηση των ενεργών συστατικών του.

i) Διαλύτης

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή συστήματος διαλυτών για την ανάκτηση φυσικών ουσιών από αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα και φυτικές πρώτες ύλες εξαρτάται κυρίως από τα ενεργά συστατικά που περιέχονται σε αυτά και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον προς ανάκτησή τους. Τα ακόλουθα κριτήρια είναι πιθανόν να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή των διαλυτών:

Διαλυτότητα των συγκεκριμένων ουσιών στο διαλύτη. Για παράδειγμα, φυτικά έλαια που αποτελούνται από τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων εκχυλίζονται με εξάνιο, ενώ για την εκχύλιση ελεύθερων λιπαρών οξέων χρησιμοποιούνται περισσότερο πολικές αλκοόλες.

Φυσικές ιδιότητες, όπως η χαμηλή τάση και το ιξώδες. Ο διαλύτης θα πρέπει να είναι ικανός να διαβρέχει τα στερεά και να διεισδύει μέσα από τους πόρους και τους τριχοειδείς σωλήνες του στερεού. Επίσης, το χαμηλό του ιξώδες ενισχύει το ρυθμό διάχυσης στη φάση του διαλύτη.

Ανάκτηση, καθώς ο διαλύτης θα επαναχρησιμοποιηθεί σε επακόλουθες εκχυλίσεις. Εάν χρησιμοποιείται απόσταξη ή εξάτμιση, ο διαλύτης δεν πρέπει να σχηματίζει αζεότροπα και η λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης πρέπει να είναι μικρή.

Κίνδυνοι και κόστος. Ιδανικά, ο διαλύτης πρέπει να μην είναι τοξικός ή επικίνδυνος, να μην αντιδρά εύκολα, να μην είναι εύφλεκτος, και τέλος να είναι αβλαβής για το περιβάλλον και φθηνός. Η αποφυγή της απώλειας των διαλυτών μπορεί να επιτευχθεί μέσω καλύτερου σχεδιασμού της διεργασίας.

Όσον αφορά τη νομοθεσία για τους διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, αυτοί πρέπει να είναι σύμφωνοι κυρίως με τις απαιτήσεις για την ανθρώπινη υγεία. Η παρουσία ιχθάνων διαλυτών, όπως προπάνιο, βουτάνιο, οξικό προπύλιο, οξικό αιθύλιο, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, ακετόνη και υποξείδιο του αζώτου είναι αποδεκτές σε μικρές υπολειμματικές ποσότητες, σύμφωνα με την ορθή βιομηχανική πρακτική (GMP). Επίσης, οι ουσίες όπως το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η αιθυλομεθυλοκετόνη και το διχλωρομεθάνιο κρίθηκαν αποδεκτές, όταν χρησιμοποιούνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες και υφίστανται περιορισμοί όσον αφορά τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα τρόφιμα λόγω της εγγενούς τοξικότητάς τους. Τα επιτρεπτά ημερήσια όρια (PDEs) αυτών των διαλυτών δίνονται με ακρίβεια 0,1 mg/d, και

τα όρια συγκέντρωσης ποικίλουν από 50 έως 3880 ppm, ανάλογα με τον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιείται (Aguilera, 2003, Takeuchi et al., 2009, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994, Coulson et al., 1993, Johnson & Lusas, 1983).

ii) Μέγεθος σωματιδίων

Στους ελαιούχους σπόρους, η κυτταρική δομή είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Αν και το έλαιο μπορεί να βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικούς χώρους, τριχοειδείς σωλήνες ή κυτταρικές δομές. Έτσι, η επιτυχία της εκχύλισης με διαλύτη εξαρτάται άμεσα από τη μορφολογία της πρώτης ύλης. Ένα από τα στάδια προεπεξεργασίας που απαιτείται είναι η άλεση της πρώτης ύλης. Η άλεση πριν από την εκχύλιση με διαλύτη προάγει την αύξηση της επιφάνειας επαφής μεταξύ του διαλύτη και της στερεής ουσίας. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός μεταφοράς της διαλυμένης ουσίας. Ως εκ τούτου, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Έτσι, διάφοροι ελαιούχοι σπόροι, όπως η σόγια, επεξεργάζονται σε νιφάδες, μειώνοντας έτσι το πάχος τους, την απόσταση και τον αριθμό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ωστόσο, πρέπει να δοθεί προσοχή στη θέρμανση του δείγματος και στο χρόνο έκθεσής του στο οξυγόνο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας άλεσης (κονιοποίησης), γιατί μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια αντιοξειδωτικών συστατικών, ενώ έχει βρεθεί ότι η κονιοποίηση φρέσκων δειγμάτων με τη χρήση υγρού αζώτου οδηγεί σε ελαχιστοποίηση τέτοιων απωλειών πριν την εκχύλιση (Garzón & Wrolstad, 2009). Παρόλο που μέσω της κονιοποίησης, ο διαλύτης διαχέεται σε μεγάλες επιφάνειες ανταλλαγής και σε σύντομες διαδρομές διάχυσης, οπότε και πραγματοποιείται ταχύτερη και αποδοτικότερη εκχύλιση, ένα υπερβολικά μικρό μέγεθος κόκκου μπορεί να προκαλέσει συσσωμάτωση και να δημιουργήσει μεγαλύτερη δυσκολία στη διεύθυνση του διαλύτη στο υλικό (Takeuchi et al., 2009, Kemper, 2005, Birch & Zealand, 2000, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994, Coulson et al., 1993).

iii) Υγρασία στερεού υλικού

Η υγρασία της πρώτης ύλης μπορεί να ανταγωνιστεί το διαλύτη εκχύλισης για τη διάλυση της διαλυμένης ουσίας, επηρεάζοντας τη μεταφορά μάζας. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις, η υγρασία είναι απαραίτητη για να επιτρέψει τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας, όπως στην εκχύλιση του καφέ. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις το υλικό ξηραίνεται υπό συνθήκες που δεν προκαλούν αποικοδόμηση των συστατικών. Στους ελαιούχους σπόρους, η περιεχόμενη υγρασία πρέπει να είναι κάτω από 8% σε ξηρή βάση (Takeuchi et al., 2009).

Η πιο δημοφιλής τεχνική ξήρανσης που εφαρμόζεται στις βιομηχανίες φρούτων και λαχανικών είναι η ξήρανση με χρήση θερμού αέρα (hot air drying, HAD) καθώς αποτελεί μία τεχνική μειωμένου κόστους εξοπλισμού και λειτουργίας (Jayaraman & Das Gupta, 1992). Εκτός αυτής,

εφαρμόζονται και άλλου τύπου τεχνικές ανάλογα με την επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος και το κόστος λειτουργίας, όπως μεταξύ άλλων, η ξήρανση υπό κενό (vacuum drying, VD), η ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying, FD), η ξήρανση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες (Atmospheric drying, ATD), η ξήρανση με μικροκύματα (microwave drying, MD), ή με μικροκύματα και κενό (microwave vacuum drying, MVD), η ξήρανση με υπέρθερμο ατμό, κ.α. (Sablani, 2006, Sagar & Suresh Kumar, 2010, Wojdyło, Figiel, Krzysztof, & NowickaJan, 2014). Η ξήρανση υπό κατάψυξη χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς λόγω της υψηλής ποιότητας του τελικού προϊόντος που επιτυγχάνει. Παρόλα αυτά η διαδικασία είναι αργή και συνεπάγεται υψηλό λειτουργικό κόστος, λόγω της ανάγκης παραγωγής και διατήρησης σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και πίεσης (Zielinska, Zapotoczny, Alves-Filho, Eikevik, & Blaszcak, 2013).

iv) Θερμοκρασία

Η διαλυτότητα του προς εκχύλιση υλικού και η διάχυσή του αυξάνεται κανονικά με αύξηση της θερμοκρασίας και έτσι βελτιώνεται ο ρυθμός της εκχύλισης. Ωστόσο, στη βιομηχανία τροφίμων, η υψηλότερη θερμοκρασία, όπως στους ελαιούχους σπόρους, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως η αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Επιπλέον, ο διαλύτης πρέπει να παραμένει σε υγρή κατάσταση. Για παράδειγμα, το εξάνιο που έχει σημείο ζέσεως 64-69 °C, η μέγιστη θερμοκρασία για την αποφυγή βρασμού είναι 63 °C (Takeuchi et al., 2009, Aguilera, 2003, Kemper, 2005, Prabhudesai, 1997, Wakeman, 1994, Coulson et al., 1993).

v) Ανάδευση του ρευστού

Η ανάδευση του διαλύτη είναι σημαντική καθώς αυξάνει τη διάχυση και το ρυθμό μεταφοράς του υλικού από την επιφάνεια των σωματιδίων στο μεγαλύτερο μέρος του διαλύματος.

2.3 Μέθοδοι εκχύλισης και ανάκτησης των βιοδραστικών ενώσεων

Η επιλογή της κατάλληλης διαδικασίας εκχύλισης εξαρτάται αρχικά από την κατηγορία των ενώσεων προς ανάκτηση αλλά και από τον τύπο και την κατάσταση της προς εκχύλιση πρώτης ύλης. Όπως αναφέρθηκε, η αποτελεσματικότητα της στερεής-υγρής εκχύλισης βασίζεται σε μία σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανόμενων της πολικότητας του διαλύτη, του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος, της αναλογίας στερεού-υγρού, και άλλων συνθηκών εκχύλισης όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία. Επιτυχής θεωρείται η εκχύλιση κατά την οποία τα συστατικά-στόχοι διαλύονται και μεταφέρονται στον όγκο του διαλύτη έως ότου επιτευχθεί μία συγκέντρωση ισορροπίας (Khanal, Howard, & Prior, 2010, Leusink, Kitts, Yaghmaee, &

Durance, 2010, Z. Xu, 2012). Ως εκ τούτου, η αύξηση της αναλογίας στερεού-διαλύτη δύναται να βελτιώσει την απόδοση της εκχύλισης.

Η πιο απλή εκχύλιση ελαίου από ελαιούχους σπόρους και συχνά χρησιμοποιούμενη εκχύλιση από τη βιομηχανία είναι η συμβατική εκχύλιση στερεού-υγρού, κατά την οποία πραγματοποιείται διαβροχή του δείγματος από το διαλύτη εκχύλισης και ανάδευσή του σε αντιδραστήρες ασυνεχούς (batch) ή συνεχούς λειτουργίας (continuous) (White, Rice, & Howard, 2012). Αντίθετα, σε εργαστηριακή κλίμακα, η πιο διαδεδομένη μεθοδολογία εκχύλισης είναι η εξαντλητική εκχύλιση με συσκευή Soxhlet. Η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα που αφορά τη συγκεκριμένη εργασία/διατριβή περιλαμβάνει την ανάκτηση του πυρηνέλαιου και την παραλαβή των πολύτιμων βιοδραστικών συστατικών, είτε μέσω του περιεχόμενου ελαίου (στερόλες, σκουαλένιο, φαινολικά συστατικά) είτε απευθείας από τον ελαιοπυρήνα (φαινολικά συστατικά). Ανάλογα με το είδος της ουσίας-στόχο που πρόκειται να ανακτηθεί, πρέπει να γίνει ο κατάλληλος σχεδιασμός της διεργασίας της εκχύλισης που θα περιλαμβάνει την κατάλληλη μέθοδο εκχύλισης, τον επιθυμητό διαλύτη και όλες τις άλλες παραμέτρους εκχύλισης που συζητήθηκαν.

Τα τελευταία χρόνια οι συμβατικές μέθοδοι τείνουν να αντικατασταθούν από εναλλακτικές διεργασίες εκχύλισης, που αποσκοπούν στη μείωση του χρόνου της διεργασίας και του όγκου του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Ανάμεσα στις διεργασίες αυτές είναι η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα, η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπέρηχους και η συνδυαστική μέθοδος αυτών, οι οποίες έχουν ακόμη ένα πλεονέκτημα καθώς εφαρμόζονται και σε μονάδες συνεχούς λειτουργίας. Η αρχή λειτουργίας της εκάστοτε τεχνικής, καθώς και τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους, θα σχολιαστούν εν συντομία στις ακόλουθες παραγράφους.

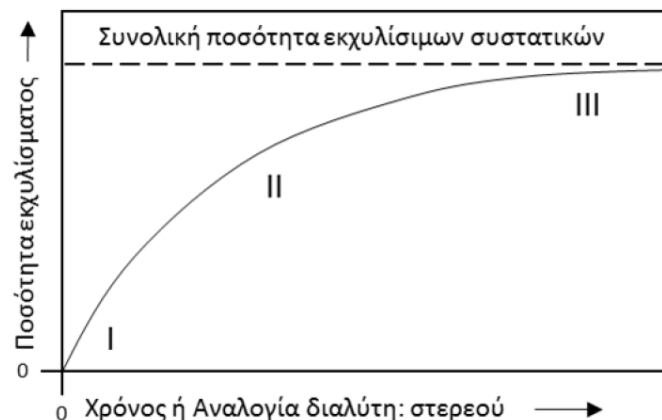
2.4 Καμπύλη εκχύλισης

Σύμφωνα με τον Aguilera (2003), η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι διαδικασία διαχωρισμού που περιλαμβάνει την επαφή μεταξύ μίας υγρής και μίας στερεής φάσης επιτρέποντας τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας από τη στερεή μήτρα στο διαλύτη. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ελαιούχων στερεών υλικών, η συγκέντρωση του ελαίου στη στερεή μήτρα ποικίλλει συναρτήσει του χρόνου, καθιστώντας εφικτή την ύπαρξη μίας σειράς σταδίων κατά την περίοδο επαφής του διαλύτη και του στερεού, όπως:

- Εξωτερική διάχυση που περιλαμβάνει τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας από την επιφάνεια της στερεής μήτρας στο διάλυμα (φάση I). Η αρχική εκχύλιση του υλικού λαμβάνει χώρα ταχέως και εξαρτάται από τη διαλυτότητα του εκχυλίσματος στο διαλύτη. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, οι συνθήκες ισορροπίας διέπουν τη διάχυση της διαλυμένης ουσίας στο διαλύτη.

- Εσωτερική διάχυση που περιλαμβάνει τη διείσδυση και τη διάχυση του διαλύτη διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος της μήτρας έως ότου φθάσει στα λιπαρά σώματα, και τη μεταφορά του εκχυλίσματος (έλαιο/διαλύτης) προς το εξωτερικό μέρος της στερεής μήτρας (φάση II). Η φάση αυτή αντιστοιχεί σε μία ενδιάμεση περιοχή, όπου η διαδικασία εκχύλισης ελέγχεται ενθαλπικά (δηλαδή, η αλληλεπίδραση του διαλύτη, του εκχυλίσματος και της μήτρας θα πρέπει να διαταραχθεί) που δείχνει ένα βραδύτερο ρυθμό εκχύλισης. Έτσι μία μετάβαση σε κινητική ελεγχόμενη από διάχυση λαμβάνει χώρα σε αυτή τη φάση.
- Εσωτερική διάχυση στους τριχοειδείς πόρους της μήτρας (φάση III). Η τελευταία αυτή φάση αντιπροσωπεύει το τμήμα της διαδικασίας εκχύλισης κατά το οποίο πραγματοποιείται περιορισμένη διάχυση, είτε λόγω της περιορισμένης διάχυσης των εκχυλίσμων ενώσεων εντός του υλικού, είτε λόγω της περιορισμένης πρόσβασης του διαλύτη προς αυτές (Kemper, 2005).

Στο Σχήμα 24 φαίνεται το θεωρητικό προφίλ της εκχύλισης από μία στερεή μήτρα. Ο άξονας Y αντιπροσωπεύει την ποσότητα των εκχυλιζόμενων ενώσεων, ενώ στον άξονα X μπορεί να υπάρχει η ποσότητα του διαλύτη ή ο χρόνος σε ένα δυναμικό σύστημα ή σε ένα στατικό σύστημα (Perry, Green, & Maloney, 1997).



Σχήμα 24. Θεωρητική καμπύλη εκχύλισης στερεού-υγρού ως προς το χρόνο ή το διαλύτη

Στην εκχύλιση στερεού-υγρού, ένα μέρος του στερεού θεωρείται ως αδρανές και είναι αισθητά αδιάλυτο στο διαλύτη. Ωστόσο, η φύση της στερεής δομής μπορεί να αλλάξει την κινητική της μεταφοράς μάζας. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και σύμφωνα με το νόμο του Fick, η διάχυση των διαλυτών συστατικών εξαρτάται από τη διαφορά της συγκέντρωσης που υπάρχει μεταξύ της στερεής φάσης (υψηλής συγκέντρωσης διαλυτών συστατικών) και της υγρής φάσης (χαμηλής συγκέντρωσης). Αυτή η διαφορά μεταβάλλεται και δημιουργεί μία ισορροπία μεταξύ

των δύο φάσεων (Perry et al., 1997), όπου η διάχυση γίνεται αμελητέα, ακόμη και όταν ο χρόνος επαφής είναι άπειρος υπό τις προκαθορισμένες συνθήκες. Όμως στην περίπτωση που η υγρή φάση ανανεώνεται συνεχώς, η διάχυση εξελίσσεται μέχρις ότου η στερεή φάση απογυμνωθεί. Ο πρώτος νόμος του Fick χρησιμοποιείται σε συνθήκες σταθερής κατάστασης και ο δεύτερος νόμος του Fick εφαρμόζεται σε μη στάσιμα συστήματα και σε σύντομες χρονικές περιόδους, στις οποίες παρατηρούνται αλλαγές στη συγκέντρωση των διαλυτών συστατικών με το χρόνο και τη θέση εντός της στερεής μήτρας (Aguilera, 2003).

Στην πραγματικότητα, η κινητική μελέτη της εκχύλισης είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην οριοθέτηση της διαδικασίας, η οποία επιτρέπει τη γνώση των μεταβλητών που επηρεάζουν τη διεργασία όπως η θερμοκρασία, η αναλογία διαλύτη - στερεού και το μέγεθος των σωματιδίων της στερεής φάσης (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005, Türker & Erdogdu, 2006). Η μαθηματική μοντελοποίηση της εκχύλισης αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη βελτιστοποίηση του εξοπλισμού, την προσομοίωση της διαδικασίας, το σχεδιασμό και τον έλεγχο, τη θεωρητική περιγραφή της διαδικασίας, την αξιολόγηση των συντελεστών μεταφοράς μάζας και την εξοικονόμηση ενέργειας, χρόνου και διαλυτών (Cacace & Mazza, 2003). Η δυνατότητα ανάκτησης της μέγιστης τιμής των ενώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα αποτελεί σημαντικό στόχο. Το ποσοστό εκχύλισης είναι ένα από τα τεχνολογικά κριτήρια που εφαρμόζονται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας συσκευών και μεθόδων εκχύλισης. Ωστόσο, η περιγραφή της διαδικασίας είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω του αριθμού των παραμέτρων που την επηρεάζουν, όπως η πορώδης δομή της στερεής φάσης (η οποία μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης), το ακανόνιστο σχήμα πολλές φορές των σωματιδίων, η μεγάλη κατανομή του μεγέθους σωματιδίων και η αρχική συγκέντρωση των ουσιών στόχων που μπορεί να διαφέρουν για την ίδια πρώτη ύλη ως συνάρτηση των συνθηκών καλλιέργειας και αποθήκευσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, κοκκομετρίας, αναλογίας υλικού- προς διαλύτη, η θερμοκρασία και ένταση ανάδευσης συνήθως αποτελούν τα πρώτα βήματα για την αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας της εκχύλισης για ένα συγκεκριμένο φυτικό υλικό (Paunović et al., 2015, Bucić-Kojić, Planinić, Tomas, Bilić, & Velić, 2007).

Η κινητική εκχύλισης περιγράφεται συχνά ως πρώτης τάξης (Periasamy & Namasivayam, 1996), και μερικές φορές ερμηνεύεται ως συνδυασμός δύο ή τριών διαφορετικών μηχανισμών (Pan, Qu, Ma, Atungulu, & McHugh, 2011, Sayyar, Abidin, Yunus, & Muhammad, 2009). Προτείνονται διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα (Πίνακας 9) για την ανάλυση της κινητικής εκχύλισης των ελαίων από διαφορετικούς ελαιούχους σπόρους και με διάφορους διαλύτες, όπως: σπόροι σε νιφάδες ή αλεσμένοι σπόροι ελαιοκράμβης, χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη (Fernández, Perez, Crapiste, & Nolasco, 2012, So & Macdonald, 1986), πράσινος καφές με τη χρήση εξανίου (Dibert, Cros, & Andrieu, 1989), κόκκοι καλαμποκιού και χρήση

αιθανόλης ως διαλύτης (Chien et al., 1990), σπόροι jojoba και χρήση εξανίου (Zaher, El Kinawy, & El Haron, 2008), ελαιοπυρήνας και χρήση εξανίου ή αζεοτροπικής αιθανόλης (Meziane & Kadi, 2008), σπόροι ηλιάνθου και χρήση εξανίου (Baümler, Carelli, Crapiste, & Carrín, 2011, Perez, Carelli, & Crapiste, 2011), στερεά απόβλητα καρύδας και χρήση εξανίου (Sulaiman, Aziz, & Kheireddine, 2013), σπόροι λιναρόσπορου και χρήση εξανίου (Kostić et al., 2013), σπόροι από φασόλι καστόρων και χρήση αιθανόλης (Amarante, Oliveira, Schwantes, & Morón-Villarreyes, 2014), νιφάδες σόγιας και μίγματα αιθανόλης (Dagostin, Carpiné, & Corazza, 2015). Στις μελέτες αυτές παρουσιάζεται γραφικά η επίδραση των παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση στην απόδοση της διεργασίας, και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τέτοιες καμπύλες εκχύλισης είναι η ικανότητα ανάκτησης μίας ουσίας και το μέγιστο της απόδοσης ως προς τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Ο αρχικός ρυθμός εκχύλισης έχει βρεθεί ότι αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και της αναλογίας στερεού-υγρού, ενώ μειώνεται σημαντικά με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων.

Πίνακας 9. Μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της κινητικής μελέτης της εκχύλισης ελαίου από φυτικές πηγές

Μαθηματικό μοντέλο	Εξίσωση	Αναφορά
So-Macdonald	$Y_t = Y_e^w [1 - e^{-k_w t}] + Y_e^d [1 - e^{-k_d t}]$	Meziane and Kadi, 2008
Fick's Law	$Y_t = Y_e [1 - e^{-(k \cdot a) t}]$	Perez et al., 2011
Crank	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{n^2 \pi^2} e^{-n^2 B t}$	Pérez et al., 2011; Fernández et al., 2012; Sánchez et al. 2016
Peleg	$Y_t = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$	Bucic-Kojic et al., 2007

όπου Y_t είναι η απόδοση του εκχυλίσματος κάθε χρονική στιγμή, Y_e^w και Y_e^d είναι οι υποθετικές αποδόσεις εκχυλίσματος σε κατάσταση ισορροπίας λόγω των μηχανισμών πλύσης και διάχυσης, αντίστοιχα, k_w και k_d είναι οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για τους διάφορους μηχανισμούς εκχύλισης (min^{-1}), t είναι ο χρόνος εκχύλισης (min), $k \cdot a$ είναι ο συντελεστής της ογκομετρικής μεταφοράς μάζας (min^{-1}), M_t και M_∞ αντιπροσωπεύουν τη μάζα της ουσίας ($\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}/\text{g}_{\text{ξηρού στερεού δείγματος}}$) που διαχέονται σε χρόνο t και σε άπειρο χρόνο, αντίστοιχα, B_n (min^{-1}) είναι παράμετρος προσαρμογής του μοντέλου, K_1 είναι η σταθερά ρυθμού του Peleg ($\text{min} \cdot \text{g}_{\text{αρχικού στερεού δείγματος}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$) και το K_2 είναι σταθερά εκχυλιστικής ικανότητας του Peleg ($\text{g}_{\text{αρχικής μάζας στερεού δείγματος}}/\text{g}_{\text{εκχυλίσματος}}$).

2.5 Καινοτόμες πράσινες διεργασίες εκχύλισης

Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης στερεού-υγρού και ο σχετικός εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Ωστόσο, οι συμβατικές μέθοδοι απαιτούν μεγάλους χρόνους εκχύλισης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα οι θερμο-ευαίσθητες δραστικές ενώσεις να υφίστανται υποβάθμιση (Azmir et al., 2013, Chan, Yusoff, & Ngoh, 2014, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Για το λόγο αυτό, κατά την τελευταία δεκαετία, σημειώθηκε μία αυξανόμενη ζήτηση για σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης που να επιτυγχάνουν τόσο μικρότερο χρόνο εκχύλισης και μειωμένη κατανάλωση οργανικών διαλυτών όσο και ελαχιστοποίηση της υποβάθμισης των διαλυτών ουσιών. Προς αυτή την κατεύθυνση, προτείνονται οι σύγχρονες υποβοηθούμενες μέθοδοι εκχύλισης όπως με ένζυμα (EAE), με μικροκύματα (MAE), με υπερήχους (UAE), με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE), με πεπιεσμένο υγρό (PSE), με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE), με υψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE), με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση (PLE) ακόμη και για εργαστηριακής κλίμακας εκχυλίσεις όπως με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), και με συνδυασμό Soxhlet με μικροκύματα (Soxhwave).

2.5.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave-assisted extraction, MAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα αποτελεί μία μέθοδο που τα τελευταία χρόνια κερδίζει σημαντικό έδαφος κυρίως για την απομόνωση και ανάκτηση ουσιών από φυτικής προέλευσης υλικά. Τα μικροκύματα είναι μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ενέργεια που μεταδίδεται ως κύματα με συχνότητα κυμαινόμενη από 0,3 έως 300 GHz, τα οποία μπορεί να διεισδύσουν σε ορισμένα υλικά και να αλληλεπιδράσουν με πολικά συστατικά εντός των υλικών, όπως το νερό. Η MAE θεωρείται σημαντική εναλλακτική μέθοδος για την εκχύλιση στερεού-υγρού, λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει όπως: χαμηλότερος χρόνος εκχύλισης, μικρότερη χρήση διαλύτη, επιλεκτικότητα και ελεγχόμενη διαδικασία θέρμανσης. Στη MAE, η επιτάχυνση της διαδικασίας και η υψηλή απόδοση εκχύλισης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ενός συνεργιστικού συνδυασμού δύο φαινομένων μεταφοράς: θερμότητας και μάζας που λειτουργούν προς την ίδια κατεύθυνση. Από την άλλη πλευρά, στις συμβατικές εκχυλίσεις, αν και η μεταφορά θερμότητας συμβαίνει από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος του μέσου, η μεταφορά μάζας γίνεται από μέσα προς τα έξω. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι σε μία συμβατική διαδικασία η θερμότητα μεταφέρεται από το μέσο θέρμανσης στο εσωτερικό του στερεού υλικού, στη MAE η θερμότητα διασκορπίζεται σε όλο τον όγκο του ακτινοβολούμενου μέσου (Destandau, Michel, & Elfakir, 2013, Leonelli, Veronesi, &

Gravotto, 2013, Azmir et al., 2013, Chan, Yusoff, Ngoh, & Kung, 2011, Al-Harahsheh & Kingman, 2004, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Η φυσική αρχή της MAE βασίζεται στις άμεσες επιδράσεις της ενέργειας των μικροκυμάτων στα μόρια των υλικών. Οι πολικές ενώσεις απορροφούν την ενέργεια των μικροκυμάτων, έτσι τα στοχευμένα υλικά μπορεί να θερμανθούν ανάλογα με τη διηλεκτρική σταθερά τους. Η απορροφούμενη ενέργεια είναι ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός περιστροφικού διπόλου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και την ιοντική μετανάστευση. Η ιοντική μετανάστευση παράγει θερμότητα ως αποτέλεσμα της αντοχής του μέσου στη ροή ιόντων, προκαλώντας συγκρούσεις μεταξύ των μορίων. Οι κινήσεις περιστροφής των πολικών μορίων συμβαίνουν, ενώ αυτά τα μόρια προσπαθούν να ευθυγραμμιστούν με το ηλεκτρικό πεδίο, με επακόλουθο να συμβαίνουν πολλαπλές συγκρούσεις που παράγουν ενέργεια και αυξάνουν τη θερμοκρασία του μέσου (Destandau et al., 2013, Veggi, Martinez, & Meireles, 2013, Chan et al., 2011, Azadmard-Damirchi, Alirezalu, & Achachlouei Fathi, 2011, Takeuchi et al., 2009, Al-Harahsheh & Kingman, 2004).

Στη διεργασία της εκχύλισης με τη χρήση μικροκυμάτων, η αλληλεπίδραση της στερεής μήτρας και του διαλύτη περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Veggi et al., 2013, Takeuchi et al., 2009):

1. Διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα.
2. Διαλυτοποίηση των συστατικών.
3. Μεταφορά της διαλυμένης ουσίας από τη στερεή μήτρα.
4. Μετανάστευση της εξαγόμενης διαλυμένης ουσίας από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού στο κυρίως διάλυμα.
5. Μετακίνηση του εκχυλίσματος σε σχέση με το στερεό.
6. Διαχωρισμό του εκχυλίσματος και του στερεού.

2.5.1.1 Μηχανισμός της MAE

Τα μικροκύματα προκαλούν μοριακή κίνηση μέσω της μετανάστευσης των ιόντων και της περιστροφής των διπόλων, αλλά και της θέρμανσης του διαλύτη, βελτιώνοντας έτσι τη διείσδυση του διαλύτη στο στερεό. Η ιοντική αγωγιμότητα είναι η ηλεκτροφορητική μετανάστευση των ιόντων, όταν εφαρμόζεται ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ενώ η αντίσταση του διαλύματος σε αυτή τη ροή ιόντων έχει ως αποτέλεσμα τη θέρμανση του διαλύματος μέσω τριβής. Έτσι, τα κατιόντα επιταχύνουν την κίνησή τους προς την κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου, ενώ τα άνιοντα κινούνται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η κατεύθυνση της κίνησης

των θετικών και αρνητικών ιόντων αλλάζει, καθώς η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου μεταβάλλεται ανάλογα με τη συχνότητα. Η διπολική περιστροφή συνεπάγεται την αναδιάταξη των διπόλων ανάλογα με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

Το κύριο χαρακτηριστικό της θέρμανσης με μικροκύματα είναι η μεταφορά ενέργειας. Παραδοσιακά, στη συμβατική διαδικασία, η ενέργεια μεταφέρεται στο υλικό με φαινόμενα μεταφοράς, συναγωγής και ακτινοβολίας μέσω της εξωτερικής επιφάνειας του υλικού παρουσία ενός θερμαντικού μέσου, ενώ στη ΜΑΕ η ενέργεια μικροκυμάτων μεταδίδεται απευθείας σε υλικά μέσω μοριακών αλληλεπιδράσεων με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο με τη βοήθεια της μετατροπής της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας σε θερμική ενέργεια (Veggi et al., 2013, Sumnu & Sahin, 2012, Chan et al., 2011, Azadmard-Damirchi et al., 2011, Al-Harahsheh & Kingman, 2004).

Καθώς η αποτελεσματικότητα της θέρμανσης με μικροκύματα, όπως ήδη αναφέρθηκε, εξαρτάται από τη διηλεκτρική σταθερά τόσο του διαλύτη όσο και της στερεής μήτρας, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη αποτελεί σημαντικό παράγοντα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο σχεδιασμό της εκχύλισης με μικροκύματα. Συνήθως, όσο υψηλότερη είναι η διηλεκτρική σταθερά ενός διαλύτη τόσο υψηλότερος είναι και ο βαθμός απορρόφησης των μικροκυμάτων, καθώς τα μόρια του διαλύτη απορροφούν τη ενέργεια των μικροκυμάτων και πολώνονται. Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη είναι η διηλεκτρική σταθερά, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα του διαλύτη να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερο ρυθμό θέρμανσης του διαλύτη και κατά συνέπεια της στερεής ύλης. Τα πολικά μόρια και τα ιοντικά διαλύματα απορροφούν έντονα την ενέργεια μικροκυμάτων λόγω της μόνιμης διπολικής ροπής. Από την άλλη πλευρά, όταν εκτίθενται σε μικροκύματα, οι μη πολικοί διαλύτες, όπως το εξάνιο, δεν θερμαίνονται. Στον Πίνακα 10, οι επιλεγμένες φυσικές παράμετροι, συμπεριλαμβανομένων της διηλεκτρικής σταθεράς και των παραγόντων διάλυσης, παρουσιάζονται για τους συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες εφαρμογές (Destandau et al., 2013, Leonelli et al., 2013, Azmir et al., 2013, Sumnu & Sahin, 2012, Al-Harahsheh & Kingman, 2004, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Πίνακας 10. Φυσικές σταθερές για διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε εκχυλίσματα υποβοηθούμενες με μικροκύματα (ΜΑΕ)

Διαλύτης	Διηλεκτρική σταθερά ^a ε'	Διπολική ροπή ^b	Συντελεστής διασποράς $\tan \delta$ ($\times 10^{-4}$)	Σημείο ζέσεως ^c (°C)	Θερμοκρασία κλειστού δοχείου εκχύλισης ^d (°C)
Ακετόνη	20,7	2,69	5555	56	164
Αιθανόλη	24,3	1,96	2500	78	164
Εξάνιο	1,89	0,1		69	-
Νερό	78,3	2,3	1570	100	
Μεθανόλη	32,6	2,87	6400	65	151
Ισοπροπανόλη	19,9	1,66	6700	82	145
Ακετόνη-εξάνιο (1:1)				52	156

^aΠροσδιορισμός στους 20°C.

^b Προσδιορισμός στους 25°C.

^cΠροσδιορισμός στα 101,4 kPa.

^d Προσδιορισμός στα 1207 kPa.

Από τον Πίνακα 10 παρατηρείται ότι η μεθανόλη έχει μικρότερη ικανότητα να παρεμποδίζει τα μικροκύματα, αλλά έχει μεγαλύτερη ικανότητα να μετατρέπει την ενέργεια μικροκυμάτων σε θερμότητα. Το νερό έχει την υψηλότερη διηλεκτρική σταθερά, που συνεπάγεται μικρότερο συντελεστή διασποράς, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι το σύστημα απορροφά περισσότερη ενέργεια μικροκυμάτων από ότι μπορεί να μετατρέπει σε θερμότητα. Το εξάνιο δεν θερμαίνεται, ενώ η ακετόνη με διπολική ροπή 2.87 Debye θερμαίνεται σε λίγα δευτερόλεπτα. Έτσι, ένα μίγμα εξανίου και ακετόνης (1: 1) είναι ένας ιδανικός διαλύτης για εφαρμογές (Veggi et al., 2013, Leonelli et al., 2013, Chan et al., 2011).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι η στερεή μήτρα. Η μοριακή της σύσταση επηρεάζει την ικανότητά της να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων, επειδή επηρεάζει τη μοριακή περιστροφή. Όταν η μοριακή κινητικότητα μειώνεται, τα μόρια είναι δύσκολο να ευθυγραμμιστούν με το πεδίο των μικροκυμάτων. Έτσι, η θερμότητα που παράγεται από τη διπολική περιστροφή μειώνεται, και όσο υψηλότερος είναι ο συντελεστής διασποράς, τόσο πιο γρήγορα θα μεταφέρεται η θερμότητα στο διαλύτη (Veggi et al., 2013, Leonelli et al., 2013, Chan et al., 2011).

2.5.1.2 *Παράγοντες που επηρεάζουν τη MAE*

Η αποτελεσματικότητα της υποβοηθούμενης με μικροκύματα εκχύλισης σχετίζεται με έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης, του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και του μεγέθους της στερεής μήτρας.

Θερμοκρασία: Η υψηλότερη θερμοκρασία προάγει τις υψηλές αποδόσεις εκχύλισης. Σε υψηλές θερμοκρασίες, η ισχύς των διαλυτών αυξάνει λόγω της μείωσης του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης τους, διευκολύνοντας έτσι τη διαλυτοποίηση των ουσιών-στόχων και βελτιώνοντας τη διαβροχή και διείσδυσή τους στη μήτρα. Επιπλέον, σε κλειστά δοχεία εκχύλισης μικροκυμάτων, η θερμοκρασία μπορεί να φθάσει πολύ πιο πάνω από το σημείο ζέσεως του διαλύτη, οδηγώντας σε βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Ωστόσο, η απόδοση αυξάνεται μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη θερμοκρασία, ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της απόδοσης (Veggi et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Πίεση: Είναι ένας σημαντικός παράγοντας στις διαδικασίες MAE σε κλειστά συστήματα. Η πίεση του συστήματος σχετίζεται με τη θερμοκρασία που εφαρμόζεται, αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης και μειώνοντας το χρόνο εκχύλισης (Takeuchi et al., 2009).

Διαλύτης: Η επιλογή του διαλύτη, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη διαδικασία της MAE. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από τη διηλεκτρική σταθερά του, τη διαλυτότητα των προς εκχύλιση ενώσεων, καθώς και από τη διείσδυση και την αλληλεπίδρασή του με τη στερεή μήτρα. Τόσο οι πολικοί όσο και οι μη πολικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη MAE. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη μικρής ποσότητας νερού στο διαλύτη εκχύλισης διευκολύνει τη διάλυση των ενώσεων-στόχων επιτυγχάνοντας μεγαλύτερο ρυθμό μεταφοράς μάζας (Veggi et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Χρόνος εκχύλισης: Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης των διεργασιών της MAE είναι πολύ μικρός. Στα τρόφιμα, οι χρόνοι εκχύλισης κυμαίνονται από 3 έως 40 min, ανάλογα με τη στερεή μήτρα και τις εκχυλιζόμενες ενώσεις. Ο υψηλότερος χρόνος εκχύλισης τείνει συνήθως να αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, αυτό εξαρτάται από τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, π.χ. διαλύτες όπως το νερό, η αιθανόλη και η μεθανόλη μπορεί να θερμαίνονται έντονα κατά τη μακροχρόνια έκθεση στην ακτινοβολία των μικροκυμάτων, επιφέροντας έτσι τυχόν υποβάθμιση στα θερμο-ευαίσθητα συστατικά. Μερικές φορές, όταν απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης, τα στερεά υλικά εκχυλίζονται σε πολλαπλά στάδια χρησιμοποιώντας διαδοχικούς κύκλους εκχύλισης με φρέσκο διαλύτη. Με αυτή τη διαδικασία, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται, αποφεύγοντας την έντονη θέρμανση του διαλύτη (Veggi et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Sparr Eskilsson & Björklund, 2000).

Περιεκτικότητα σε νερό: Η περιεκτικότητα σε υγρασία της στερεής μήτρας έχει μεγάλη σημασία καθώς το νερό εντός της μήτρας θερμαίνεται, εξατμίζεται και παράγοντας εσωτερική πίεση στο κύτταρο, έχει ως αποτέλεσμα τη ρήξη των κυττάρων και τη βελτίωση έτσι της απόδοσης της εκχύλισης. Επιπλέον, η προσθήκη νερού αυξάνει την πολικότητα του διαλύτη και έχει θετική επίδραση στην ικανότητα απορρόφησης των μικροκυμάτων. Ακόμη, η προσθήκη νερού προωθεί την υδρόλυση, μειώνοντας έτσι και τον κίνδυνο οξείδωσης των ενώσεων (Leonelli et al., 2013, Takeuchi et al., 2009).

2.5.1.3 Φούρνοι μικροκυμάτων

Υπάρχουν δύο ομάδες εκχυλιστήρων υποβοηθούμενης εκχύλισης με μικροκύματα, ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο εφαρμόζεται η ενέργεια των μικροκυμάτων στο δείγμα του τροφίμου: συστήματα πολλαπλών λειτουργιών και συστήματα απλής ή εστιασμένης λειτουργίας. Ένα σύστημα πολλαπλών λειτουργιών επιτρέπει τη διασπορά της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων τυχαία στην κοιλότητα των μικροκυμάτων, έτσι ώστε να ακτινοβολείται κάθε περιοχή του δείγματος και της κοιλότητας. Ένα σύστημα απλής ή εστιασμένης λειτουργίας επιτρέπει την εστίαση της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων σε μία περιορισμένη περιοχή, στην οποία εφαρμόζεται ισχυρότερο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στο τρόφιμο (Destandau et al., 2013, Chan et al., 2011, Turner, 2006, Luque-Garcia, 2005).

Συνήθως, τα συστήματα πολλαπλών λειτουργιών είναι κλειστού τύπου, όπου η επεξεργασία εκχύλισης με μικροκύματα διεξάγεται υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία και πίεση, ενώ τα εστιασμένα συστήματα είναι ανοικτού τύπου, όπου η ακτινοβολία των μικροκυμάτων εφαρμόζεται σε ατμοσφαιρική πίεση.

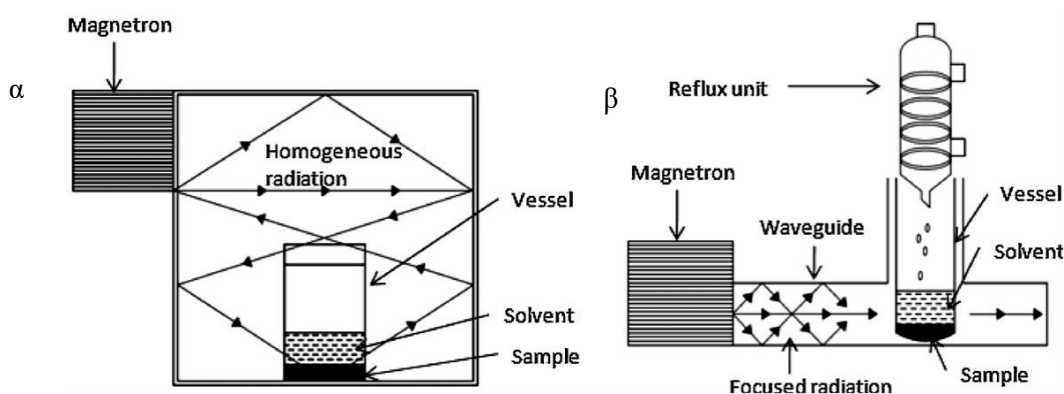
Και οι δύο τύποι συσκευών αποτελούνται από τέσσερα κύρια μέρη (Σχήμα 25) (Destandau et al., 2013, Chan et al., 2011, Luque-Garcia, 2005).

1. Τη γεννήτρια των μικροκυμάτων, όπου η ενέργεια των μικροκυμάτων παράγεται σε σταθερή συχνότητα.
2. Τον κυματοδηγό, που χρησιμοποιείται για τη μετάδοση των μικροκυμάτων από την πηγή στην κοιλότητα των μικροκυμάτων.
3. Το θάλαμο, όπου τοποθετείται το δείγμα. Μπορεί να είναι μία κοιλότητα όπου τα μικροκύματα διασκορπίζονται τυχαία ή ο ίδιος ο κυματοδηγός.
4. Τον κυκλοφορητή, ο οποίος επιτρέπει στα μικροκύματα να διέρχονται μόνο πρόσθια.

Συστήματα μικροκυμάτων κλειστού τύπου: Η ΜΑΕ σε κλειστό σύστημα διεξάγεται σε σφραγισμένο δοχείο σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι ότι η πίεση εντός του δοχείου εκχύλισης ελέγχεται, ώστε να μην υπερβαίνει

την πίεση λειτουργίας του δοχείου, ενώ η θερμοκρασία μπορεί να ρυθμιστεί πάνω από το κανονικό σημείο ζέσεως του διαλύτη εκχύλισης. Η αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης επιταχύνει την υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα λόγω της ικανότητας του διαλύτη να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων. Αν και το σύστημα του κλειστού δοχείου προσφέρει μία αποτελεσματική εκχύλιση με λιγότερη κατανάλωση όγκου διαλύτη, μπορεί να υπάρξουν απώλειες των πτητικών ενώσεων του δείγματος (Destandau et al., 2013, Chan et al., 2011, Turner, 2006, Luque-Garcia, 2005).

Συστήματα μικροκυμάτων ανοικτού τύπου: Η ΜΑΕ σε ανοικτό σύστημα διεξάγεται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και μόνο ένα μέρος του δοχείου εκτίθεται απευθείας στην ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Το σύστημα αυτό ονομάζεται συνήθως ως εστιασμένη υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (FMAE). Η μέγιστη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο σύστημα είναι περίπου το κανονικό σημείο ζέσεως του διαλύτη σε ατμοσφαιρική πίεση. Το ανοικτό σύστημα αναπτύσσεται για την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων του συστήματος κλειστού τύπου, όπως τα ζητήματα ασφάλειας και θεωρείται πιο κατάλληλο για την εκχύλιση θερμο-ευαίσθητων ενώσεων. Αυτό το σύστημα επιδέχεται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος και περισσότερο διαλύτη που μπορεί να προστεθεί στο σύστημα οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι απώλειες του διαλύτη αποτρέπονται από την παρουσία ενός συστήματος ψύξης στην κορυφή του δοχείου εκχύλισης που συμπυκνώνει τους ατμούς του διαλύτη (Destandau et al., 2013, Chan et al., 2011, Turner, 2006, Luque-Garcia, 2005).



Σχήμα 25. Σύστημα μικροκυμάτων κλειστού τύπου (α) και σύστημα μικροκυμάτων ανοικτού τύπου (β)

2.5.1.4 Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (ΜΑΕ)

Στον Πίνακα 11 που ακολουθεί δίνονται κάποια παραδείγματα εκχυλίσεων με μικροκύματα για την ανάκτηση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών από φυτικές πρώτες ύλες.

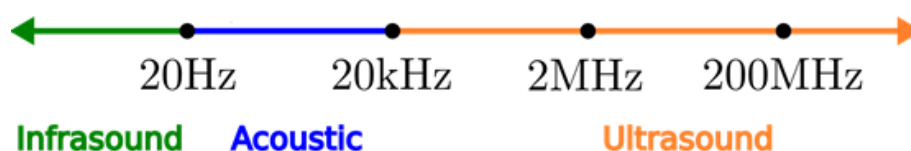
Συγκεκριμένα, στην ανάκτηση ελαίου από κίτρινη κύπερη ως βέλτιστες συνθήκες βρέθηκαν: μίγμα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα και ακετόνης 2:1, ισχύς μικροκυμάτων 420 W, θερμοκρασία εκχύλισης 75 °C, αναλογία υγρού: στερεού 7:1 mL/g και χρόνος 55 min (Hu et al., 2018), ενώ στην ανάκτηση ελαίου από βαμβακόσπορο: χρόνος εκχύλισης: 3,57 min, υγρασία σπόρου: 14% και αναλογία υγρού: στερεού 4:1 mL/g, αντίστοιχα (Taghvaei, Mahdi, Assadpoor, Nowrouzieh, & Alishah, 2014). Στην περίπτωση ανάκτησης ελαίου από σπόρους οξιάς, υψηλότερη απόδοση εκχύλισης προτείνεται από τους Kumar, Benal, Prasad, Krupashankara, & Kulkarni (2018) με εφαρμογή 600W για 14 min, ενώ από σπόρους του φυτού *Moringa oleifera* οι Zhong et al. (2018) προτείνουν εκχύλιση με αναλογία υγρού: στερεού 10:1 mL/g, ισχύ 300 W για 7 min. Υψηλή απόδοση καστορέλαιου (37%) επιτεύχθηκε με την εφαρμογή ισχύος μικροκυμάτων 330 W για 20 min και αναλογία υγρού: στερεού 20:1 mL/g (Ibrahim & Zaini, 2018) και πυρηνέλαιου από υγρό ελαιοπυρήνα με την εφαρμογή ισχύος 287 W, για 16 min και αναλογία υγρού: στερεού 10:1 mL/g (Yanik, 2017). Όσον αφορά την ανάκτηση πολυφαινολών από φύλλα πράσινου τσαγιού, η MAE επέτυχε υψηλότερη απόδοση εκχύλισης για 4 min σε θερμοκρασία δωματίου Pan, Niu, & Liu (2003), ενώ από φύλλα γρασιδιού προτείνονται ως βέλτιστες συνθήκες από τους Grigonis, Venskutonis, Sivik, Sandahl, & Eskilsson (2005): ισχύς μικροκυμάτων: 200 W, διαλύτης: ακετόνη για 15min και αναλογία στερεού: υγρού 1:16 kg/L. Στην περίπτωση ανάκτησης πολυφαινολών από φύλλα ελιάς, υψηλότερη απόδοση προκύπτει σύμφωνα με τους Taamalli et al. (2012) εφαρμόζοντας τις εξής συνθήκες: ισχύ μικροκυμάτων 200 W, χρόνο εκχύλισης 15 min και αναλογία στερεού: υγρού 1:12 kg/L. Στην περίπτωση ανάκτησης φαινολικών οξέων από εσπεριδοειδή, οι βέλτιστες συνθήκες που προτείνονται από τους Hayat et al. (2010) είναι: ισχύς μικροκυμάτων 152 W, χρόνος εκχύλισης 49 s, αναλογία στερεού: υγρού 1:16 kg/L, και εκχύλιση με σύστημα 60% μεθανόλης, ενώ η υψηλότερη απόδοση φλαβονολών από πράσινο τσάι σύμφωνα με τους Nkhili et al. (2009) πραγματοποιείται στα 600 W για 30 min και με αναλογία 1:20, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη. Στη μελέτη εκχύλισης πολυφαινολών από μαύρο τσάι, οι Wang, Qin, & Hu, (2010) δεν προτείνουν τη μεθανόλη λόγω της τοξικότητάς της, παρότι ο υψηλός συντελεστής διάχυσής της και το χαμηλό ιξώδες της μπορούν να βοηθήσουν στην απόδοση της εκχύλισης. Ακόμη, αρκετοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι ενώ η αύξηση του όγκου του διαλύτη αρχικά δύναται να βελτιώνει την εκχύλιση, ωστόσο η περίσσεια διαλύτη σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το φαινόμενο καθώς οδηγεί σε υπερβολική διόγκωση του υλικού και καταστροφή του, λόγω αύξησης της θερμοκρασίας (Xiao, Wang, Wang, Wang, & Li, 2009). Στοχεύοντας σε διαφορετικές ουσίες-στόχους προτείνονται διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Η δομή του υλικού παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο στη διάθεση των ουσιών, στη διάχυση του διαλύτη στο εσωτερικό του υλικού και στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η μεταφορά θερμότητας. Έτσι, για κάθε υλικό προκύπτουν διαφορετικές παράμετροι βελτιστοποίησης, η μελέτη των οποίων είναι πολύ σημαντική για τη βιομηχανία.

Πίνακας 11. Εφαρμογές εκχυλίσεων βιοδραστικών ουσιών με μικροκόμματα από διάφορες φυτικές πρώτες ύλες

Φυτική πρώτη ύλη	Βιοδραστική ουσία	Διαλύτης	Ένταση μικροκυμάτων (W)	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Αναλογία Στερεού: Υγρού (kg/L)	Αναφορά
Κίτρινη κύπερη	Έλαιο	Πετρελαϊκός αιθέρας και ακετόνη 2:1	420	55	1:7	(Hu et al., 2018)
Βαμβακόσπορος	Βαμβακέλαιο	Εξάνιο	900	3,57	1:4	(Taghvaei et al., 2014)
Σπόρος οξιάς	Έλαιο	Εξάνιο	600	14	-	(Kumar et al., 2018)
Σπόροι του φυτού <i>Moringaoleifera</i> ,	Έλαιο	Πετρελαϊκός αιθέρας	300	7	1:10	(Zhong et al., 2018)
Ρίκινος	Καστορέλαιο	5% Αιθανόλη σε εξάνιο	300	20	1:20	(Ibrahim & Zaini, 2018)
Ελαιοπυρήνας	Πυρηνέλαιο	Εξάνιο	287	16	1:10	(Yanik, 2017)
Πράσινο Τσάι	Πολυφαινόλες	50% Αιθανόλη	200	4	1:20	(X. Pan et al., 2003)
Φύλλα γρασιδιού	Πολυφαινόλες	Ακετόνη	200	15	1:10	(Grigonis et al., 2005)
Αρόνια	Πολυφαινόλες	25-75% Αιθανόλη	300-600	5-15	-	(Simić et al., 2016)
Τομάτα	Πολυφαινόλες	Μεθανόλη	100	45	1:50	(H. Li et al., 2012)
Φύλλα ελιάς	Πολυφαινόλες	50% Αιθανόλη	200	15	1:12	(Taamalli et al., 2012)
Πράσινο Τσάι	Φλαβονόλες	Νερό	600	30	1:20	(Nkhili et al., 2009)
Μαύρο Τσάι	Πολυφαινόλες	60% Αιθανόλη	600	10	1: 12	(L. Wang et al., 2010)
Εσπεριδοειδή	Φαινολικά οξέα	66% Μεθανόλη	152	49 (s)	1:16	(Hayat et al., 2010)
Μπαχαρικά	Φαινολικά οξέα, Βιοδραστικά συστατικά	50% Αιθανόλη	200	18	1:20	(Gallo, Ferracane, Graziani, Ritieni, & Fogliano, 2010)

2.5.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)

Στη βιομηχανία τροφίμων, η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπέρηχους (UAE) αποτελεί αντικείμενο έρευνας και ανάπτυξης και χαρακτηρίζεται ως μία πράσινη καινοτόμος τεχνολογία. Οι υπέρηχοι περιλαμβάνουν μηχανικά κύματα που διαδίδονται μέσα στο προς εκχύλιση στερεό. Τα ηχητικά κύματα είναι αυτά σε συχνότητες της ανθρώπινης ακοής (16 Hz έως 20 kHz), ενώ οι υπέρηχοι έχουν συχνότητες κάτω από το κατώτατο όριο της ανθρώπινης ακοής (Σχήμα 26) (Pingret, Fabiano-Tixier, & F, 2013, Azmir et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Mason, Riera, Vercet, & Lopez-Buesa, 2005).

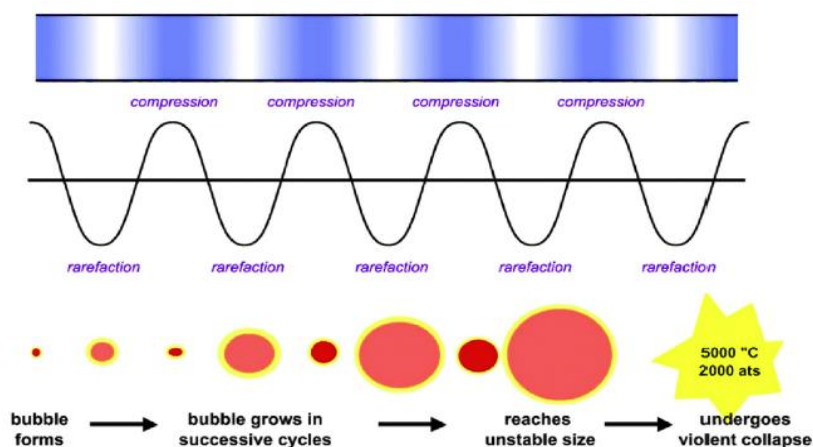


Σχήμα 26. Το φάσμα του ήχου

Οι υπέρηχοι χαρακτηρίζονται από τη συχνότητα και το μήκος κύματός τους, τα οποία επηρεάζουν την ταχύτητα διάδοσης του κύματος μέσα στο μέσο. Το πλάτος ή η ένταση των κυμάτων είναι επίσης σημαντική παράμετρος και χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των βιομηχανικών εφαρμογών: υπερηχογράφημα χαμηλής έντασης (LIU) με λιγότερο από 1 W/cm² και υπερηχογράφημα υψηλής έντασης (HIU) με 10-1000 W/cm². Το υπερηχογράφημα υψηλής έντασης εφαρμόζεται σε υψηλότερες συχνότητες (μέχρι 2,5 MHz) για να τροποποιήσει διεργασίες ή προϊόντα με φυσική διάσπαση των ιστών και, μεταξύ των άλλων εφαρμογών, να επιταχύνει και να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της προετοιμασίας του δείγματος. Το υπερηχογράφημα χαμηλής έντασης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας των διεργασιών και των προϊόντων και παρέχει πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των τροφίμων (π.χ. σταθερότητα, ωριμότητα, περιεκτικότητα σε ζάχαρη και οξύτητα) (Pingret et al., 2013, Takeuchi et al., 2009).

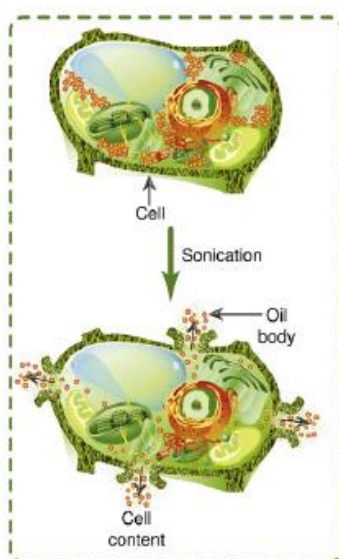
Η αρχή των υπέρηχων αποδίδεται στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των υπέρηχων, όταν ένα υπερηχητικό κύμα συναντά ένα υγρό μέσο, παράγονται διαμήκη κύματα, σχηματίζοντας έτσι περιοχές εναλλασσόμενων κυμάτων συμπίεσης και αραιώσης (διαστολή), που επάγονται στα μόρια του μέσου. Η διαδικασία της διαστολής δημιουργεί φυσαλίδες στο υγρό και παράγει αρνητική πίεση, η οποία μπορεί να φτάσει σε τοπική πίεση μέχρι και τα 50 Μρα και έντονη θέρμανση, καθώς επίσης διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Η έκταση της αρνητικής πίεσης εξαρτάται από τη φύση και την καθαρότητα του

υγρού. Σε σταθερή ένταση υπερήχων, μεταξύ του σχηματισμού και της κατάρρευσης των φυσαλίδων αποκαθίσταται δυναμική ισορροπία. Όταν οι φυσαλίδες σπηλαιώσης καταρρέουν κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα, η υψηλή πίεση και η θερμοκρασία δημιουργούν μικροπίδακες και κύματα κρούσης που κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα και την αύξηση του ρυθμού της μεταφοράς μάζας (Σχήμα 27 και 28) (Pingret et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Mason et al., 2005).



Σχήμα 27. Δημιουργία φυσαλίδων σπηλαιώσης και κατάρρευσή τους

Η συχνότητα των υπερήχων επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό και την κινητική της εκχύλισης. Ωστόσο, αυτές οι επιδράσεις εξαρτώνται και από τη δομή του υλικού και από την προς εκχύλιση ουσία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτούνται χαμηλότερες συχνότητες κατά τη διάρκεια της διεργασίας, προκειμένου να αποφευχθεί η υποβάθμιση των βιοδραστικών ενώσεων (Azmir et al., 2013, Takeuchi et al., 2009).



Σχήμα 28. Διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος με εφαρμογή υπερήχων

2.5.2.1 Σημαντικές παράμετροι της UAE

Τα πλεονεκτήματα της UAE σε σύγκριση με μία συμβατική τεχνική περιλαμβάνουν τη μείωση του χρόνου εκχύλισης, της ενέργειας και της χρήσης του διαλύτη. Η ενέργεια των υπερήχων επιτρέπει επίσης εύκολη ανάμιξη, ταχύτερη μεταφορά ενέργειας, μικρότερη θερμοκρασία εκχύλισης, επιλεκτική εκχύλιση, μειωμένο μέγεθος εξοπλισμού και ταχύτερη απόκριση κατά τον έλεγχο της διαδικασίας (Pingret et al., 2013, Azmir et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Mason et al., 2005).

Οι παράμετροι που μπορούν να βελτιστοποιηθούν στη UAE σχετίζονται με τη λειτουργία του εξοπλισμού των υπερήχων, όπως η συχνότητα, το μήκος κύματος, το πλάτος του κύματος, η ισχύς και η ένταση αυτών. Επίσης, η θερμοκρασία, η πίεση, ο χρόνος επεξεργασίας, η περιεκτικότητα σε νερό του διαλύτη και της πρώτης ύλης, καθώς και το μέγεθος σωματιδίων αποτελούν παράγοντες που εν γένει διέπουν την αποτελεσματική και αποδοτική εκχύλιση και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η προσεκτική μελέτη αυτών των παραμέτρων έχει μεγάλη σημασία για να επιτευχθεί η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης.

Φυσικές παράμετροι

Η συχνότητα, το μήκος κύματος και το πλάτος επηρεάζουν τις φυσαλίδες σπηλαίωσης και κατά συνέπεια την εκχύλιση.

Η συχνότητα (f) μετράται σε Hz και εκφράζει τον αριθμό κύκλων ανά δευτερόλεπτο.

Η περίοδος (P) είναι ο χρόνος ενός κύκλου ($1/f$).

Το μήκος κύματος (λ) αντιπροσωπεύει την απόσταση ενός κύκλου και προσδιορίζεται τόσο από την πηγή υπερήχων όσο και από το μέσο.

Το πλάτος (A) είναι το ύψος του κύματος και μετρείται σε ντεσιμπέλ (dB) ή σε πασκάλ (Pa). Έχει επίδραση στο σχηματισμό των φυσαλίδων σπηλαίωσης.

Η ισχύς των υπερήχων μπορεί να εκτιμηθεί με την άμεση ή έμμεση μέτρηση της εφαρμοζόμενης ενέργειας. Οι πιο συνήθεις φυσικές μέθοδοι είναι η μέτρηση της ακουστικής πίεσης χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο και η θερμοδομετρική μέθοδος. Μεταξύ των χημικών μεθόδων, χρησιμοποιείται η έμμεση μέτρηση των ριζών OH που σχηματίζονται από ηλιοφωταύγεια. Γενικά, η υψηλότερη απόδοση της UAE μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση της ισχύος των υπερήχων, με τη μείωση της υγρασίας των τροφίμων για την ενίσχυση της επαφής διαλύτη-στερεού και με τη βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας, ώστε να επιτραπεί ένας βραχύτερος χρόνος εκχύλισης.

Η ένταση μπορεί να εκφράζεται ως ενέργεια που μεταδίδεται ανά δευτερόλεπτο και ανά τετραγωνικό μέτρο του μέσου και σχετίζεται με το πλάτος του ηχητικού κύματος· με αύξηση

του πλάτους A , η κατάρρευση της φυσαλίδας θα είναι πιο βίαιη. Η εφαρμοζόμενη ένταση υπερήχων εκφράζεται από την εξίσωση:

$$UI = \frac{P_0}{A_b} = \frac{\left(\frac{dT}{dt}\right) C_p m}{A_b} \quad (\text{Εξ. 10})$$

Όπου P_0 είναι η μέση ισχύς, που εκφράζεται σε συνάρτηση με dT/dt που είναι η μεταβολή της θερμοκρασίας T με το χρόνο t

C_p είναι η ειδική θερμότητα του υγρού

m είναι η υγρή μάζα που προστίθεται στο δοχείο

A_b είναι η περιοχή του πυθμένα του δοχείου αντίδρασης

Παράμετροι του διαλύτη/μέσου

Η επιλογή του διαλύτη υπαγορεύεται από τη διαλυτότητα των προς εκχύλιση ουσιών στο διαλύτη και επίσης από φυσικές παραμέτρους που περιλαμβάνουν το ιξώδες, την επιφανειακή τάση και την τάση ατμών του μέσου. Για να είναι αποτελεσματικές οι φυσαλίδες σπηλαίωσης, η αρνητική πίεση κατά τη διάρκεια του κύκλου σπηλαίωσης πρέπει να υπερβεί τις φυσικές συνεκτικές δυνάμεις στο μέσο. Η αύξηση του ιξώδους αυξάνει τις μοριακές αλληλεπιδράσεις με συνέπεια να αυξάνεται σημαντικά και το όριο της σπηλαίωσης. Επίσης, η υψηλή επιφανειακή τάση μειώνει τα φαινόμενα σπηλαίωσης. Συνεπώς, συνιστάται υψηλή ένταση, προκειμένου να ληφθούν οι απαραίτητες μηχανικές δονήσεις που θα προκαλέσουν τη σπηλαίωση.

Η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει αύξηση της τάσης ατμών και μείωση του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, καθώς περισσότεροι ατμοί διαλυτών εισέρχονται στην κοιλότητα των φυσαλίδων, μειώνοντας τη διαφορά πίεσης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της φυσαλίδας. Κατά την εκχύλιση, η υψηλότερη θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αποτελεσματικότητα λόγω της αύξησης του αριθμού των φυσαλίδων σπηλαίωσης και της μεγαλύτερης επαφής με την επιφάνεια του στερεού-διαλύτη. Εν τούτοις, στην περίπτωση των πτητικών ενώσεων, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί κάποια μείωση της απόδοσης της εκχύλισης, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται. Έτσι, η βελτιστοποίηση της παραμέτρου της θερμοκρασίας πρέπει να διερευνάται για να επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση των ουσιών-στόχων χωρίς την αποικοδόμησή τους.

Παράμετροι της στερεής μήτρας

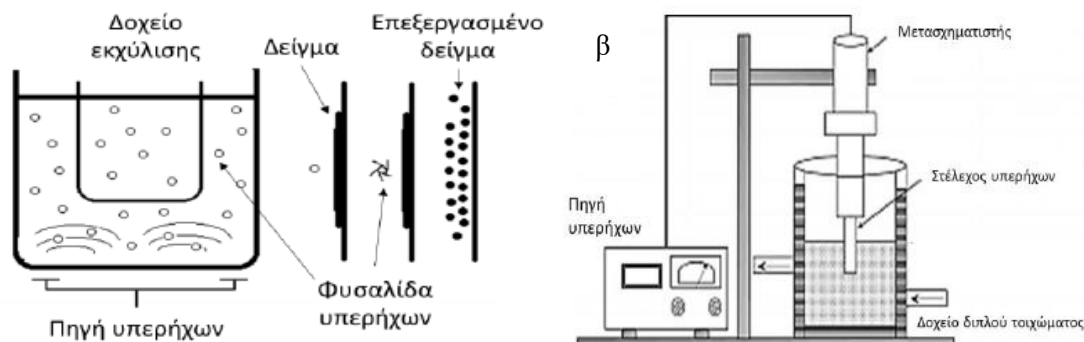
Η μήτρα που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι νωπή ή ξηρή ανάλογα με τις ουσίες-στόχους. Στην περίπτωση των ξηρών στερεών, μπορεί να λάβει χώρα διάχυση του υγρού ανάλογα με το πορώδες του υλικού. Επίσης, η διαλυτότητα των ουσιών-στόχων στον επιλεγμένο διαλύτη και η θερμοκρασία μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης. Άλλες παράμετροι που σχετίζονται με την εκχύλιση στερεού-υγρού είναι η αναλογία στερεού/υγρού και το μέγεθος των σωματιδίων της μήτρας και σχετίζονται με την απόδοση της εκχύλισης (Pingret et al., 2013, Azmir et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Mason et al., 2005).

2.5.2.2 Συσκευές υπερήχων

Τα συστήματα υπερήχων αποτελούνται από ένα μετατροπέα που μετατρέπει την ηλεκτρική ενέργεια σε ηχητική ενέργεια, προκαλώντας μηχανικές δονήσεις στις υπερηχητικές συχνότητες, παράγει υπερήχους. Ο παραγόμενος υπέρηχος ακτινοβολείται από τον πομπό, ο οποίος επίσης αποκαλείται αντιδραστήρας, ενισχύοντας τα κύματα.

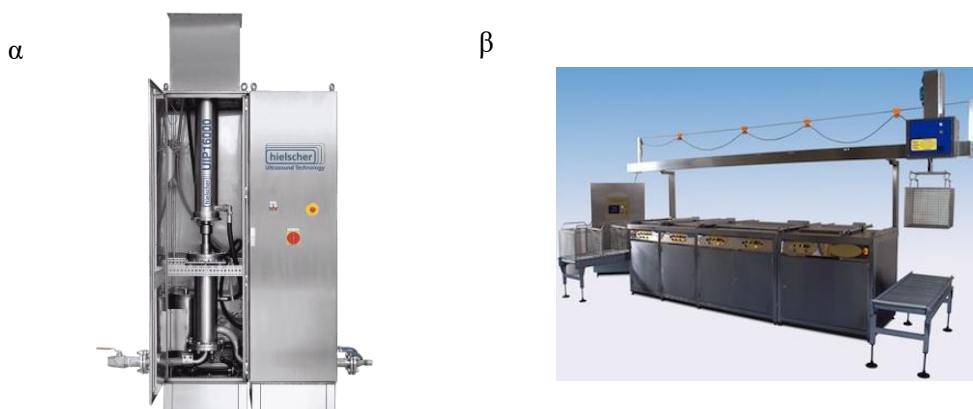
Ο εξοπλισμός των υπερήχων έχει αναπτυχθεί τόσο για εργαστηριακή όσο και για βιομηχανική κλίμακα (Σχήμα 29). Σε εργαστηριακή κλίμακα, ο συνηθέστερος εξοπλισμός είναι το λουτρό των υπερήχων, το οποίο έχει χαμηλό κόστος εφαρμογής και χρησιμοποιείται για τη διασπορά στερεών σε διαλύτη και για την κατεργασία με υπέρηχους υγρών δειγμάτων σε δοχεία με εμβάπτισή τους στο λουτρό. Ωστόσο, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα όπως η μειωμένη ισχύς με την πάροδο του χρόνου, η έλλειψη ομοιομορφίας στην κατανομή της ενέργειας των υπερήχων και η μείωση της αναπαραγωγιμότητας και επαναληψιμότητας των πειραμάτων. Για μικρότερους όγκους, χρησιμοποιούνται εκχυλιστήρες κλειστού τύπου εξοπλισμένοι με έναν αισθητήρα μετατροπής υπερήχων και θεωρούνται πιο ισχυροί, καθώς η ένταση των υπερήχων εκπέμπεται από μία μικρή επιφάνεια όπου το στέλεχος βυθίζεται απευθείας στη φιάλη, αποφεύγοντας την εξασθένηση (Pingret et al., 2013, Azmir et al., 2013, Takeuchi et al., 2009, Mason et al., 2005).

Και στις δύο συσκευές σκοπός είναι η ικανοποιητική διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και η επαρκής μεταφορά μάζας, που θεωρούνται ως οι δύο βασικοί παράγοντες που οδηγούν στην ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης με τη βοήθεια των υπερήχων (Briars & Paniwnyk, 2013). Σε αντίθεση με άλλες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, τα φυτικά εκχυλίσματα διαχέονται κατά μήκος των κυτταρικών τοιχωμάτων σε συντομότερο διάστημα (Chemat, Vian, & Cravotto, 2012).



Σχήμα 29. Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης με υπερήχους σε: α) λουτρό υπερήχων, β) εκχυλιστήρα κλειστού τύπου εξοπλισμένο με αισθητήρα μετατροπής υπερήχων

Σε βιομηχανική κλίμακα, υπάρχουν δύο τύποι εγκαταστάσεων μεγάλης κλίμακας: μη συνεχείς τύποι και τύποι ροής (συνεχείς) (Σχήμα 30). Οι μη συνεχείς τύποι βασίζονται στην αρχή λειτουργίας του λουτρού των υπερήχων, χρησιμοποιώντας όλο το λουτρό ως αντιδραστήρα. Στα συστήματα ροής, το υλικό, εξαναγκαζόμενο υπό πίεση που παράγεται από μία ισχυρή αντλία, αναδύεται μέσω ενός ανοίγματος και διογκώνεται σε ένα θάλαμο ανάμιξης (Pingret et al., 2013, Azmir et al., 2013, Mason et al., 2005).



Σχήμα 30. Συσκευές υπερήχων βιομηχανικής κλίμακας: α) με στέλεχος, β) με λουτρό

2.5.2.3 Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους (UAE)

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα υλικά φυτικής προέλευσης έδειξαν ότι η χρήση υπερήχων ενισχύει την παραλαβή ελαίου από ελαιούχους σπόρους, όπως από σόγια

(H. Li, Pordesimo, & Weiss, 2004), αμύγδαλο (Q. Zhang et al., 2009), σπόρους παπάγιας (Samaram et al., 2015), ηλίανθο (Luque-García & Luque de Castro, 2004), σπόρους ροδιού (Goula, 2013, Tian, Xu, Zheng, & Martin, 2013), *Isatis indigotica Fort* (T. Li, Qu, Zhang, & Wang, 2012), φουντούκι (Wen et al., 2018), ελαιοκράμβη (Sicaire et al., 2016), ελιά (Juliano et al., 2017) και λιναρόσπορο (Z. Zhang et al., 2008). Ομοίως ενισχύει και την παραλαβή φαινολικών συστατικών όπως αναφέρουν οι (Chung, Ji, Canning, Sun, & Zhou, 2010) οι οποίοι σε συνδυασμό με υδατικούς διαλύτες ακετόνης και αιθανόλης βρήκαν ότι η χρήση υπερήχων βελτίωσε την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από σόγια σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση Soxhlet. Πρόσφατα η UAE έχει επίσης προταθεί ως εναλλακτική πράσινη μέθοδος εκχύλισης για πληθώρα φυτοχημικών ουσιών από κουκούτσια σταφυλιού (Ghafoor, Choi, Jeon, & Jo, 2009, Bajerová, Adam, Bajer, & Ventura, 2014, Samaram et al., 2015), παραπροϊόντα μήλου (Minjares-Fuentes et al., 2014), μανταρινιού (Dahmoune, Boulekbache, Moussi, Aoun, & Spigno, 2013), ροδιού (Tabaraki, Heidarizadi, & Benvidi, 2012), φύλλα ελιάς (Şahin & Şamlı, 2013a) κ.α., καθώς αποτελεί μία ευέλικτη τεχνική που μπορεί να κλιμακωθεί προς όφελος της βιομηχανικής παραγωγής. Στον Πίνακα 12 που ακολουθεί δίνονται κάποια παραδείγματα εκχυλίσεων γνωστών φυτικών πρώτων υλών με υπέρηχους.

Πίνακας 12. Εφαρμογές εκχυλίσεων βιοδραστικών ουσιών με υπέρηχους από διάφορες φυτικές πρώτες ύλες

Φυτική πρώτη ύλη	Βιοδραστική ουσία	Διαλύτης	Ένταση υπερήχων	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Θερμοκρασία (°C)	Αναφορά
Σόγια, Ηλίανθος	Έλαιο	Εξάνιο	-	10	-	(Luque-García & Luque de Castro, 2004)
Αμύγδαλο	Έλαιο	Εξάνιο	40	40-60	40-60	(Zhang et al., 2009)
Σπόροι παπάγιας	Έλαιο	Εξάνιο	40	5-30	25-50	(Samaram et al., 2015)
Πυρήνας κελυφωτού φυστικιού	Έλαιο	Εξάνιο	30	10	30-50	(Hashemi, Michiels, Asadi Yousefabad, & Hosseini, 2015)
Λιναρόσπορος	Έλαιο	Εξάνιο	20	30	30	(Z. Zhang et al., 2008)
Σόγια	Έλαιο	Εξάνιο	-	30	-	(Li et al., 2004)
Σπόροι ροδιού	Έλαιο	Εξάνιο	20-60% των 20 kHz	2-40	20-80	(Goula, 2013)

Isatis indigotica Fort	Έλαιο	Εξάνιο	40 kHz	30-50	30-50	(T. Li et al., 2012)
Σπόροι ροδιού	Έλαιο	Εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, , ακετόνη, ισοπροπανόλη	140-180W	20-40	35-45	(Tian, Xu, Zheng, & Martin, 2013)
Φουντούκι	Έλαιο	Εξάνιο	120 W	48	-	(Wen et al., 2018)
Ελαιοκράμβη	Έλαιο	Εξάνιο	20 kHz	15	40	(Sicaire et al., 2016)
Ελιά	Έλαιο	Εξάνιο	40 kHz	10	-	(Juliano et al., 2017)
Κουκούτσια Σταφυλιού	Φαινολικά συστατικά	Νερό	24 kHz	0,5-20	20,35, 50	(Samaram et al., 2015)
Κουκούτσια Σταφυλιού	Φαινολικά συστατικά	50% Αιθανόλη	25	-	20-50	(Bajerová et al., 2014)
Φύλλα ελιάς	Φαινολικά συστατικά	0-100% Αιθανόλη		20-60 min		(Şahin & Şamli, 2013a)
Κουκούτσια Σταφυλιού	Ολικά φαινολικά	53% Αιθανόλη	40 kHz	29 min	50-60	(Ghafoor et al., 2009)
Φλοιοί Εσπεριδοειδών	Ολικά φαινολικά	63,93% Αιθανόλη	77,79%	15,05 min	25	(Dahmoune et al., 2013)
Φύλλα ελιάς	Ολικά φαινολικά	50% Αιθανόλη	50 Hz	60 min	25	(Şahin & Şamli, 2013a)
Φλοιοί Ροδιού	Ολικά φαινολικά	70% Αιθανόλη	20–100 kHz	30 min	30-60	(Tabaraki et al., 2012)

2.5.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα (Enzymatic-assisted extraction, EAE)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα (EAE) είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος χρήσης ενζύμων για την ανάκτηση ελαίων από ελαιούχους σπόρους, όπου το νερό χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης της εκχύλισης και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες. Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται επιπλέον και για την προετοιμασία του φυτικού υλικού πριν από την εκχύλισή του με συμβατικές ή/και καινοτόμες μεθόδους. Διάφορα ένζυμα όπως κυτταρινάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες, πολυγαλακτουρονάσες και ημικυτταρινάσες, χρησιμοποιούνται συχνά για τη διάρρηξη του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, βελτιώνοντας έτσι την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών από τα φυτικά υλικά. Αυτά τα ένζυμα υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, αυξάνοντας έτσι τη

διαπερατότητα των φυτικών κυττάρων και οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης των ουσιών-στόχων. Τα ένζυμα μπορεί να προέρχονται από βακτήρια, μύκητες, ή εκχυλίσματα λαχανικών/φρούτων. Προκειμένου η χρήση των ενζύμων να είναι αποτελεσματική σε διεργασίες εκχύλισης, είναι σημαντικό να είναι γνωστά ο τρόπος δράσης τους, οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας και το είδος του ενζύμου ή ο συνδυασμός ενζύμων που είναι κατάλληλος για το επιλεγμένο φυτικό υλικό (Puri, Sharma, & Barrow, 2012, Marić et al., 2018).

2.5.3.1 Παράγοντες λειτουργίας της EAE

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα (EAE) εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως ο χρόνος επώασης, ο τύπος και η συγκέντρωση του ενζύμου, η τιμή του pH, η θερμοκρασία εκχύλισης και το μέγεθος σωματιδίων του φυτικού υλικού (Poojary, Orlie, Passamonti, & Olsen, 2017, Roselló-Soto et al., 2016).

Όσον αφορά την τιμή του pH, η ανάμιξη των ενζύμων κυτταρινάσης, πηκτινάσης και ημικυτταρινάσης (1: 1: 1) σε pH 4,5-5,0 που μελετήθηκε από τους Long & Abdelkader (2011) και τους Tabtabaei & Diosady (2013) έδωσε υψηλότερη απόδοση ελαίου από λιναρόσπορο και από σπόρους μουστάρδας, αντίστοιχα, σε σχέση με την απόδοση του καθενός μεμονωμένου ενζύμου σε διάφορες τιμές pH. Εκτός από το pH, η θερμοκρασία είναι ακόμη μία παράμετρος που επηρεάζει την απόδοση της EAE. Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης ποικίλλει για τους διάφορους ελαιούχους σπόρους και τα διαφορετικά ένζυμα. Έτσι, εκτός από την απόδοση του ελαίου, πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη και τα χαρακτηριστικά ποιότητας, αλλά και το γεγονός ότι οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλούν και απενεργοποίηση του ενζύμου. Από την άλλη πλευρά, οι χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε αργούς ρυθμούς δράσης των ενζύμων και χαμηλό ρυθμό εκχύλισης του ελαίου. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για την ενζυμική υδρόλυση είναι μεταξύ 45-55 °C (Rui, Zhang, Li, & Pan, 2009).

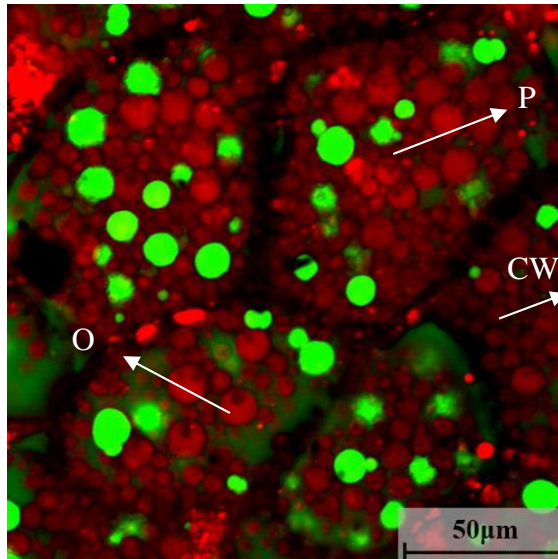
Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, η βελτίωση της αναλογίας υγρού προς στερεό είναι ευεργετική για το διαχωρισμό του ελαίου, μειώνοντας ταυτόχρονα την ποσότητα των υγρών αποβλήτων. Υψηλή αναλογία υγρού προς στερεό οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού εκχύλισης και της απόδοσης του προϊόντος. Ωστόσο, η υψηλή αναλογία υγρού προς στερεό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα υγρά απόβλητα και σε δυσλειτουργία της διάσπασης του γαλακτώματος (απογαλακτωματοποίησης) που οδηγεί σε αύξηση του κόστους της επεξεργασίας. Ως εκ τούτου, η απόδοση του ελαίου, η ποσότητα των υγρών αποβλήτων και η απογαλακτωματοποίηση πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τον προσδιορισμό της αναλογίας του υγρού προς στερεό (J. Liu, Gasmalla, Li, & Yang, 2016a).

Ο χρόνος επώασης ποικίλλει επίσης για διαφορετικούς ελαιούχους σπόρους και ένζυμα. Η απόδοση ελαίου, η ποιότητά του, ο ρυθμός ανάκτησης και το κόστος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης. Ο μεγάλος χρόνος επώασης

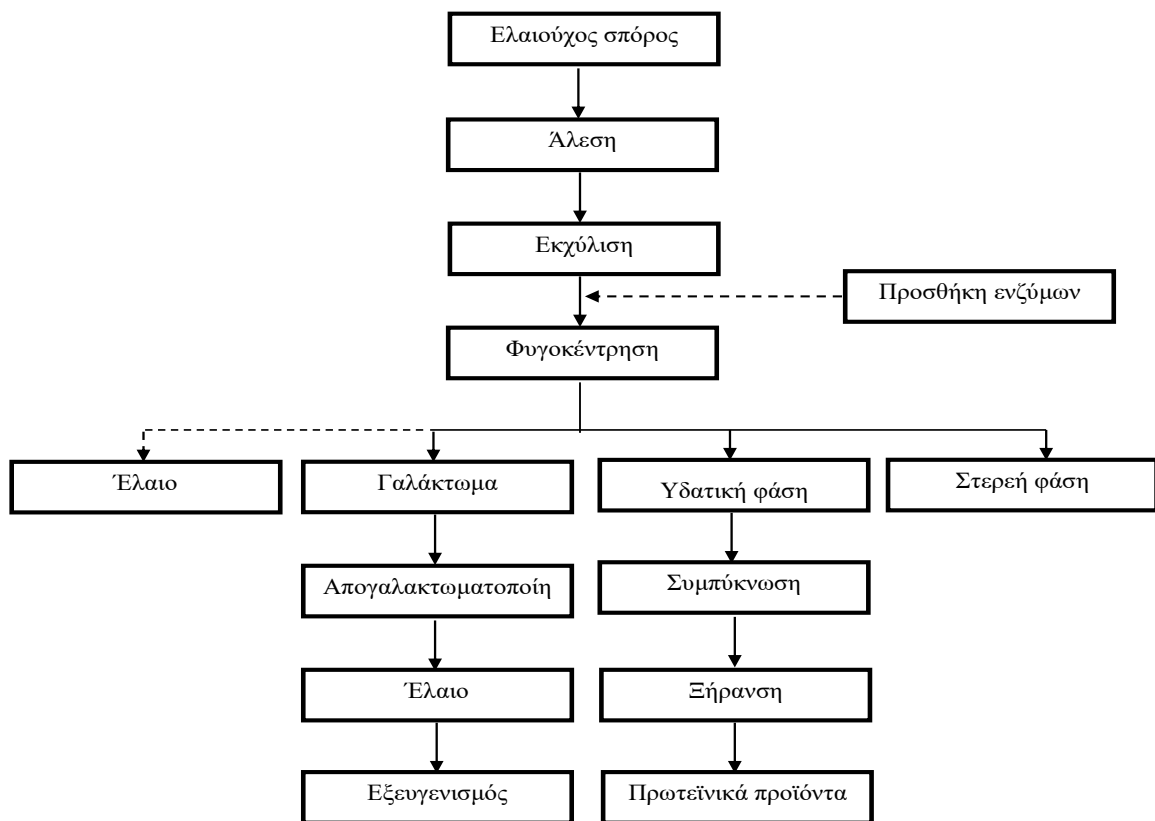
αυξάνει τη δυσλειτουργία της απογαλακτωματοποίησης κατά την εκχύλιση ελαίου και ο σύντομος χρόνος επώασης μειώνει την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής υδρόλυσης των ελαιούχων σπόρων, οδηγώντας έτσι σε χαμηλές αποδόσεις ελαίου. Η παράταση του χρόνου επώασης μπορεί να ενισχύσει την υποβάθμιση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Abdulkarim, Lai, Muhammad, & Long, 2006). Οι Passos, Yilmaz, Silva, & Coimbra (2009) ανέφεραν ότι ένα μίγμα ενζύμων από κυτταρινάση, πρωτεάση, ξυλανάση και πηκτινάση που χρησιμοποιήθηκε για 120 h είχε ως αποτέλεσμα να επιφέρει απόδοση σε έλαιο 3,8%, η οποία ήταν υψηλότερη από εκείνη, όταν το μίγμα ενζύμων χρησιμοποιήθηκε για 24 h. Ωστόσο, στη βιομηχανία δεν έχει εφαρμογή η χρήση τόσο μεγάλων χρόνων επώασης, καθώς αυτό προκαλεί υποβάθμιση της ποιότητας του ελαίου και απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Abdulkarim et al., 2006, Jiang, Hua, Wang, & Xu, 2010).

2.5.3.2 *Στάδια της EAE σε ελαιούχους σπόρους*

Η εκχύλιση των ελαιούχων σπόρων υποβοηθούμενη με ένζυμα συνίσταται κυρίως στη διασπορά των ελαιούχων σπόρων σε νερό και στην απελευθέρωση του ελαίου από τα κυτταρικά τοιχώματα (Liu, Gasmalla, Li, & Yang, 2016). Η μικροδομή ενός ελαιούχου σπόρου (φυστίκι) που είναι παρόμοια στους περισσότερους σπόρους παρουσιάζεται στο Σχήμα 31. Τα πρωτεϊνικά συστατικά κατανέμονται σε όλο το κύτταρο και βρίσκονται σε διαφορετικά μεγέθη ανάλογα με τα συστατικά και τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των ελαιούχων σπόρων. Αυτά τα πρωτεϊνικά συστατικά περιέχουν περίπου το 60-70% της συνολικής πρωτεΐνης του ελαιούχου σπόρου. Η διαδικασία της EAE απεικονίζεται στο Σχήμα 32. Τα στάδια της EAE είναι: (1) η μηχανική διάσπαση των ελαιούχων σπόρων με άλεση, (2) η εκχύλιση του ελαίου και της πρωτεΐνης με χρήση ενζύμων, (3) ο διαχωρισμός ενός πλούσιου σε έλαιο γαλακτώματος, αδιάλυτων στερεών και ενός υδατικού διαλύματος, και (4) η διάσπαση του γαλακτώματος του πλούσιου σε έλαιο κλάσματος για την ανάκτηση του ελαίου. Η φυγοκέντρωση είναι απαραίτητη στα επόμενα στάδια προκειμένου να διαχωριστεί το έλαιο από το γαλάκτωμα και το στερεό.



Σχήμα 31. Η μικροδομή ενός ελαιούχου σπόρου (φυστίκι), O: έλαιο, P: πρωτεΐνη και CW: κυτταρικό τοίχωμα (Liu et al., 2016)



Σχήμα 32. Τα στάδια της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα

2.5.3.3 Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμο (EAE)

Η EAE χρησιμοποιείται ευρέως για εκχύλισεις σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα. Λόγω των πλεονεκτημάτων της, μεταξύ των οποίων ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεσματική, η EAE θεωρείται ως μία αναδύομενη τεχνολογία. Στα τρόφιμα, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται βιομηχανικά για την εκχύλιση, τη διαύγαση και τη συμπύκνωση των χυμών από φρούτα (Nakkeeran, Umesh-Kumar, & Subramanian, 2011), την εκχύλιση πηκτινής (Ptichkina, Markina, & Rumyantseva, 2008), την εκχύλιση ελαίων (Mishra, Shukla, Dixit, & Singh, 2005), και την παραλαβή αρωμάτων και χρωστικών από φυτικές πηγές (Sowbhagya & Chitra, 2010). Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, η EAE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση ελαίων, αλλά επίσης και για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων όπως φαινολικών συστατικών από φυτικά υλικά, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τη χρήση των διαλυτών και την απαιτούμενη ενέργεια (Puri et al., 2012). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση ελαίου είναι συνήθως η κυτταρινάση, η α-αμυλάση και η πηκτινάση. Η ενσωμάτωση του ενζύμου στη διαδικασία παραγωγής του ελαιόλαδου παράγει έλαιο με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Ο συνδυασμός των ενζύμων, πηκτινάση και β-γλυκανάση, βελτιώνει την απόδοση ελαίου κατά 15%, που αντιστοιχεί σε μία αύξηση της απόδοσης περίπου 2 kg ελαιόλαδου ανά 100 kg ελιάς (García et al., 2001). Άλλα παραδείγματα εφαρμογής της EAE είναι η βελτίωση της απόδοσης σε ανακτώμενο έλαιο με χρήση ενζύμων από σπόρους σιναπιού (Tabtabaei & Diosady, 2013), ελαιοκράμβη (Latif, Diosady, & Anwar, 2008), σπόρους *Moringaoleifera* (Abdulkarim et al., 2006), σπόρους σόγιας (de Moura et al., 2016), σπόρους ηλίανθου (Latif & Anwar, 2009), ελαιόκαρπο (Najafian, Ghodsvali, Haddad Khodaparast, & Diosady, 2009), σπόρους φοινικόδενρου (Teixeira, Macedo, Macedo, da Silva, & Rodrigues, 2013), στέμφυλα (Puri et al., 2012), φυστίκι (Sharma, Khare, & Gupta, 2002), ελαιόκαρπο (Najafian et al., 2009), σπόρους *Isatisindigotica* (Gai et al., 2013), πυρήνες βατόμουρου (Zhang et al., 2012) και κάρδαμο (Baby & Ranganathan, 2016). Σε υποβοηθούμενη εκχύλιση φαινολικών συστατικών με ένζυμο από παραπροϊόντα ροδιού όπου έχουν χρησιμοποιηθεί κυτταρινάσες και πηκτινάσες, η αριστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης οδηγεί σε σημαντική αύξηση της απόδοσης των φαινολικών συστατικών έναντι των αντίστοιχων πειραμάτων απουσίας ενζύμων (Alexandre et al., 2018). Επιπλέον, οι Zhang, Lu, Yang, Li, & Wang (2011) και οι Fu et al. (2008) παρατήρησαν ότι η κυτταρινάση, η β-γλυκοζιδάση και η πηκτινάση μπορούν να υδρολύσουν τα κυτταρικά τοιχώματα από παραπροϊόντα φυστικιού και από φύλλα του *Cajanuscajan* (*L.*) *Millsp.*, αντίστοιχα, και να εκχυλίσουν φαινολικά συστατικά με μεγαλύτερες αποδόσεις έναντι της συμβατικής εκχύλισης. Επίσης, αύξηση των φαινολικών ενώσεων (25.90-39.72%) παρατηρήθηκε μετά την εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων από παραπροϊόντα εσπεριδοειδών (Li, Smith, & Hossain, 2006).

Ένας κατάλογος με προϊόντα υψηλής βιομηχανικής σημασίας που προκύπτουν με εκχύλιση υποβοηθούμενη με ένζυμα τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με ένζυμα

Προϊόν	Φυτική πηγή	Ένζυμο	Αναφορά
Έλαιο			
Έλαιο	Σπόροι μουστάρδας	Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L, Celluclast 1.5 L	(Tabtabaei & Diosady, 2013)
Έλαιο	Ελαιοκράμβη	Protex 7L, Multifect Pectinase FE, Multifect CX 13L, Natuzyme	(Latif et al., 2008)
Έλαιο	Σπόροι <i>Moringa oleifera</i>	Neutrased 0.8L (neutral protease), Termamyl 120L, type L (α -amylase), Pectinex Ultra SP-L (pectinase), Celluclast 1.5L FG (cellulase)	(Abdulkarim et al., 2006)
Έλαιο	Σπόροι σόγιας	Protex 6L	(de Moura et al., 2016)
Έλαιο	Ηλίανθος	Protex 7L, Alcalase 2.4L, Viscozyme L	(Latif & Anwar, 2009)
Έλαιο	Ελαιοκάρπος	πηκτινάση και β -γλυκανάση	(García et al., 2001)
Έλαιο	Ελιά	Pectinex Ultra SP-L, Pectinase 1.6021	(Najafian et al., 2009)
Έλαιο	Σπόροι φοινικόδεντρου	Celluclast 1.5 L, Pectinase, Multieffect FE	(Teixeira et al., 2013)
Έλαιο	Στέμφυλα	Κυτταρινάση, πρωτεάση, ξυλάση και πηκτινάση	(Puri et al., 2012)
Έλαιο	Φυστίκι	Πρωτεάσες	(Sharma et al., 2002)
Έλαιο	Ελαιοκάρπος	Pectinex Ultra SP-L and Pectinase 1.6021	(Najafian et al., 2009)
Έλαιο	Σπόροι <i>Isatis indigotica</i>	Κυτταρινάση / πρωτεΐνάση / πηκτινάση	(Gai et al., 2013)
Έλαιο	Πυρήνες βατόμουρου	Κυτταρίνη/πρωτεάση	(Zhang et al., 2012)
Έλαιο	Κάρδαμο	Celluclast 1.5 L, Pectinex Ultra SP.L, ViscozymeL and Protease	(Baby & Ranganathan, 2016)
Φαινολικά Συστατικά			
Φαινολικά συστατικά	Παραπροϊόντα ροδιού	4% (vol.) Πηκτινάση και 4% (vol.) κυτταρινάση	(Alexandre et al., 2018)

Φαινολικά συστατικά	Παραπροϊόν φυστικιού	Κυτταρινάσες	(S. Zhang et al., 2011)
Φαινολικά συστατικά	Παραπροϊόντα εσπεριδοειδών	Celluzyme MX	(Li et al., 2006)
Φαινολικά συστατικά	Cajanuscajan (L.) Millsp. φύλλα	Κυτταρινάση, β-γλυκοξειδάση και πηκτινάση	(Y. Fu et al., 2008)

2.5.3.4 *Οφέλη της εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων*

Η εφαρμογή ενζύμων για την προ-επεξεργασία της πρώτης ύλης για την εκχύλιση βιοενεργών ουσιών αποτελεί μία ελκυστική πρόταση. Η χρήση ενζύμων οδηγεί σε μείωση του χρόνου εκχύλισης, ελαχιστοποιεί τη χρήση των διαλυτών και παρέχει αυξημένη απόδοση και βελτιωμένη ποιότητα προϊόντος (Puri et al., 2012). Η γνώση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των πρώτων υλών βοηθά στην επιλογή ενός ενζύμου ή περισσότερων ενζύμων. Επίσης, η μειωμένη χρήση διαλύτη κατά την εκχύλιση είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για νομοθετικούς όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους, παρέχοντας μία "πιο πράσινη" επιλογή σε σχέση με την παραδοσιακή μη ενζυμική εκχύλιση.

Ωστόσο, η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών υποβοηθούμενη από ένζυμα έχει κάποιους εμπορικούς και τεχνικούς περιορισμούς: (i) το κόστος των ενζύμων είναι σχετικά ακριβό για την επεξεργασία μεγάλων ποσοτήτων πρώτης ύλης, (ii) τα επί του παρόντος διαθέσιμα παρασκευάσματα ενζύμων δεν μπορούν να υδρολύσουν εντελώς τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, περιορίζοντας την απόδοση της εκχύλισης των συστατικών, (iii) η εκχύλιση με ένζυμα απαιτεί σωστό και ακριβή σχεδιασμό σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς τα ένζυμα χρειάζονται συγκεκριμένες συνθήκες για να δράσουν, όπως το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, που ποικίλλουν. Εάν οι παραπάνω περιορισμοί μπορούν να ξεπεραστούν, τότε η εκχύλιση με χρήση ενζύμου θα μπορούσε να αυξήσει την απόδοση, αλλά και να ενισχύσει την ποιότητα του προϊόντος καθώς επιτρέπει τη χρήση ηπιότερων συνθηκών επεξεργασίας, όπως χαμηλότερες θερμοκρασίες εκχύλισης (Marić et al., 2018, Saha, Qureshi, Kennedy, & Cotta, 2016).

2.5.4 **Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υψηλή υδροστατική πίεση (High hydrostatic pressure assisted extraction, HHPAE)**

Η επεξεργασία με υψηλή υδροστατική πίεση είναι μία μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων, η οποία βρίσκει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, όπως η απενεργοποίηση της

δράσης μικροοργανισμών, η μετουσίωση των πρωτεϊνών και η επέκταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων (López-Fandiño, 2006), (San Martín, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 2002).

Η εφαρμογή της επεξεργασίας με υψηλή πίεση στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυσικά υλικά είναι νέα αναδύομενη τεχνική και είναι γνωστή ως εκχύλιση υπερυψηλής πίεσης ή εκχύλιση υψηλής υδροστατικής πίεσης (High hydrostatic pressure assisted extraction - HHPAE). Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε υψηλή πίεση (συνήθως από 100-600 MPa) και χαμηλή θερμοκρασία (συνήθως μέχρι 60 °C), χρησιμοποιώντας μικρούς όγκους διαλυτών, ενώ παρέχει ανακτήσεις παρόμοιες με άλλες τεχνικές (Shouqin et al., 2005b). Προσφέρει υψηλές αποδόσεις εκχύλισης, χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και δεν υποβαθμίζει τη δράση και τη δομή των βιοδραστικών συστατικών. Οι παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση είναι ο διαλύτης, η πίεση, η θερμοκρασία, ο χρόνος, ο αριθμός των κύκλων κ.α. (Corrales, Toepfl, Butz, Knorr, & Tauscher, 2008).

2.5.4.1 Γενική αρχή της HHPAE

Η πίεση θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στην εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση και συνδέεται άμεσα με τη διαλυτότητα των βιοδραστικών συστατικών. Στην εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση, ο ρυθμός μεταφοράς μάζας των βιοδραστικών συστατικών από την πρώτη ύλη προς το διαλύτη αυξάνεται, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία ότι η εκχύλιση με υπερυψηλή πίεση ευνοεί τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που οδηγούν σε ενισχυμένους ρυθμούς μεταφοράς μάζας λόγω μεταβολής του συντελεστή διάχυσης (Knorr, 1993, Sánchez-Moreno, de Ancos, Plaza, Elez-Martínez, & Cano, 2009, Barbosa-Cánovas, GV Pothakamury, Palou, & Swanson, 1998). Η μεταβολή του συντελεστή διάχυσης αποδίδεται κυρίως στη μεταβολή της πίεσης που προκαλείται στις φυτικές κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητά τους και να διευκολύνεται με αυτό τον τρόπο, η διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης μέσα στα κύτταρα των φυτικών πηγών.

Η εκχύλιση με χρήση υψηλής πίεσης διέπεται από την αρχή του Le Chatelier, η οποία δηλώνει ότι όταν ένα σύστημα σε ισορροπία διαταραχθεί, το σύστημα ανταποκρίνεται με τέτοιο τρόπο που τείνει να ελαχιστοποιήσει τη διαταραχή (Shouqin, Junjie, & Changzhen, 2004). Ο όγκος του συστήματος τείνει να μειωθεί κατά τη διάρκεια της περιόδου αύξησης της πίεσης, ωθώντας το διαλύτη να διεισδύσει στα κύτταρα και να εκχυλίσει τα βιοδραστικά συστατικά. Η εφαρμογή της υψηλής πίεσης διαταράσσει την κυτταρική δομή των ενζύμων, πρωτεϊνών, λιπιδίων μειώνοντας την αντίσταση των κυττάρων στη μεταφορά μάζας και αυξάνοντας τη διαπερατότητά τους (Yang, Li, Zhu, & Zhang, 2010). Όσο μεγαλύτερη είναι η πίεση που εφαρμόζεται, τόσο περισσότερος διαλύτης μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και περισσότερες ενώσεις-στόχοι να διαπεράσουν στο διαλύτη (Shouqin, Jun, & Changzheng, 2005a). Επιπλέον η εφαρμογή της υψηλής πίεσης αδρανοποιεί τα ένζυμα αποικοδόμησης, προσφέροντας

υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης σε σύγκριση με άλλες τεχνικές (Ahmed & Ramaswamy, 2006). Η υψηλή πίεση μπορεί επίσης να μειώσει την τιμή του pH του διαλύτη κατά την εκχύλιση, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των βιοενεργών συστατικών, καθώς οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις είναι πιο σταθερές σε pH μικρότερο από 4 (Corrales et al., 2008).

2.5.4.2 Εξοπλισμός ΗΗΡΑΕ

Ο εξοπλισμός της ΗΗΡΑΕ αποτελείται από ένα θάλαμο υψηλής πίεσης και το σύστημα σφράγισής του, ένα σύστημα παραγωγής πίεσης, ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας και ένα σύστημα διαχείρισης υλών (R. Chen, Meng, Zhang, & Liu, 2009). Οι περισσότεροι θάλαμοι κατασκευάζονται από υλικά με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό, συνήθως μονομηματικά (monoblocs, κομμένα από ένα ενιαίο κομμάτι μετάλλου) κομμάτια κραμάτων του χάλυβα. Οι θάλαμοι αυτοί αντέχουν σε πιέσεις 400 με 600 MPa. Για μεγαλύτερες πιέσεις, οι θάλαμοι κατασκευάζονται από πολυστρωματικά υλικά. Τα συστήματα φραγής είναι συνήθως χαλύβδινα πάματα που φέρουν σπείρωμα ή για μείωση του χρόνου ανοίγματος και κλεισίματος, σφραγισμένα πλαίσια που τοποθετούνται πάνω από τους θαλάμους.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας γίνεται με μανδύες γύρω από τους θαλάμους ΗΗΡΑΕ, στους οποίους κυκλοφορεί ψυκτικό/θερμαντικό μέσο ανάλογα με τις ανάγκες. Σημαντικό μειονέκτημα ωστόσο σε μεγάλους θαλάμους είναι η αργή θερμοκρασιακή απόκριση, στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται εσωτερικές σπείρες εναλλαγής θερμότητας (Ohlsson, 2002).

Η πίεση σε ένα δοχείο μπορεί να ασκηθεί με διαφορετικούς τρόπους. Στην άμεση συμπίεση, ένα ρευστό τρόφιμο συμπιέζεται κατευθείαν από τη μικρότερη πλευρά ενός εμβόλου. Η μεγαλύτερη πλευρά του εμβόλου είναι συνδεδεμένη με μία αντλία χαμηλής πίεσης, επιτρέποντας έτσι τον πολλαπλασιασμό της πίεσης. Η άμεση συμπίεση επιτρέπει την πολύ γρήγορη συμπίεση, αλλά δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε δοχεία μεγάλης κλίμακας λόγω ενδεχόμενης ανεπάρκειας της στεγανότητας του εμβόλου.

Κατά την έμμεση συμπίεση, ένα ρευστό άσκησης πίεσης (νερό ή γλυκερόλη) αντλείται σε έναν ερμητικά κλειστό θάλαμο από έναν ενισχυτή πίεσης. Τα περισσότερα συστήματα ισοστατικής συμπίεσης χρησιμοποιούν την έμμεση συμπίεση.

Τέλος, συμπίεση μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση του ρευστού πίεσης, το οποίο διαστέλλεται. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου απαιτείται συνδυασμός πίεσης και υψηλής θερμοκρασίας και χρειάζεται πολύ ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας.

Οι παραπάνω τρόποι δημιουργίας υπερυψηλής πίεσης εφαρμόζονται σε συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας, όπου τα τρόφιμα επεξεργάζονται σε παρτίδες. Έτσι, σε αντίθεση με τα συστήματα συνεχούς λειτουργίας, μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα μεγάλη ποσότητα τροφίμου να έρθει σε επαφή με λιπίδια ή σωματίδια από φθορά του εξοπλισμού. Επίσης ο σχεδιασμός του εξοπλισμού είναι απλούστερος. Μέχρι στιγμής στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται μόνο συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας (Barbosa-Canovas, GV Pothakamury et al., 1998).

Τυπικά, ένα σύστημα ασυνεχούς λειτουργίας επεξεργασίας συσκευασμένων τροφίμων αποτελείται από μεμονωμένους θαλάμους πίεσης. Συσκευασμένα τρόφιμα τοποθετούνται στους θαλάμους, οι οποίοι σφραγίζονται και πληρώνονται με το υγρό πίεσης που είναι συνήθως αναμεμιγμένο με μικρή ποσότητα ελαίου για λόγους προστασίας από διάβρωση. Η πίεση ασκείται στα τρόφιμα αυξάνοντας την πίεση του υγρού που είναι ομοιόμορφη (ισοστατική συμπίεση). Το τρόφιμο παραμένει υπό πίεση για συγκεκριμένο χρόνο και μετά την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας, ο θάλαμος εκτονώνεται, αδειάζεται και επαναπληρώνεται με την επόμενη παρτίδα.

Τα περισσότερα βιομηχανικά συστήματα ΗΗΡΑΕ είναι ημισυνεχούς λειτουργίας, περιλαμβάνοντας συστοιχίες από θαλάμους ασυνεχούς λειτουργίας. Οι θάλαμοι λειτουργούν εναλλάξ και οι γραμμές φόρτωσης και εκφόρτωσης είναι πλήρως αυτοματοποιημένες (Ohlsson, 2002).

Πρόκληση για τους κατασκευαστές του εξοπλισμού αποτελεί η κατασκευή μηχανημάτων ανθεκτικών σε υψηλές πιέσεις, αλλά και σε συνεχείς κύκλους συμπίεσης-εκτόνωσης. Οι κύκλοι πρέπει να είναι σύντομοι, ώστε να μην δημιουργούνται καθυστερήσεις μεταξύ των παρτίδων και να είναι πλήρως ελέγξιμοι. Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί αντοχή σε πιέσεις μεγαλύτερες από 400 MPa και χρόνους παραμονής από 5 έως και 20 min.

2.5.4.3 Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερυψηλή πίεση (ΗΗΡΑΕ)

Η τεχνική της υπερυψηλής πίεσης χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στην εκχύλιση ανθοκυανινών (Corrales et al., 2008), κατεχινών και πολυφαινολών (Xi, 2013), φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων (Prasad et al. 2009) καθώς επίσης καικαροτενοειδών. Για παράδειγμα (Πίνακας 14), οι Pinela et al. (2017) εφάρμοσαν την ΗΗΡ για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από το φυτό νεροκάρδαμο σε διάφορες συνθήκες, όπως συγκέντρωση αιθανόλης (0-100 % v/v), πίεση (0,1-600 MPa), χρόνος (1,5-33,5 min) και αναλογία στερεού: υγρού με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης. Η βέλτιστη απόδοση σε ολικό περιεχόμενο φαινολικού φορτίου βρέθηκε 64.68 mg/g εκχυλίσματος με εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 3,1

min και χρήση αιθανόλης 100%. Οι Alexandre et al. (2018) αναφέρουν ότι εφάρμοσαν HHP για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από παραπροϊόντα ροδιού και βρήκαν ότι η εφαρμογή πίεσης 300 για 15 min με χρήση νερού ως διαλύτη εκχύλισης παρείχε το βέλτιστο ολικό περιεχόμενο φαινολικού φορτίου στα παραλαμβανόμενα εκχυλίσματα. Επίσης, από μελέτη των Young et al. (2017) για εκχύλιση φαινολικών οξέων από ρύζι (*Oryza sativa* L.) με HHP προέκυψαν εκχυλίσματα με συγκέντρωση φαινολικών 183.52 mg/g στα 100 MPa στους 37 °C για 24 h.

Επιπλέον, οι Adil, Yener, & Bayindirli (2008) εξέτασαν την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από βύσσινο με χρήση HHP και αριστοποίησαν τη διεργασία για διάφορες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας, αναλογίας στερεού:υγρού και χρόνου. Οι Yu, Shouqin, & Gao (2008) ανέπτυξαν διάφορες μεθόδους για την εκχύλιση (HHP, συμβατική, Soxhlet, υπέρηχοι) πολυφαινολών από κελύφη φυσιτικών και βρήκαν ότι η απόδοση εκχύλισης των πολυφαινολών διέφερε σημαντικά ακολουθώντας τη σειρά: HHP (70,2 mg/g), Soxhlet (69,8 mg/g), συμβατική (67,3 mg/g) και υπέρηχοι (64,5 mg/g). Επιπλέον, οι Xi et al. (2009) βελτιστοποίησαν τις συνθήκες εκχύλισης με HHP των πολυφαινολών από φύλλα πράσινου τσαγιού για διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως: διαλύτες, πίεση, χρόνος και αναλογία στερεού: υγρού, και κατέληξαν ότι η βέλτιστη απόδοση εκχύλισης πολυφαινολών με HHP για μόνο 1 min ήταν ίδια με την αντίστοιχη με τη μέθοδο Soxhlet για 20 h, με υπέρηχους για 90 min και τη συμβατική μέθοδο για 45 min. Οι Prasad, Yang, Yi, Zhao, & Jiang (2009) και οι Prasad et al. (2010) εφάρμοσαν την HHP για εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από περικάρπιο φρούτων longan και απέδειξαν ότι η HHP επέτυχε υψηλότερη απόδοση εκχύλισης και σε μικρότερο χρόνο εκχύλισης σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο και τη μέθοδο με χρήση υπέρηχων, αντίστοιχα.

Πρόσφατες εφαρμογές απέδειξαν το πλεονέκτημα της εφαρμογής της HHP για την εκχύλιση και άλλων βιοδραστικών συστατικών, όπως το λυκοπένιο (Xi, 2006), η καφεΐνη (Xi, 2009), οι λιγνάνες (C. Liu, Zhang, & Wu, 2009) κ.α.

Πίνακας 14. Εφαρμογές της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υψηλή υδροστατική πίεση

Βιοδραστική ουσία	Διαλύτης	Πίεση (MPa)	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Αναφορά
Φαινολικά συστατικά				
Φαινολικές ενώσεις από νεροκάρδαμο	100 % Αιθανόλη	600	3,1	(Pinela et al., 2017)
Φαινολικές ενώσεις από παραπροϊόντα ροδιού	Νερό	300	15	(Alexandre et al., 2018)
Φαινολικές ενώσεις από ρύζι	Νερό	100	1440	(Young et al., 2017)
Φαινολικές ενώσεις από βύσσινο	20% Αιθανόλη (1:6.6)	200	25	(I. Adil et al., 2008)
Πολυφαινόλες από κελύφη φυσιτικών	70% Αιθανόλη (1:40)	400	1	(Yu et al., 2008)
Πολυφαινόλες από φύλλα πράσινου τσαγιού	50% Αιθανόλη (1:20)	500	1	(Xi, 2013)
Φαινολικές ενώσεις από περικάρπιο φρούτων longan	50% Αιθανόλη (1:50)	500	2.5	(Prasad et al., 2009)
Φαινολικές ενώσεις από περικάρπιο φρούτων longan	Αιθανόλη:HCl (85:15)	500	2.5	(Prasad et al., 2010)
Άλλα				
Λυκοπένιο από σπόρους τομάτας	75% Αιθανόλη (1:6)	500	1	(Xi, 2006)
Καφεΐνη από πράσινο τσάι	50% Αιθανόλη (1:20)	500	1	(Xi, 2009)
Λιγνάνες από Schisandra chinensis baill	90% Αιθανόλη (1:90)	400	5	(Liu et al., 2009)

2.5.5 Εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

Η εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση (PLE), που αναφέρεται και ως επιταχυνόμενη ή υποκρίσιμη εκχύλιση με διαλύτες, χρησιμοποιεί οργανικούς υγρούς διαλύτες σε

θερμοκρασίες από 50-200 °C και πιέσεις από 99-148 atm προκειμένου να επιτευχθεί ταχύς ρυθμός εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων (Mustafa & Turner, 2011). Όταν ο διαλύτης είναι 100 % νερό, η μέθοδος ονομάζεται υπέρθερμη εκχύλιση νερού, υποκρίσιμη εκχύλιση νερού ή εκχύλιση με χρήση θερμού νερού υπό πίεση (Pronyk & Mazza, 2009).

Οι υψηλές θερμοκρασίες της εκχύλισης ευνοούν: i) την αύξηση της ικανότητας των διαλυτών να διαλυτοποιούν τα ανακτώμενα συστατικά, ii) την αύξηση των συντελεστών διάχυσης, iii) τη ρήξη των δυνάμεων συνοχής μεταξύ των συστατικών και του υλικού, iv) τη μείωση του ιξώδους του διαλύτη και v) την ελάττωση της επιφανειακής τάσης (Ramos, Kristenson, & Brinkman, 2002). Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη μειώνεται, με συνέπεια την ελάττωση της πολικότητάς του. Η θερμοκρασία ρυθμίζει την πολικότητα του διαλύτη, έτσι ώστε να προσεγγίσει την πολικότητα των ανακτώμενων συστατικών (Dunford, Irmak, & Jonnala, 2010). Για παράδειγμα, η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς του νερού είναι περίπου 80 σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους 250 °C μειώνεται σε 30. Σε αυτές τις συνθήκες, η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς είναι παρόμοια με αυτήν που έχουν οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη ή η μεθανόλη. Το ίδιο παρατηρείται και με τη διαλυτότητα που ελαττώνεται, πλησιάζοντας την τιμή που έχουν τα συστατικά μειωμένης πολικότητας (Í. Adil, Çetin, Yener, & Bayındırlı, 2007). Επομένως, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση μη πολικών συστατικών και να αντικαταστήσει τους οργανικούς διαλύτες. Η υψηλή πίεση που ασκεί ο υγρός διαλύτης στο στερεό υλικό διευκολύνει την ταχύτερη διείσδυσή του στα κύτταρα και περαιτέρω την ευκολότερη εκχύλιση των συστατικών (Soquetta, Terra, & Bastos, 2018, Mustafa & Turner, 2011).

Οι Machado, Pasquel-Reátegui, Barbero, & Martínez (2015) παρέλαβαν εκχυλίσματα με βιοδραστικά συστατικά από παραπροϊόντα μούρων χρησιμοποιώντας εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση. Εξέτασαν διάφορους διαλύτες (νερό, νερό με pH=2,5, αιθανόλη) και θερμοκρασίες (60, 80 και 100 °C), και συγκρίνοντας με τη συμβατική εκχύλιση βρήκαν καλύτερα αποτελέσματα με εκχύλιση με χρήση υγρών διαλυτών (νερού και αιθανόλης) υπό πίεση σε θερμοκρασία 100 °C, αποδεικνύοντας ότι η χρήση αυτής της τεχνολογίας είναι πολλά υποσχόμενη για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από φρούτα. Οι Xu et al. (2016) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο εκχύλισης νερού υπό πίεση για να παραλάβουν πολυσακχαρίτες από φραγκοστάφυλο και να ερευνήσουν την αντιοξειδωτική τους δράση και προσδιόρισαν ως βέλτιστες συνθήκες: χρόνο: 51 min, πίεση: 1,6 MPa και θερμοκρασία: 52 °C. Επίσης, οι Bajzer, Bajzerová, Kreml, Eisner, & Ventura (2015) εφάρμοσαν τη μέθοδο για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από πιπεριές, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη νερό υπό σταθερή πίεση 20 MPa, θερμοκρασία από 120 έως 240 °C και χρόνο από 5 έως 60 min και βρήκαν περίπου 113% πιο αποτελεσματική τη μέθοδο με πίεση σε σύγκριση με τη μέθοδο Soxhlet.

Επιπρόσθετα, οι Plaza et al. (2010) εφάρμοσαν την εκχύλιση υπό πίεση (PLE) με επιλεγμένους διαλύτες (εξάνιο, αιθανόλη και νερό) σε θερμοκρασία από 50-200 °C για 20 min για την ανάκτηση μεγάλου αριθμού λειτουργικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των καροτενοειδών από τα φύκη *Himantaliaelongata* και τα μικροφύκη *Synechocystis* sp. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα στους 100 °C που παρελήφθησαν μετά από 20 min περιείχαν ως κύρια καροτενοειδή το β-καροτένιο, και ακολούθως τη ζεαξανθίνη.

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση της εκχύλισης υπό πίεση (PLE) για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς (*Olea europaea*, cv. *Oblica*) σε θερμοκρασίες: 60-100 °C και χρόνους: 5-15 min έδειξε ότι η υψηλότερη ποσότητα συνολικών πολυφαινολών (64,71 mg / g) στα εκχυλίσματα επιτεύχθηκε στους 80 °C για διάρκεια 5 min (Putnik et al., 2017). Οι Conte et al. (2016) εφάρμοσαν την εκχύλιση υπό πίεση (PLE) για την παραλαβή ελαίου από το φυτό αγιάγκαθο (κνήκος) σε πίεση 400 bar και θερμοκρασία 250 °C με διαλύτες νερό και αιθανόλη για 1h.

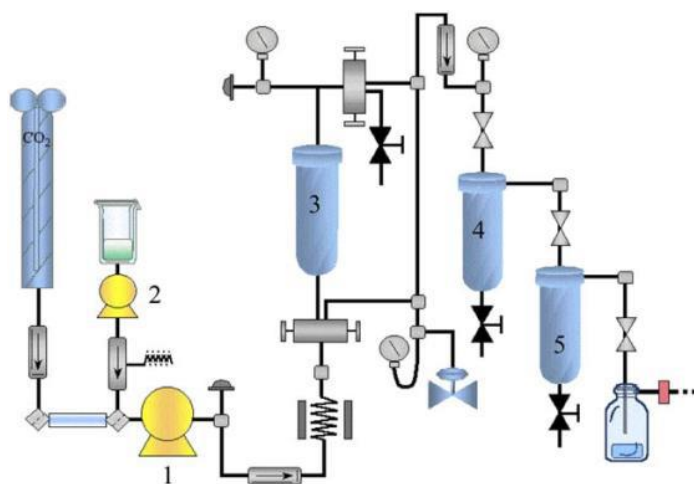
Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης υγρών υπό πίεση σε σχέση με τη συμβατική εκχύλιση είναι η ταχύτητα της διεργασίας, η χρήση μικρότερων ποσοτήτων διαλύτη και οι υψηλότερες αποδόσεις. Ως βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αναφέρεται η μη καταλληλότητά της για θερμοευαίσθητα συστατικά, αφού η υψηλή θερμοκρασία επιδρά ενίοτε καταστροφικά στη δομή και τη λειτουργικότητά τους (Azmir et al., 2013).

2.5.6 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστά (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστά (SFE) είναι μέθοδος εκχύλισης, φιλική προς το περιβάλλον με στόχο τη μεγάλη εκλεκτικότητα, τους μικρούς χρόνους εκχύλισης, την πρόληψη της ρύπανσης του περιβάλλοντος και τη χρήση μη τοξικών οργανικών διαλυτών (L. Wang & Weller, 2006). Η SFE βασίζεται σε επιλεγμένες ιδιότητες των ρευστών, όπως είναι η πυκνότητα, η ικανότητα διάχυσης, η διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες τους, και η ικανότητα που έχουν με κατάλληλη μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας να δημιουργούν ένα υπερκρίσιμο ρευστό (Sihvonen, Järvenpää, Hietaniemi, & Huopalahti, 1999, Azmir et al., 2013). Υπό αυτές τις συνθήκες, το υπερκρίσιμο ρευστό βρίσκεται σε ενδιάμεση κατάσταση υγρού-αερίου, με πυκνότητα παρόμοια με αυτήν του υγρού και ιξώδες παρόμοιο με του αερίου (Sihvonen et al., 1999, Wang, Weller, Schlegel, Carr, & Cuppett, 2008). Τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν βελτιωμένες ιδιότητες μεταφοράς μάζας σε σχέση με αυτές των υγρών, διότι η πυκνότητά τους ρυθμίζεται με μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας. Επιπλέον, τα

υπερκρίσιμα ρευστά έχουν σχετικά μικρή επιφανειακή τάση, με συνέπεια την αποφυγή της αλλοίωσης ευπαθών συστατικών.

Κατά τη διαδικασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης, η πρώτη ύλη (φυτά, παραπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων, φύκη, μικροφύκη, κ.α.) τοποθετείται στο δοχείο εκχύλισης, όπου η θερμοκρασία και η πίεση ρυθμίζονται στις επιθυμητές συνθήκες. Στο δοχείο ασκείται πίεση από το ρευστό μέσω αντλίας. Στη συνέχεια, το ρευστό και τα διαλυμένα συστατικά μεταφέρονται στους διαχωριστήρες, όπου συλλέγονται από το κάτω μέρος αυτών (Σχήμα 33), ενώ το ρευστό αναγεννάται και ανακυκλώνεται ή απελευθερώνεται στο περιβάλλον (Sihvonnen et al., 1999).



Σχήμα 33. Πειραματική συσκευή εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά (1) Αντλία CO₂, (2) Αντλία ρύθμισης ροής, (3) Εκχυλιστήρας, (4) και (5) Διαχωριστήρες

Ως υπερκρίσιμα ρευστά μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά ρευστά (αιθυλένιο, μεθάνιο, άζωτο, ξένο ή φθοράνθρακες), αλλά τα περισσότερα συστήματα διαχωρισμού χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα πραγματοποιείται στην υπερκρίσιμη περιοχή του CO₂, σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από τις αντίστοιχες κρίσιμες του αερίου CO₂ (31,1 °C και 7,4 MPa), και είναι εναλλακτική της χρήσης οργανικών διαλυτών. Τα πλεονεκτήματα που παρέχει είναι ότι το CO₂ είναι μη εκρηκτικό, μη τοξικό αέριο, χαμηλού κόστους, διαλυτοποιεί λιπόφιλες ενώσεις και μπορεί να ανακτηθεί εύκολα, παρέχοντας εκχυλίσματα απαλλαγμένα από διαλύτες (Wang & Weller, 2006, Wang et al., 2008). Επιπλέον, αυτό το αέριο είναι φιλικό προς το περιβάλλον και «αναγνωρισμένο γενικά ως ασφαλές» (GRAS) από τους οργανισμούς FDA (U.S. Food and Drug Administration) και EFSA (European Food Safety Authority).

Εξαιτίας της χαμηλής του πολικότητας, το CO₂ δεν είναι αποτελεσματικό στην εκχύλιση συστατικών υψηλής πολικότητας. Τα πολικά συστατικά διαλύονται ελάχιστα στο υπερκρίσιμο CO₂ και πρακτικά δεν εκχυλίζονται. Για αυτό χρησιμοποιούνται συνδιαλύτες (εξάνιο, μεθανόλη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο) σε μικρές ποσότητες, προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα των συστατικών και η επιλεκτικότητα της μεθόδου (Sihvonon et al., 1999). Από τους συνδιαλύτες που αναφέρθηκαν, προτιμάται συνήθως η αιθανόλη, λόγω χαμηλής τοξικότητας και καλής αναμιξιμότητας με το CO₂ (Liza et al., 2010).

Η επιτυχής εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών από φυτά βασίζεται σε διάφορες παραμέτρους της SFE, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, το μέγεθος σωματιδίων, η υγρασία της πρώτης ύλης, ο χρόνος εκχύλισης, ο ρυθμός ροής του CO₂ και η αναλογία στερεού-υγρού (Soquetta et al., 2018).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης υπερκρίσιμων υγρών για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων μπορούν να γίνουν κατανοητά λαμβάνοντας υπόψη τα ακόλουθα: (1) Το υπερκρίσιμο υγρό έχει υψηλότερο συντελεστή διάχυσης, χαμηλότερο ιξώδες και μικρότερη επιφανειακή τάση από έναν υγρό διαλύτη, οδηγώντας σε μεγαλύτερη διείσδυση στη στερεή μήτρα και ενισχύοντας τη μεταφορά μάζας. Ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται σημαντικά με την εφαρμογή της SFE σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους. (2) Η επαναροή του υπερκρίσιμου υγρού στο στερεό υλικό παρέχει πλήρη εκχύλιση. (3) Η εκλεκτικότητα του υπερκρίσιμου υγρού είναι υψηλότερη από έναν υγρό διαλύτη καθώς είναι δυνατόν να ρυθμίζεται η διαλυτοποίησή του με αλλαγή της θερμοκρασίας ή/και της πίεσης. (4) Ο διαχωρισμός της διαλυμένης ουσίας από το διαλύτη παρακάμπτεται με αποσυμπίεση του υπερκρίσιμου υγρού, παρέχοντας έτσι εξοικονόμηση χρόνου. (5) Η SFE λειτουργεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, καθιστώντας τη μέθοδο ιδανική για την απομόνωση θερμο-ευαίσθητων ενώσεων. (6) Η SFE χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη και θεωρείται μέθοδος φιλική προς το περιβάλλον. (7) Η ανακύκλωση και η επαναχρησιμοποίηση του υπερκρίσιμου υγρού είναι δυνατή, ελαχιστοποιώντας έτσι την παραγωγή αποβλήτων. (8) Με τον κατάλληλο σχεδιασμό η SFE μπορεί να εφαρμοστεί για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα (Azmir et al., 2013).

2.5.6.1 Εφαρμογές της εκχύλισης με χρήση του CO₂

Η χρήση του CO₂ αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο για την εκχύλιση ελαίου και αντιοξειδωτικών ενώσεων από φυτά (Meneses, Caputo, Scognamiglio, Reverchon, & Adami, 2015), φρούτα (Viganó et al., 2016), λαχανικά (Bagheri et al., 2016) και μικροοργανισμούς (Yen, Yang, Chen, & Chang, 2015).

Οι Grijó, Piva, Osorio, & Cardozo-Filho (2019) πραγματοποίησαν εκχύλιση με χρήση CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό για την παραλαβή ελαίου από το φυτό *Cannabis sativa* L. και βρήκαν ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης: θερμοκρασία 60 °C και πίεση 40 MPa. Ακόμη οι Martin, Skinner, & Marriott (2015) χρησιμοποίησαν CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό για την εκχύλιση ελαίου από ελαιοκράμβη και επέτυχαν ως βέλτιστες συνθήκες: πίεση 55 MPa και θερμοκρασία 35 °C, παρέχοντας απόδοση 100,3 g ελαίου ανά kWh.

Οι Cavalcanti, Albuquerque, & Meireles (2016) πραγματοποίησαν μία μελέτη σχετικά με την αξιοποίηση του κουπουασού (cupuaçu) με χρήση CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό. Το βούτυρο του κουπουασού που λαμβάνεται από την εκχύλιση είναι ένα πολύτιμο συστατικό με εφαρμογές σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά, λόγω των υψηλών επιπέδων σε τοκοφερόλες και ακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκό και λινελαϊκό). Οι βέλτιστες συνθήκες ως προς την κινητική της εκχύλισης, τη χημική σύσταση και το κόστος λειτουργίας που βρέθηκαν ήταν: 30-35 MPa και 50 °C.

Οι Guedes et al. (2013) χρησιμοποίησαν CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό για την εκχύλιση καροτενοειδών και χλωροφύλλης από μικροφύκη *Scenedes musobliquus*. Η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης ελήφθη στα 250 bar, ενώ η κατάλληλη θερμοκρασία για την απόκτηση υψηλής απόδοσης σε χλωροφύλλη ήταν 40 °C και σε καροτενοειδή ήταν 60 °C. Οι Malaman, Moraes, West, Ferreira, & Oliveira (2011) χρησιμοποίησαν επίσης CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από κεράσι, και τα εκχυλίσματα που παρέλαβαν παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις σε φαινολικά συστατικά. Οι Sodeifian, Ghorbandoost, Sajadian, & Saadati Ardestani (2016) πραγματοποίησαν εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) με CO₂ για την παραλαβή ελαίου από φρούτα *Pistaciakhinjuk* και αριστοποίησαν τη διεργασία για τις διάφορες παραμέτρους λειτουργίας, όπως την πίεση (12-24 MPa), τη θερμοκρασία (35-55 °C), την παροχή (2-6 g/min), και το χρόνο εκχύλισης (0-300 min). Επιπλέον, οι Romo-Hualde, Yetano-Cunchillos, González-Ferrero, Sáiz-Abajo, & González-Navarro (2012) μελέτησαν διάφορες παραμέτρους που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης, χρησιμοποιώντας CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό. Η υψηλότερη απόδοση της βιταμίνης E (97%) και της προβιταμίνης A (68,1%) σε κόκκινη πιπεριά (*Capsicumannum* L.) επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία 60 °C και πίεση 24 Pa.

Πρόσφατα, οι Nobre et al. (2012) εκχύλισαν λυκοπένιο από βιομηχανικά παραπροϊόντα τομάτας (μίγμα φλοιών και σπόρων) χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο αιθάνιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, με το υπερκρίσιμο αιθάνιο και το μίγμα αιθανίου-προπανίου, η εκχύλιση του λυκοπένιου πραγματοποιήθηκε γρηγορότερα και ήταν αποδοτικότερη σε σχέση με την αντίστοιχη του υπερκρίσιμου CO₂.

Οι Stavroulias & Panayiotou (2005) χρησιμοποίησαν επίσης CO₂ ως υπερκρίσιμο ρευστό για την εκχύλιση ελαίου από ελαιοπυρήνα και βελτιστοποίησαν τη διεργασία ως προς την πίεση, τη θερμοκρασία και τη ροή του ρευστού CO₂ για την παραλαβή πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου με τη μέγιστη ποσότητα σκουαλενίου. Οι συνθήκες στις οποίες κατέληξαν ήταν: πίεση: 1,3 MPa, θερμοκρασία: 36-40 °C και ροή CO₂: 1,8 g/min.

2.5.7 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed Electric Field, PEF)

Το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (PEF) αναγνωρίστηκε ως μία χρήσιμη κατεργασία για τη βελτίωση της ξήρανσης, της εκχύλισης και των διεργασιών διάχυσης κατά την τελευταία δεκαετία (Soquetta et al., 2018, Azmir et al., 2013, Vorobiev & Lebonka, 2009). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης για την αύξηση της εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής ενός κυττάρου στο ηλεκτρικό πεδίο, ένα ηλεκτρικό δυναμικό περνά μέσα από τη μεμβράνη του κυττάρου. Σύμφωνα με τη διπολική φύση των μορίων της μεμβράνης, το ηλεκτρικό δυναμικό διαχωρίζει τα μόρια, ανάλογα με το φορτίο τους, στην κυτταρική μεμβράνη. Με την υπέρβαση μίας κρίσιμης τιμής περίπου 1V δυναμικού διαμεμβράνης, προκαλείται απόφραξη μεταξύ των μορίων με φορτίο που σχηματίζουν πόρους σε ασθενείς περιοχές της μεμβράνης, και προκαλείται δραστική αύξηση της διαπερατότητάς της (Soquetta et al., 2018). Συνήθως, ένα απλό κύκλωμα με εκθετική αποσύνθεση παλμών χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των φυτικών υλικών με PEF. Ο εξοπλισμός των PEF αποτελείται από ένα θάλαμο που φέρει δύο ηλεκτρόδια, στον οποίο τοποθετούνται τα φυτικά υλικά. Ανάλογα με το σχεδιασμό του θαλάμου PEF, η διαδικασία μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής (σε παρτίδες). Η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας με PEF εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως η ισχύς του πεδίου, η ενέργεια εισόδου, ο αριθμός των παλμών, η θερμοκρασία επεξεργασίας και οι ιδιότητες του υλικού προς επεξεργασία (Puertolas, Saldana, & Raso, 2016).

Το PEF μπορεί να αυξήσει τη μεταφορά μάζας κατά την εκχύλιση λόγω καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης των φυτικών υλικών, ενισχύοντας την απόδοση της διεργασίας και μειώνοντας το χρόνο της εκχύλισης. Το PEF εφαρμόστηκε για να βελτιώσει την απελευθέρωση των ουσιών-στόχων από ένα φυτικό ιστό υποβοηθώντας την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Toerfl, Siemer, & Heinz, 2014). Η επεξεργασία με PEF σε μέτριο ηλεκτρικό πεδίο (500 και 1000 V/cm για 10⁻⁴-10⁻² s) βρέθηκε ότι προκαλεί βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη του φυτικού ιστού με μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Για αυτό το λόγο, το PEF ίναι δυνατόν να προκαλεί ελάχιστη υποβάθμιση των θερμο-ευαίσθητων ενώσεων (Ade-

Omowaye, Angersbach, Taiwo, & Knorr, 2001). Επίσης, το PEF μπορεί να εφαρμοστεί σε φυτικά υλικά ως διαδικασία προ-κατεργασίας πριν από τη συμβατική εκχύλιση.

Πιο αναλυτικά, οι Guderjan, Töpfl, Angersbach, & Knorr (2005) απέδειξαν ότι η ανάκτηση των φυτοστερολών από αραβόσιτο και των ισοφλαβονοειδών από σόγια αυξήθηκε κατά 32,4% και κατά 20-21%, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε PEF, ως διεργασία προ-επεξεργασίας. Επίσης, η διαπερατότητα των κυττάρων των σταφυλιών της ποικιλίας Merlot αυξήθηκε με εφαρμογή PEF, αυξάνοντας και την εκχύλιση πολυφαινολών και ανθοκυανινών (Delsart et al., 2014).

Οι Xue & Farid (2015) μελέτησαν τα αποτελέσματα της συνεχούς επεξεργασίας με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο στην περιοχή από 12,4-38,4 kV/cm για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών και βρήκαν βέλτιστες αποδόσεις στα 38,4 kV/cm και σε θερμοκρασία 85 °C. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης, η οποία βοηθά την ενίσχυση της εκχύλισης των ενώσεων, εμφανίζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι Leong, Burritt, & Oey (2016) μελέτησαν την απελευθέρωση των ανθοκυανινών σε χυμούς σταφυλιών μετά από επεξεργασία με PEF και βρήκαν τις βέλτιστες συνθήκες: παλμό: 20 mS, συχνότητα: 50 Hz και ένταση ηλεκτρικού πεδίου: 1,5 kV/cm. Σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο χυμό σταφυλιών, το PEF βοήθησε την απελευθέρωση των ανθοκυανινών, αύξησε το περιεχόμενό του σε βιοδραστικές ενώσεις και βιταμίνη C, καθώς και βελτίωσε την αντιοξειδωτική του δράση. Οι Segovia, Luengo, Corral-Pérez, Raso, & Almajano (2015) αναφέρουν την εκχύλιση πολυφαινολών από φύλλα *Borago officinalis* χρησιμοποιώντας PEF. Ο εξοπλισμός παράγαγε παλμούς κύματος με μέγιστη συχνότητα 300 Hz, μέγιστη τάση εξόδου 30 kV και ρεύμα 200 A, αυξάνοντας τα ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων από 1,3 σε 6,6% και από 2,0 σε 13,7%, αντίστοιχα.

Οι Jaeger, Schulz, Lu, & Knorr (2012) χρησιμοποίησαν το PEF σε χυμό μήλου και συμπέραναν ότι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών ήταν παρόμοιο με εκείνο που προκύπτει από συμβατικές μεθόδους, ωστόσο σε μειωμένο χρόνο επεξεργασίας.

2.5.8 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Homogenate assisted extraction, HAE)

Η εκχύλιση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας είναι μία εναλλακτική μέθοδος για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά, όπου η εφαρμογή μηχανικής διάτμησης πολύ υψηλής ταχύτητας έχει ως αποτέλεσμα την ανάμιξη του φυτικού υλικού με το διαλύτη και τη συντριβή χωρίς πίεση των κυτταρικών τοιχωμάτων του υλικού (Guo et al., 2017, Liu et al., 2013, X. Zhu, Mang, Shen, & Xie, 2014).



Σχήμα 34. Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε έναν περιστρεφόμενο εσωτερικό κόπτη που οδηγείται από έναν κινητήρα υψηλής ταχύτητας, ο οποίος παράγοντας μία ισχυρή δύναμη διάτμησης μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών κοπτικών, διαταράσσει τα κυτταρικά τοιχώματα και αναμιγνύει το στερεό υλικό με το διαλύτη (Σχήμα 34). Η μεταφορά μάζας μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη συμβαίνει λόγω των διαφορετικών πιέσεων μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών κοιλοτήτων που προκαλούνται από την υψηλή ταχύτητα περιστροφής (Guo et al., 2017).

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έχει τεκμηριωθεί στην εκχύλιση καμπτοθεκίνης και υδροξυκαμπτοθεκίνης από φύλλα *Camptotheca acuminata* (Shi, Zu, Zhao, & Yang, 2009) και ισοφλαβονών από αλεύρι σόγιας (Zhu, Lin, Xie, Chen, & Wang, 2011). Επιπλέον, οι Zhu et al. (2014) εφάρμοσαν την HAE για την εκχύλιση μίας κίτρινης χρωστικής από γαρδένια *Gardenia jasminoides Ellis* και οι Liu et al. (2013) για την ανάκτηση της δραστικής ουσίας σικονίνης από φυτό *Arnebia euchroma*. Πρόσφατα, οι Tong et al. (2018) χρησιμοποίησαν ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για την εκχύλιση της κροκίνης από κρόκο Κοζάνης και αριστοποίησαν τη διεργασία προσδιορίζοντας ως βέλτιστες συνθήκες: συγκέντρωση αιθανόλης: 70%, θερμοκρασία: 57°C και χρόνο: 40 s. Επίσης, οι Ke & Chen (2016) εφάρμοσαν ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για την ανάκτηση πολυσακχαριτών από μανιτάρι *Lentinusedodes* και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα με συμβατική μέθοδο βρήκαν ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης: pH: 10, αναλογία υγρού: στερεού: 30:1 mL/g και χρόνο: 66s και ως βέλτιστη απόδοση πολυσακχαριτών κατά 29,82% υψηλότερη από την αντίστοιχη με συμβατική εκχύλιση.

2.6 Συνδυασμός των μεθόδων εκχύλισης

Ο συνδυασμός των τεχνικών εκχύλισης που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελεί τη σύγχρονη αποτελεσματική προσέγγιση για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων που μπορεί να μειώσει σημαντικά το χρόνο εκχύλισης, καταναλώνοντας μικρότερες ποσότητες διαλυτών, και να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης σε σύγκριση με τις συμβατικές εκχύλισης και ακόμη και με τις ίδιες τις υποβοηθούμενες μεθόδους εκχύλισης χρησιμοποιούμενες χωριστά (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

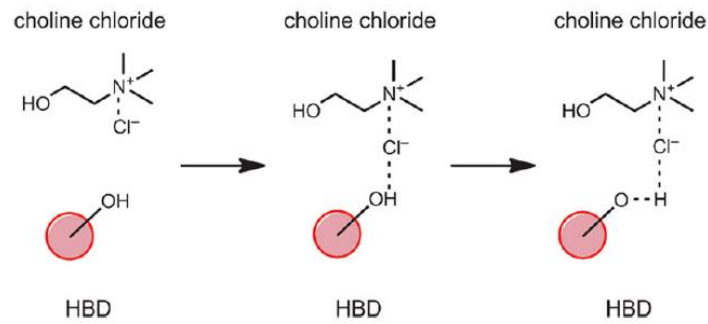
Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει το συνδυασμό των διάφορων τεχνικών για την ανάκτηση ουσιών-στόχων, όπως ο συνδυασμός με χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων, υπερκρίσιμου CO₂, παλμικών ηλεκτρικών πεδίων και υπερυψηλής πίεσης. Οι Corrales et al. (2008) μελέτησαν την εκχύλιση ανθοκυανινών από παραπροϊόντα σταφυλιών χρησιμοποιώντας συνδυασμό των μεθόδων των υπερήχων, του παλμικού ηλεκτρικού πεδίου και της υψηλής υδροστατικής πίεσης και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός των νέων τεχνολογιών αποτελεί μία περιβαλλοντική και οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, οι οποίες απαιτούν μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών και μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Οι Garcia-Mendoza, Paula, Paviani, Cabral, & Martinez-Correa (2015) εφάρμοσαν δύο διαδοχικά στάδια για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από μάνγκο (*Mangifera indica* L.). Αρχικά, χρησιμοποίησαν υπερκρίσιμο CO₂ και ακολούθως εφάρμοσαν υψηλή πίεση (30MPa) με διαλύτη αιθανόλη και έδειξαν ότι ο συνδυασμός των δύο σταδίων εκχύλισης ήταν αποτελεσματικότερος για την ανάκτηση των βιοδραστικών ενώσεων απ' ότι αν εφάρμοζαν χωριστά τις δύο διεργασίες. Οι Dias et al. (2016) αξιολόγησαν τα αποτελέσματα της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από κόκκινη πιπεριά (*Capsicum baccatum* L.) με συνδυασμό υπερήχων και υπερκρίσιμου CO₂ και παρέλαβαν εκχυλίσματα με υψηλότερο περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων απ' ότι χωρίς το συνδυασμό αυτών των τεχνικών. Επίσης, οι Alexandre et al. (2018) συνδύασαν τη χρήση ενζύμων και υπερκρίσιμου CO₂ για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων από παραπροϊόντα ροδιού και απέδειξαν ότι η συνδυαστική μέθοδος σε κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματικότερη επιλογή επεξεργασίας, οδηγώντας σε αυξημένες αποδόσεις στις ενώσεις-στόχους. Επιπλέον, μεγάλες προοπτικές εμφανίζει η συνδυαστική δράση της χρήσης ενζύμων και μικροκυμάτων που είναι γνωστή ως εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση μικροκυμάτων και ενζύμων (microwave enzymatic assisted extraction) και βρίσκει πολλές εφαρμογές για την ανάκτηση ελαίου από ελαιούχους σπόρους όπως από σπόρους κίτρινης κολοκύθας (Jiao et al., 2014), από σπόρους του φυτού *Isatis indigotica* (Gai et al., 2013), από σπόρους του φυτού *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (Li et al., 2013) και από λεβάντα (Rashed et al., 2017), αλλά και άλλων βιοδραστικών συστατικών από φυτικές πηγές, όπως πολυφαινολών από παραπροϊόντα φυτικών (Zhang et al., 2013), από το

φυτό *Tagetes erecta* L. (Fu, Ma, Sun, & Dang, 2018) και πολυσακχαριτών από το φρούτο *Schisandra chinensis* (Cheng et al., 2015) και τα φύκη *Pyropia yezoensis* (J. Lee et al., 2016).

2.7 Ενίσχυση της εκχύλισης από νέους αναδυόμενους διαλύτες (ευτηκτικοί διαλύτες, Natural Deep Eutectic Solvents - NADES)

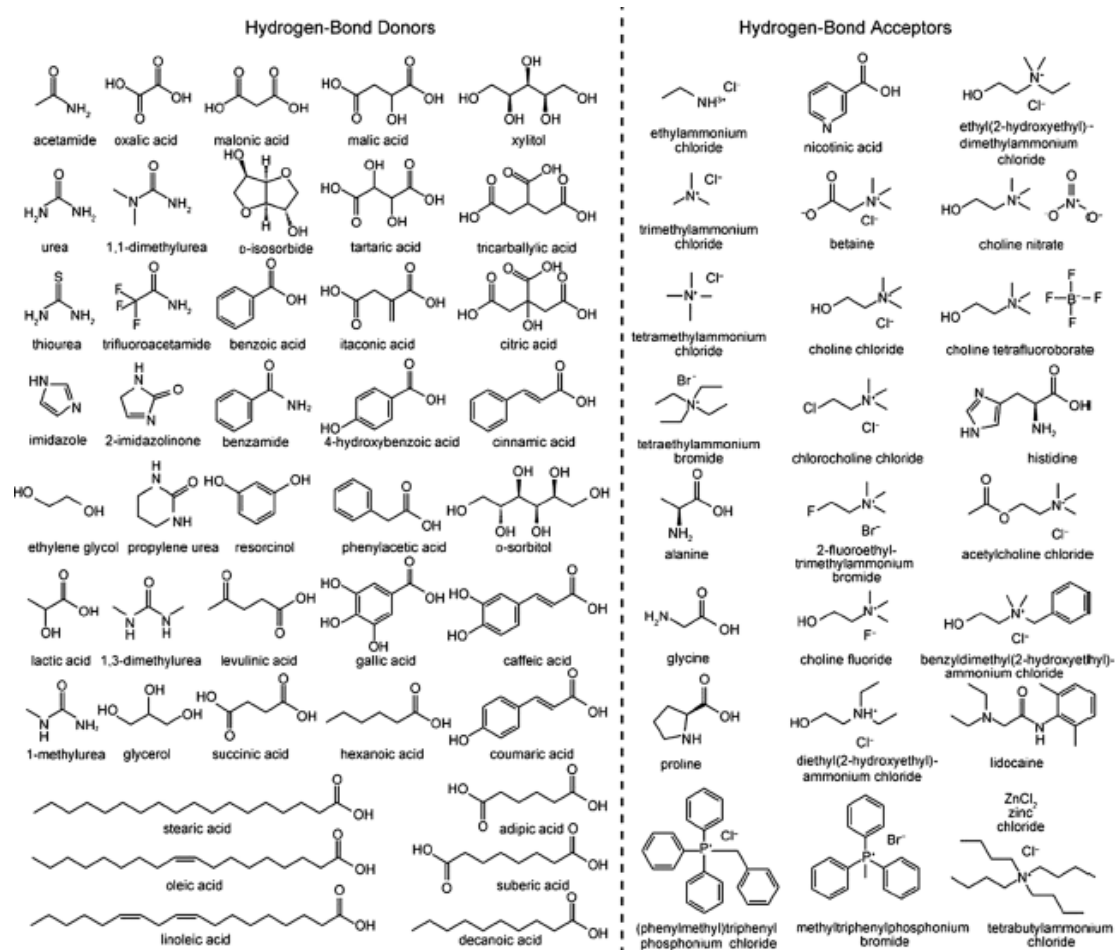
Τα τελευταία χρόνια, η πράσινη τεχνολογία είναι ένα από τα βασικά ζητήματα της χημείας, διότι στοχεύει στην προστασία του περιβάλλοντος και στη μείωση των συνεπειών από τις ανθρώπινες παρεμβάσεις σε αυτό. Προς την κατεύθυνση αυτή, η πράσινη τεχνολογία προωθεί τις νέες περιβαλλοντικά αποδεκτές τεχνικές εκχύλισης και την ανάπτυξη νέων πράσινων διαλυτών. Η ανάπτυξη νέων πράσινων διαλυτών, όπως τα ιοντικά υγρά και οι ευτηκτικοί διαλύτες, που τείνουν να αντικαταστήσουν τους οργανικούς διαλύτες, αποτελεί την πιο σημαντική κατηγορία της πράσινης τεχνολογίας. Τα ιοντικά υγρά (ILs) είναι μία ομάδα οργανικών αλάτων με χαμηλό σημείο τήξης. Πρόσφατα, με σκοπό την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών, τα ιοντικά υγρά έχουν λάβει αυξημένη προσοχή λόγω των φυσικών τους ιδιοτήτων, όπως η αμελητέα τάση ατμών και η προσαρμοστικότητά τους όσον αφορά την πολικότητα και την εκλεκτικότητά τους σε διάφορες εφαρμογές (χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις) (Dai, Spronsen, & Witkamp, 2013). Ένας άλλος τύπος διαλυτών είναι οι ευτηκτικοί διαλύτες (DES). Η μικρή ικανότητα βιοδιάσπασης, η βιοσυμβατότητα και η βιωσιμότητα των ιοντικών υγρών οδήγησαν στην ανάπτυξη των ευτηκτικών διαλυτών, οι οποίοι εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των ιοντικών υγρών και τείνουν να τους αντικαταστήσουν σε διάφορες εφαρμογές.

Ένας ευτηκτικός διαλύτης σχηματίζεται συνήθως από απλή ανάμιξη δύο χαμηλού κόστους και φιλικών προς το περιβάλλον ουσιών, οι οποίες σχηματίζουν ευτηκτικό μίγμα. Το μίγμα αποτελείται από ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA), όπως ένα τεταρτοταγές άλας, και από ένα δότη δεσμού υδρογόνου (HBD), όπως αμίνες, καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες και υδατάνθρακες (Σχήμα 35). Ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό τους, ως δέκτης δεσμού υδρογόνου, είναι το χλωρίδιο της χολίνης (ChCl). Το ChCl είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο και μη τοξικό τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας το οποίο είτε προέρχεται απευθείας από βιομάζα, είτε παρασκευάζεται με απλές και οικονομικές μεθόδους από ορυκτά υλικά. Το χλωρίδιο της χολίνης σε συνδυασμό με δότες δεσμού υδρογόνου όπως οργανικά οξέα, πολυόλες ή υδατάνθρακες κ.α. μπορεί να σχηματίσει ευτηκτικά μίγματα (Σχήμα 36).



Σχήμα 35. Αλληλεπίδραση ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) με το χλωρίδιο της χολίνης

Οι ευτηκτικοί διαλύτες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών, όπως έχουν χαμηλό κόστος, είναι αδρανείς με το νερό, απαιτούν εύκολη προετοιμασία, παρουσιάζουν μικρή πτητικότητα, είναι βιοαποικοδομήσιμοι και έχουν χαμηλή τοξικότητα. Οι ευτηκτικοί διαλύτες βρίσκουν πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως στη φαρμακευτική και τη ναυτεχνολογία. Η ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών με συμβατικές τεχνικές εκχύλισης απαιτεί μεγάλους όγκους οργανικών διαλυτών και παρατεταμένους χρόνους εκχύλισης. Η χρήση των ευτηκτικών διαλυτών για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί μία νέα εναλλακτική επιλογή έναντι των συμβατικών διαλυτών και βρίσκει πολλές εφαρμογές (Dai et al., 2013).



Σχήμα 36. Ορισμένοι δέκτες και δότες δεσμού υδρογόνου που μπορούν να συνδυαστούν για σχηματισμό ευτηκτικού διαλύτη

Οι Khezeli, Daneshfar, & Sahraei (2016) μελέτησαν την εκχύλιση τριών φαινολικών οξέων (φερουλικού, καφεϊκού και κινναμικού) με χρήση υπερήχων και με ευτηκτικούς διαλύτες. Οι Bakirtzi, Triantafyllidou, & Makris (2016) μελέτησαν την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών από ελληνικά φαρμακευτικά βότανα χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες (γαλακτικό οξύ ως δέκτη δεσμού υδρογόνου) και εκχύλιση με υπέρηχους και συμπέραναν ότι η χρήση γαλακτικού οξέος/γλυκίνης παρείχε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικό φορτίο σε σχέση με συμβατικούς διαλύτες, νερό και 60% αιθανόλη. Οι Dai, Rozema, Verpoorte, & Choi (2016) αντικατέστησαν τους συμβατικούς διαλύτες με ευτηκτικούς για την παραλαβή ανθοκυανινών από το φυτό *Catharanthus roseus*. Οι Das, Sharma, Mondal, & Prasad (2016) χρησιμοποίησαν ευτηκτικούς διαλύτες με χλωρίδιο της χολίνης ως δέκτη δεσμού υδρογόνου για την εκχύλιση της κ-καραγενάνης από τα φύκη *Kappaphycus alvarezii*. Επίσης, οι Peng et al. (2016) μελέτησαν την εκχύλιση πέντε φαινολικών οξέων (χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ, 3,5-δι-καφεοϋλκινικό οξύ, 3,4-δι-καφεοϋλκινικό οξύ

και 4,5- νικοσιλοκιννοϊκό οξύ) από το φυτό *Lonicerae japonicae Flos* χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες. Οι Ozturk, Parkinson, & Gonzalez-miquel (2018) χρησιμοποίησαν ευτηκτικούς διαλύτες με χλωρίδιο της χολίνης ως δέκτη δεσμού υδρογόνου, και γλυκερόλη και αιθανοδιόλη ως δότες δεσμού υδρογόνου για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από παραπροϊόντα πορτοκαλιού. Οι García, Rodríguez-juan, Rodríguez-gutiérrez, Rios, & Fernández-bolaños (2016) μελέτησαν την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες (χολίδιο της χλωρίνης ως δέκτη δεσμού υδρογόνου και διάφορους δότες δεσμού υδρογόνου: πολυόλες, οργανικά οξέα, υδατάνθρακες και ουρία) και συμπέραναν ότι η χρήση ChCl/ξυλιτόλης και ChCl/1,2-προπυλενογλυκόλης εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικό φορτίο και απέδωσαν εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη, σε σχέση με το συμβατικό διαλύτη, 80% μεθανόλη.

Επιπλέον, οι Cui et al. (2015) μελέτησαν την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από μπιζέλια χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες (1,6-εξανοδιόλη/ChCl) και εκχύλιση με μικροκύματα (MAE), και επέτυχαν βελτιστοποίηση της απόδοσης των ενώσεων-στόχων με σημαντική μείωση του χρόνου εκχύλισης σε σχέση με την εκχύλιση με υπέρηχους ή με συμβατική εκχύλιση και ευτηκτικούς διαλύτες. Οι Alañón, Ivanoníć, Gómez-Caravaca, Arráez-Román, & Segura-Carretero (2018) συνδύασαν την εφαρμογή μικροκυμάτων με τη χρήση ευτηκτικών διαλυτών με χλωρίδιο της χολίνης ως δέκτη δεσμού υδρογόνου και διάφορους δότες δεσμού υδρογόνου (τέσσερις πολυόλες, τρία οργανικά οξέα, έναν υδατάνθρακα και ουρία) για την ανάκτηση 48 φαινολικών ενώσεων από φύλλα ελιάς. Επίσης, ο συνδυασμός ευτηκτικών διαλυτών και η χρήση μικροκυμάτων χρησιμοποιήθηκε ως πιο πράσινη προσέγγιση για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φλοιό σταφυλιών, στην οποία ο ευτηκτικός διαλύτης με βάση το χλωρίδιο της χολίνης και το οξαλικό οξύ ως δότης δεσμού υδρογόνου, βρέθηκε να είναι η καλύτερη επιλογή για την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών (Bubalo, Toma, Kovac, Bubalo, & Natka, 2016).

Πειραματικό Μέρος

3.1 Σκοπός

Από την παραγωγή του ελαιόλαδου προκύπτουν σημαντικές ποσότητες στερεού παραπροϊόντος, του ελαιοπυρήνα, οι οποίες ανεξάρτητα από το σύστημα προέλευσης (φυγοκεντρικό 3 ή 2 φάσεων) δεν είναι εύκολα διαχειρίσιμες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ελαιοπυρήνας είναι ένα υλικό χαμηλού κόστους που έως τώρα χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του περιεχόμενου ελαίου, του πυρηνέλαιου, σε μικρής κλίμακας βιομηχανικές μονάδες (πυρηνελαιουργεία). Από την άλλη πλευρά όμως ο ελαιοπυρήνας, εκτός από πηγή ελαίου, αποτελεί επιπλέον σημαντική πηγή και βιοδραστικών συστατικών, όπως είναι οι στερόλες, το σκουαλένιο και τα φαινολικά συστατικά. Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί η ανάκτηση αυτών των βιοδραστικών συστατικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικοί και αντιμικροβιακοί παράγοντες σε συστήματα τροφίμων και άλλων προϊόντων. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τη σύγχρονη τάση για αναζήτηση νέων βιοδραστικών συστατικών από φυσικές πηγές, η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα είναι ιδιαίτερα ελκυστική.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ερευνητική μελέτη της εκχύλισης του ελαίου από ελαιοπυρήνα (προερχόμενου από φυγοκεντρικό σύστημα 3 φάσεων) με μοντελοποίηση της διεργασίας καθώς και των βιοδραστικών συστατικών από ελαιοπυρήνα στα πλαίσια της αξιοποίησης του συγκεκριμένου παραπροϊόντος της παραγωγής του ελαιόλαδου και η περαιτέρω διερεύνηση των δυνατοτήτων ανάκτησης αυτών κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διασφαλίζεται η σταθερότητά τους και η διατήρηση της δραστητικότητάς τους. Το μεγάλο ενδιαφέρον της παρούσας εργασίας για την αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα αποδίδεται στο γεγονός ότι σχεδιάστηκε να μελετηθεί η ανάκτηση είτε πυρηνέλαιου υψηλής ποιότητας και πλούσιου σε βιοδραστικά συστατικά, όπως στερόλες και σκουαλένιο, είτε φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα, όπως κυρίως η ελευρωπαΐνη, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη.

Με βάση τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθορίστηκαν οι βασικοί άξονες της έρευνας. Ειδικότερα, επιλέχθηκαν νέες εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης (έναντι των συμβατικών που παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως ήδη έχουν αναφερθεί), οι διαλύτες εκχύλισης (ανάλογα με την επιθυμητή ομάδα συστατικών ανάκτησης) και οι συνθήκες εκχύλισης.

Αρχικά η μελέτη της διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει την εκχύλιση ελαίου από τον ελαιοπυρήνα με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης και με χρήση εξανίου ως διαλύτη εκχύλισης. Στόχος ήταν η κινητική μελέτη της εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα συναρτήσει του χρόνου, διερευνώντας την επίδραση της θερμοκρασίας, της ταχύτητας ανάδευσης καθώς και της

αναλογίας στερεού/υγρού, στην ποσότητα τόσο του παραλαμβανόμενου ελαίου (απόδοση σε έλαιο) όσο και του συνόλου του ασαπωνοποίητου υλικού του. Οι παράγοντες αυτοί θεωρούνται στη βιβλιογραφία ως οι σημαντικότεροι που επηρεάζουν την εκχύλιση. Επιπλέον, ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στα βιοδραστικά συστατικά του ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου όπως στο συνολικό στερολικό κλάσμα και στις επιμέρους στερόλες, και στο σκουαλένιο καθώς και περαιτέρω στην κινητική μελέτη της εκχύλισης του στερολικού κλάσματος και των κύριων στερολών, και του σκουαλένιου.

Δεδομένου ότι ο διαλύτης εκχύλισης επηρεάζει τη διεργασία αλλά και την ανάκτηση των επιθυμητών ομάδων συστατικών-στόχων, επιλέγονται προς μελέτη μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο, ισοπροπανόλη) σε διάφορες αναλογίες, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους του διαλύτη εκχύλισης στην απόδοση της διεργασίας τόσο ως προς το παραλαμβανόμενο έλαιο όσο και ως προς τα βιοδραστικά συστατικά, συγκεκριμένα στο σύνολο του ασαπωνοποίητου υλικού, στο συνολικό στερολικό κλάσμα και στις επιμέρους στερόλες, και στο σκουαλένιο.

Με σκοπό την αντιμετώπιση των προβλημάτων ή μειονεκτημάτων που εμφανίζει η συμβατική εκχύλιση, επιλέγεται προς μελέτη η σύγχρονη μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους για την ανάκτηση του ελαίου και των ασαπωνοποίητων συστατικών του (στερόλες, σκουαλένιο) από τον ελαιοπυρήνα και περαιτέρω η αριστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης του ελαίου ως προς τη θερμοκρασία εκχύλισης, την αναλογία μίγματος στερεού/διαλύτη και την κοκκομετρία του ξηρού αλεσμένου ελαιοπυρήνα. Επιπλέον, μελετάται η αριστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης με στόχο την παραλαβή ελαίου με τη μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα στις κύριες στερόλες και το σκουαλένιο με χρήση υπερήχων. Παράλληλα σχεδιάζεται και συγκριτική μελέτη με τα αντίστοιχα εμπλουτισμένα έλαια σε στερόλες και σκουαλένιο με εφαρμογή συμβατικής εκχύλισης.

Όσον αφορά την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα, ελήφθη υπόψη ότι η οικονομική αξιοποίηση των παραπροϊόντων της επεξεργασίας του ελαιόλαδου επιβάλλει την ανάπτυξη νέων μεθόδων εκχύλισης αποδοτικών και φιλικών προς το περιβάλλον, οι οποίες παράλληλα θα διασφαλίζουν την ποιότητα των προϊόντων. Επομένως, στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση νέων (καινοτόμων) εναλλακτικών μεθόδων υποβοηθούμενης εκχύλισης όπως η εκχύλιση με μικροκύματα, με υπέρηχους, με υπερυψηλή υδροστατική πίεση, με υψηλή ταχύτητα μηχανικής ανάδευσης και με χρήση ενζύμων για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα.

Επιλέγονται προς μελέτη η συμβατική εκχύλιση με χρήση κάθετου ψυκτήρα αλλά και η εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα με χρήση διάφορων διαλυτών (αιθανόλη, ακετόνη και μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες) και

με εφαρμογή διάφορων συνθηκών εκχύλισης (θερμοκρασία εκχύλισης, χρόνος κ.α.). Από τις μεθόδους υποβοηθούμενης εκχύλισης επιλέγεται πρώτα να εξεταστεί η υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση μίγματος ενζύμων (πηκτινάσες και πολυγαλακτουρονάσες) και η εφαρμογή μικροκυμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης ή/και ο συνδυασμός αυτών. Επιπρόσθετα, επιλέγεται να αξιολογηθεί η χρήση της υπερυψηλής πίεσης για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα, με χρήση διάφορων διαλυτών και ενζύμων σε διάφορες συνθήκες (πίεση και χρόνος εκχύλισης). Ακόμη, επιλέγεται προς μελέτη η εκχύλιση με ομογενοποίηση (εφαρμογή υψηλής ταχύτητας ανάδευσης) για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα, με χρήση διάφορων διαλυτών και ενζύμων σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία και ταχύτητα ανάδευσης). Ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στη χρήση/εισαγωγή νέων πράσινων διαλυτών για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών σε συνδυασμό με όλες τις ανωτέρω νέες καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης που επιλέχθηκαν προς μελέτη, συγκεκριμένα, ευτηκτικών διαλυτών από μίγματα χλωριούχου χολίνης με πολυόλες, οργανικά οξέα και σάκχαρα σε αναλογία 2:1 με εφαρμογή μικροκυμάτων, υπερήχων, υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης, υψηλής ταχύτητας ανάδευσης σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος εκχύλισης). Σκοπός ήταν να παραληφθούν εκχυλίσματα με υψηλό περιεχόμενο σε ολικά και επιμέρους φαινολικά (υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, λουτεολίνη, ρουτίνη) συστατικά και να αξιολογηθούν αυτά ως προς την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα.

Τέλος, προκειμένου να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων επιλέγεται να μελετηθεί η αντιοξειδωτική τους δράση σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ ή και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο καθώς και η ενσωμάτωσή τους ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο).

Σε γενικές γραμμές, η εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση καινοτόμων εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης για την παραλαβή τόσο πυρηνέλαιου ενισχυμένου ποιοτικά σε βιοδραστικά συστατικά όσο και για την παραλαβή φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με βελτιωμένες ιδιότητες (βιοδραστικότητα), που μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων (προς παραγωγή λειτουργικών προϊόντων) προσφέροντας ταυτόχρονα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία.

Η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

3.2 Υλικά και μεθοδολογία

3.2.1 Υλικά

Στερεά υπολείμματα ελαιοτριβείου (ελαιοπυρήνας) συλλέχθηκαν από ελαιοτριβείο της περιοχής Ωρωπού (Αττικής) που εφαρμόζει φυγοκεντρική κατεργασία τριών φάσεων. Ο ελαιοπυρήνας μετά την παραλαβή του αποθηκεύτηκε άμεσα στους -30 °C, προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε υποβάθμιση οξειδωτικού ή υδρολυτικού ταγγισμού του περιεχόμενου ελαίου και αλλοίωση των βιοδραστικών συστατικών του. Ο ελαιοπυρήνας αποτελείται από σάρκα (21-33% w/w), πυρήνα (κουκούτσι) (42-54% w/w) και φλοιό (10-11% w/w) και η περιεχόμενη αρχική υγρασία του ήταν 45% w/w. Ο ελαιοπυρήνας αποψύχθηκε σταδιακά, υποβλήθηκε σε ξήρανση σε αέρα στους 35 °C για 24 h (τελική υγρασία 5% w/w) και αλέσθηκε σε μύλο (FRITSCH, cutting mill, pulverisette 15) και διαχωρίστηκε διαδοχικά με κόσκινα 2,0 mm, 1,0 mm και 0,5 mm. Ο προκατεργασμένος κατ' αυτόν τον τρόπο ελαιοπυρήνας αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι τη χρήση του για τις ανάγκες των πειραμάτων.

3.2.2 Χημικά Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις ήταν: εξάνιο, διαιθυλαιθέρας, μεθανόλη, ακετόνη και αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας του εμπορικού οίκου Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) ήταν: ακετονιτρίλιο, νερό και μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC του εμπορικού οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

Οι πρότυπες ουσίες στερολών (β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, καμπεστερόλη, ερυθροδιόλη, εργοστερόλη) και του σκουαλένιου που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή προτύπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση του ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου ήταν του εμπορικού οίκου Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Οι πρότυπες ουσίες των φαινολικών συστατικών: υδροξυτυροσόλη, καφεϊκό οξύ, βανιλίνη, ρουτίνη και λουτεολίνη που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ήταν του εμπορικού οίκου Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), ενώ η πρότυπη ουσία της ελευρωπαΐνης ήταν του εμπορικού οίκου Extrasynthese (Genay, France).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική κατεργασία της πρώτης ύλης ήταν μίγμα πηκτινάσης και πολυγαλακτουρονάσης με εμπορική ονομασία Novozym 33095 και παραχωρήθηκαν από την εταιρεία Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Τα ένζυμα διατηρήθηκαν σε ψύξη στους 4 °C.

Τα αντιδραστήρια Folin-Ciocalteu, 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃), καυστικό κάλιο (KOH), κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο, γαλλικό οξύ, μαλτόζη (>97%)

και γλυκερόλη (>99%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Η χλωριούχος χολίνη (>98%) και το γαλακτικό οξύ (>98%) αγοράστηκαν από την Agros Organics (Geel, Belgium).

3.3 Πειραματική διαδικασία

3.3.1 Εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών του συστατικών

3.3.1.1 Συμβατική εκχύλιση - Κινητική μελέτη

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των παραμέτρων εκχύλισης στην ανάκτηση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών, προζυγισμένη ποσότητα (της τάξης των 25 g) αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα εισάγεται μέσα στο δοχείο εκχύλισης όγκου 500 mL στο οποίο προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και εκχυλίζεται υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση με κατάλληλο όγκο η-εξανίου ως διαλύτη εκχύλισης. Το δοχείο εκχύλισης τοποθετείται σε υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας ($\pm 1,0$ °C). Μετά από τον προκαθορισμένο χρόνο εκχύλισης, το μίγμα διηθείται υπό κενό και λαμβάνεται το ελαιοδιάλυμα.

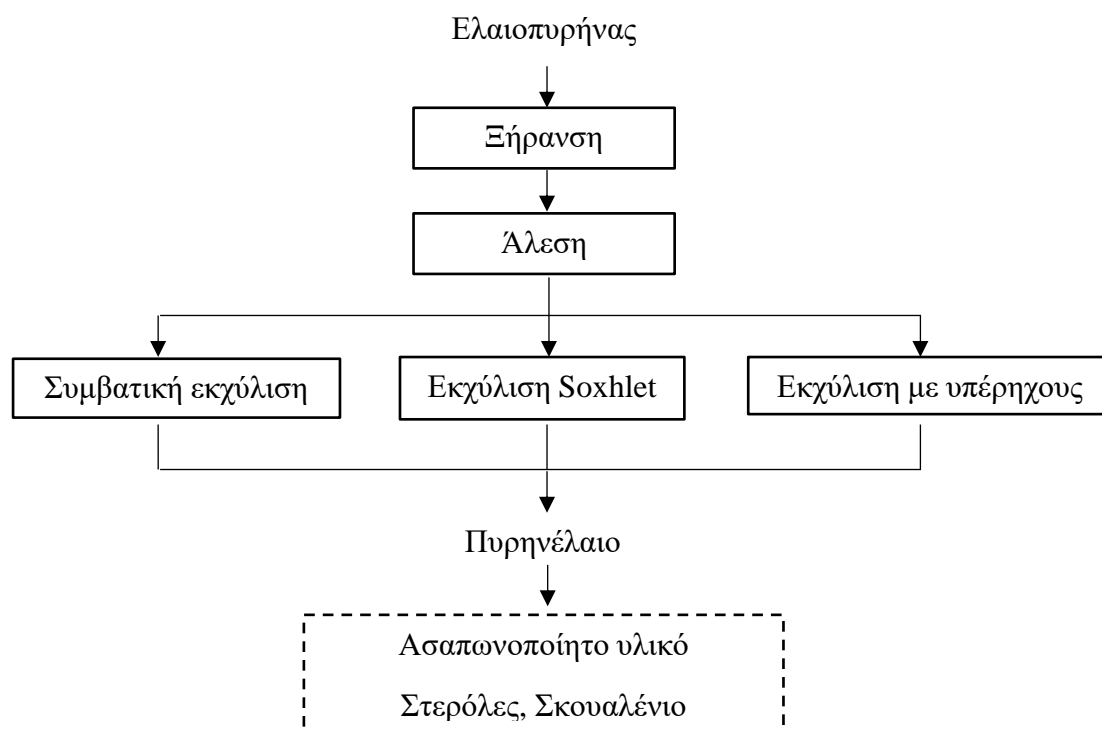
3.3.1.2 Εκχύλιση Soxhlet με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας

Για τη μελέτη της επίδρασης του είδους του διαλύτη στην παραλαβή ελαίου και βιοδραστικών συστατικών (στερόλες, σκουαλένιο) πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας σε συσκευή Soxhlet όγκου 250 mL. Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 25 g) τοποθετείται μέσα σε φύσιγγες πεπιεσμένου χαρτιού και εκχυλίζεται στη συσκευή Soxhlet με εξάνιο, ισοπροπανόλη και μίγματα εξανίου-ισοπροπανόλης (9:1, 4:1, 3:1 και 3:2). Η εκχύλιση γίνεται εξαντλητική με διάρκεια της τάξης των 8 h και θερμοκρασία εντός του εύρους του σημείου ζέσεως του εκάστοτε συστήματος διαλυτών. Στο τέλος της εκχύλισης, η φύσιγγα εξάγεται από τη συσκευή Soxhlet και παραλαμβάνεται το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης (ελαιοδιάλυμα).

3.3.1.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound Assisted-Extraction, UAE)

Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 25 g) αναμιγνύεται με προκαθορισμένο όγκο εξανίου σε φιάλη Erlenmeyer 250 mL και εκχυλίζεται στο λουτρό υπερήχων (Elmasonic, S30 (H), 60,0 kHz, 280 W, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) σε προκαθορισμένη θερμοκρασία για 60 min. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η θερμοκρασία του λουτρού διατηρείται σταθερή με τη βοήθεια κυκλοφορητή νερού. Μετά την εκχύλιση, το μίγμα διηθείται υπό κενό και παραλαμβάνεται το ελαιοδιάλυμα.

Στο τέλος των εκχυλίσεων σε όλες τις παραπάνω διεργασίες ανάκτησης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών, το ελαιοδιάλυμα (miscella) συλλέγεται και ο διαλύτης αποστάζεται υπό κενό στους 50 °C με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (BUCHI 461, Buchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland). Τα ίχνη του διαλύτη απομακρύνονται περαιτέρω με ρεύμα αζώτου.



Σχήμα 37. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα και βιοδραστικών συστατικών του

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και υπολογίζεται η % περιεκτικότητα σε έλαιο του ελαιοπυρήνα, ενώ στο παραλαμβανόμενο έλαιο προσδιορίζεται το σύνολο του ασαπωνοποίητου υλικού, το συνολικό στερολικό κλάσμα, το σκουαλένιο και αναλύεται περαιτέρω το στερολικό κλάσμα με HPLC σε επιμέρους στερόλες.

3.3.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα

3.3.2.1 Συμβατική εκχύλιση (CE)

Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) τοποθετείται μέσα σε δοχείο εκχύλισης όγκου 500 mL στο οποίο προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και εκχυλίζεται υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση με κατάλληλο όγκο διαλύτη εκχύλισης. Το δοχείο με το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (40-60 ± 1,0 °C).

3.3.2.2 *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound Assisted – Extraction, UAE)*

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε λουτρό υπέρηχων (Elmasonic, S30 (H), 60,0 kHz, 280 W, Elma Schmidbauer GmbH, Germany). Η θερμοκρασία του λουτρού διατηρείται σταθερή με τη βοήθεια κυκλοφορητή νερού. Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύεται με προκαθορισμένο όγκο διαλύτη (αιθανόλη, ακετόνη και μεθανόλη, σε αναλογία 90%, 70% και 50% v/v, αντίστοιχα) σε φιάλη Erlenmeyer 250 mL και εκχυλίζεται με υπέρηχους σε προκαθορισμένη θερμοκρασία (40, 60 και 80 °C) για 60 min.

3.3.2.3 *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted – Extraction, MAE)*

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China). Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) εκχυλίζεται με προκαθορισμένο όγκο διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4) για συνολική διάρκεια 5 ή 30 min με ρύθμιση της ακτινοβολίας, ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

3.3.2.4 *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Homogenate Assisted – Extraction, HAE)*

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Unidrive X1000, CAT). Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) εκχυλίζεται με προκαθορισμένο όγκο διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4) για συνολική διάρκεια 30 min χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο, ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

3.3.2.5 *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (High Hydrostatic Pressure Assisted – Extraction, HHPAE)*

Η εκχύλιση με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης πραγματοποιήθηκε σε εξοπλισμό εργαστηριακής κλίμακας Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV (Roden, Holland), συνιδιοκτησίας του ΕΜΠ και του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του ΕΘΙΑΓΕ. Προζυγισμένη ποσότητα αλεσμένου ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύονται με κατάλληλο όγκο διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4) και συσκευάζονται σε σακουλάκια πολυπροπυλενίου τα οποία σφραγίζονται με θερμοκόλληση. Για την αποφυγή διαρροής του διαλύτη στο υγρό μεταφοράς της πίεσης, τα σακουλάκια τοποθετούνται σε δεύτερη συσκευασία (ελαφρώς μεγαλύτερα σακουλάκια), σφραγίζονται και τοποθετούνται στο θάλαμο υπερυψηλής πίεσης. Πριν από την τοποθέτηση

των δειγμάτων στη συσκευή υπερυψηλής πίεσης, ο θάλαμος πίεσης έχει ήδη εξισορροπηθεί με τη θερμοκρασία της επεξεργασίας (25 °C). Τόσο η πίεση όσο και η θερμοκρασία παρακολουθούνται και καταγράφονται (ανά διαστήματα 1 s) καθόλη τη διάρκεια της διεργασίας.

3.3.2.6 Υδατική ενζυμική εκχύλιση και ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα (Enzymatic Assisted – Extraction, EAE)

Η υδατική ενζυμική εκχύλιση και η ενζυμική κατεργασία του ξηρού αλεσμένου ελαιοπυρήνα έγινε με ένα μίγμα ενζύμων πηκτινάσης και πολυγαλακτουρονάσης εμπορικής ονομασίας Nozzym 33095, με δραστηριότητα ενζύμου 10000 ± 200 units/mL. Υπολογισμένη ποσότητα μίγματος ενζύμων αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος κατάλληλου pH (4,0-4,5) για να παρασκευαστεί το επιθυμητό ενζυμικό φορτίο (ενζυμικές μονάδες).

Υδατική ενζυμική εκχύλιση

Η υδατική εκχύλιση με χρήση ενζύμων έγινε ως ακολούθως: Ποσότητα 10 g ξηρού ελαιοπυρήνα κοκκομετρίας 1mm τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL και υποβάλλεται σε εκχύλιση με 125 mL διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος pH= 4,5) και ένζυμο 1% v/v με τους ακόλουθους τρόπους:

Συμβατική ενζυμική εκχύλιση: Η σφαιρική φιάλη συνδέεται σε κάθετο ψυκτήρα και το μίγμα στερεού/διαλύτη/ενζύμου εκχυλίζεται στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.1.

Ενζυμική εκχύλιση με μικροκύματα: Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στη συσκευή XO-SM50 Ultrasonic Microwave Reaction System (Nanjing Xianou Instruments Manufacture co., Ltd., Nanjing City, China) και ακολουθεί εκχύλιση στις συνθήκες όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.3.

Ενζυμική εκχύλιση με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας: Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στη συσκευή ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Unidrive X1000, CAT) και ακολουθεί εκχύλιση στις συνθήκες όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.4.

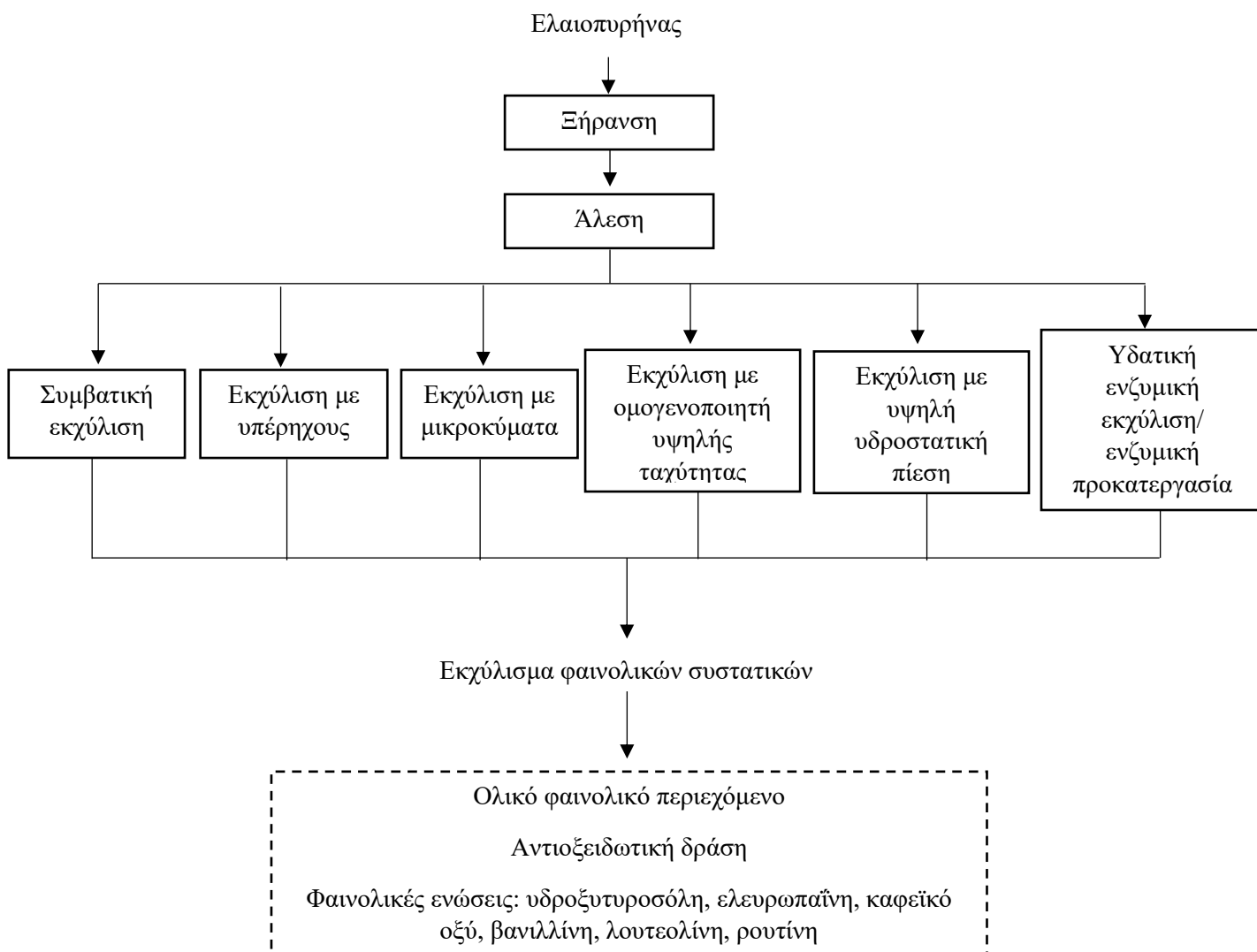
Ενζυμική εκχύλιση με υψηλή υδροστατική πίεση: Το μίγμα στερεού/διαλύτη/ενζύμου τοποθετείται στη συσκευή υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης (Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV, Roden, Holland) και ακολουθεί εκχύλιση στις συνθήκες όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.5.

Ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα

Προκειμένου να αξιολογηθεί εάν η ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά και να συγκριθεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση, επιλέχθηκαν οι μέθοδοι εκχύλισης υποβοηθούμενης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και με υπερυψηλή υδροστατική πίεση για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Η ενζυμική προκατεργασία έγινε ως εξής: Σε κωνική φιάλη των 250 mL εισάγεται προζυγισμένη ποσότητα ξηρού (10 g) ελαιοπυρήνα και σε αυτή προστίθενται 125 mL, αντίστοιχα, διαλύματος ενζύμου συγκέντρωσης 1% v/v. Η φιάλη τοποθετείται μέσα σε υδατόλουτρο (Mettmert WNB/WNE/WPE) και επωάζεται υπό ανάδευση σε κατάλληλη θερμοκρασία. Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης για τα ένζυμα επιλέχθηκε σύμφωνα με τις προδιαγραφές του προμηθευτή και τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και ήταν 45 °C. Μετά το τέλος της επώασης, το ενζυμικά κατεργασμένο στερεό εκχυλίζεται στις συνθήκες εκχύλισης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και με υπερυψηλή υδροστατική πίεση, όπως περιγράφεται στις υποενότητες 3.3.2.4 και 3.3.2.5 αντίστοιχα.

Σε όλες τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν, η αναλογία στερεού: υγρού διαλύτη ήταν 1:12,5 g/mL και η κοκκομετρία του ελαιοπυρήνα επιλέχθηκε ήταν 1mm. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 10min και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα. Στην ενζυμική εκχύλιση, τα ένζυμα αδρανοποιούνται με βύθιση της φιάλης σε ζέον νερό για 3 min και στη συνέχεια το μίγμα της φιάλης φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα.

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Όλα τα εκχυλίσματα φυλάσσονται σε κατάψυξη πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία τους για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχόμενου, της αντιοξειδωτικής δράσης και των επιμέρους φαινολικών συστατικών (υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, λουτεολίνη, ρουτίνη) με HPLC.



Σχήμα 38. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα

3.3.3 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με ευτηκτικούς διαλύτες

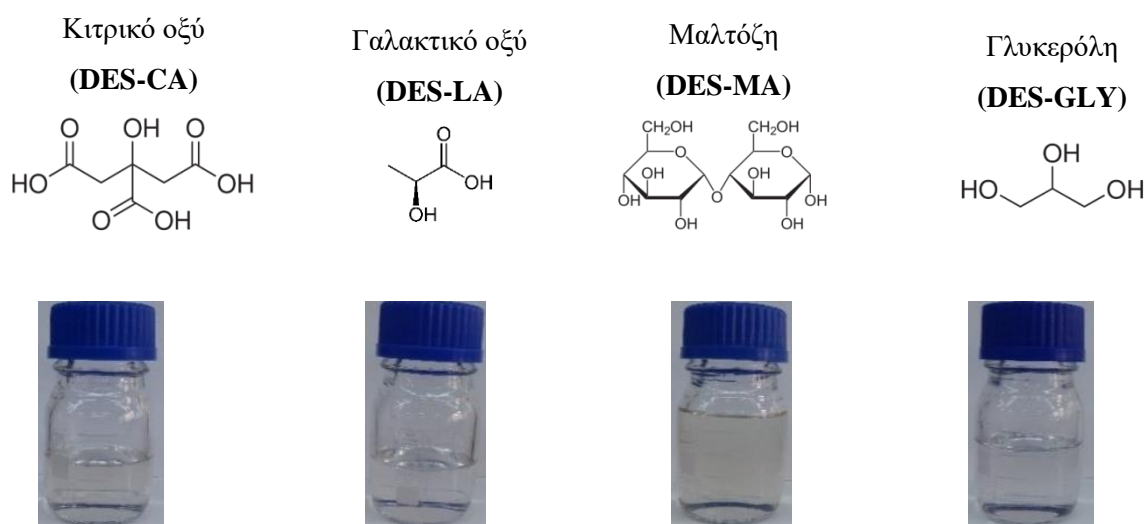
3.3.3.1 Παρασκευή ευτηκτικών διαλυτών

Τα μίγματα των ευτηκτικών διαλυτών παρασκευάζονται με θέρμανση των δύο επιμέρους συστατικών στους 80 °C υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές υγρό. Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθεται ποσότητα νερού 20% w/v νερό. Τα μίγματα των ευτηκτικών διαλυτών που παρασκευάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 και στο Σχήμα 39.

Πίνακας 15. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης

Συστατικά		αναλογία moles	Κωδικός	Εμφάνιση
Συστατικό 1	Συστατικό 2			
Χλωριούχος χολίνη	Κιτρικό οξύ	1:2	DES-CA	Διαφανές άχρωμο υγρό
	Γαλακτικό οξύ		DES-LA	Διαφανές άχρωμο υγρό
	Μαλτόζη		DES-MA	Διαφανές ανοιχτό κίτρινο παχύρρευστο υγρό
	Γλυκερόλη		DES-GLY	Διαφανές άχρωμο υγρό

Χλωριούχος χολίνη (ChCl)



Σχήμα 39. Εμφάνιση των ευτηκτικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης

3.3.3.2 Εκχύλιση με ευτηκτικούς διαλύτες

Για την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών εξετάστηκαν οι νέοι πράσινοι διαλύτες σε συνδυασμό με όλες τις νέες καινοτόμες μεθόδους υποβοηθούμενης εκχύλισης που ήδη αναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα με εφαρμογή μικροκυμάτων, υπερήχων, υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης, υψηλής ταχύτητας μηχανικής ανάδευσης και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών. Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών εκχύλισης σε κάθε περίπτωση.

Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων: Ποσότητα του αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύεται σε κατάλληλο δοχείο με κατάλληλο όγκο ευτηκτικού διαλύτη και το δοχείο με το μίγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων (Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd, China) στα 200 W, σε θερμοκρασία 40 και 60 °C όπου παραμένει για εκχύλιση για 30 min.

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων: Ποσότητα του αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύεται σε κατάλληλο δοχείο με κατάλληλο όγκο ευτηκτικού διαλύτη και το δοχείο με το μίγμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (Elmasonic S30(H), 60,0kHz, 280W, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) σε θερμοκρασία 40 και 60 °C όπου παραμένει για εκχύλιση για 30 min.

Εκχύλιση με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης: Ποσότητα του αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύεται σε κατάλληλο περιέκτη με κατάλληλο όγκο ευτηκτικού διαλύτη και ο περιέκτης με το μίγμα τοποθετείται στη συσκευή υπερυψηλής πίεσης (Food Pressure Unit FPU 1.01, Resato International BV, Roden, Holland) στα 300 και 600 MPa όπου παραμένει για εκχύλιση για 5 και 10min αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 25 °C.

Εκχύλιση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας: Ποσότητα του αλεσμένου ξηρού ελαιοπυρήνα (της τάξης των 10 g) αναμιγνύεται σε κατάλληλο δοχείο με κατάλληλο όγκο ευτηκτικού διαλύτη και με προσαρμογή του ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (CAT, Unidrive X 1000) στις 4000 και 12000 rpm, πραγματοποιείται η εκχύλιση σε θερμοκρασία 40 και 60 °C για 30 min.

Σε όλες τις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν, η αναλογία στερεού: υγρού διαλύτη ήταν 1:12,5 g/mL και η κοκκομετρία του ελαιοπυρήνα επιλέχθηκε 1 mm. Μετά την εκχύλιση, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 10 min και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα.

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές και παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Τα εκχυλίσματα φυλάσσονται σε κατάψυξη πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία τους για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχόμενου, της αντιοξειδωτικής δράσης και των επιμέρους φαινολικών συστατικών (υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, λουτεολίνη, ρουτίνη) με HPLC.



Σχήμα 40. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας παρασκευής ευτηκτικών διαλυτών

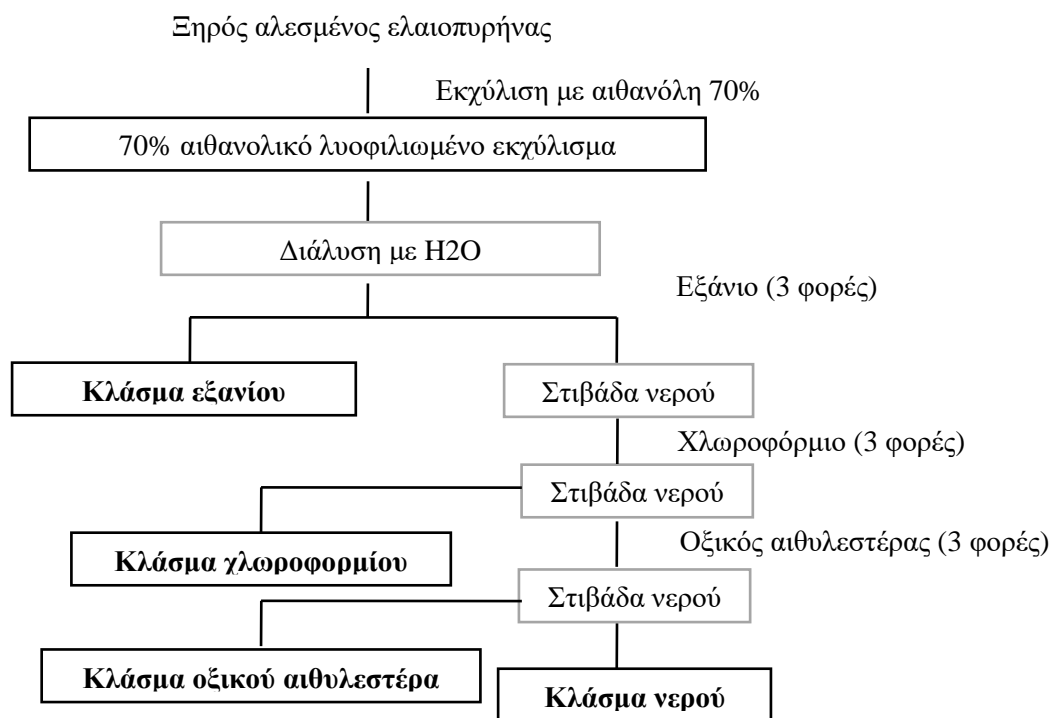
3.3.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων

3.3.4.1 Παρασκευή εκχύλισματος αιθανόλης 70% και κλασμάτων του

Ξηρός αλεσμένος ελαιοπυρήνας (25 g) υποβάλλεται σε εκχύλιση υπό κάθετο ψυκτήρα με 70% αιθανόλη (250 mL) στους 80 °C για 3 h. Το εκχύλισμα διηθείται μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman (No. 2), συμπυκνώνεται με περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και ξηραίνεται με λυοφιλίωση (ξήρανση υπό κατάψυξη). Το λυοφιλωμένο εκχύλισμα αιθανόλης διαλύεται σε νερό (900 mL) και κλασματοποιείται με 300 mL εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού, αντιστοίχως. Τα κλάσματα που προκύπτουν στη συνέχεια συμπυκνώνονται με περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και ξηραίνονται περαιτέρω με λυοφιλίωση (Σχήμα 41).

3.3.4.2 Ενσωμάτωση αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε πρότυπο λινελαϊκό οξύ

Το αιθανολικό εκχύλισμα του ελαιοπυρήνα και τα κλάσματά του (που παραλαμβάνονται με τη διαδικασία όπως αναφέρθηκε στο 3.3.4.1) προστίθενται σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ σε συγκέντρωση 200 ppm. Ποσότητα λινελαϊκού οξέος (~90 g) με το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL και τα δείγματα αποθηκεύονται στους 40 ± 1 °C για 140 h. Η αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος του ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα του λινελαϊκού οξέος αξιολογήθηκε με μέτρηση της τιμής του αριθμού υπεροξειδίων (PV). Για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκαν και αντίστοιχα δείγματα λινελαϊκού οξέος με προσθήκη α-τοκοφερόλης και BHT στην ίδια συγκέντρωση.



Σχήμα 41. Παρασκευή εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα με αιθανόλη 70% και κλασμάτων του

3.3.4.3 Ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (*Linoleic Acid Emulsion - LAE*)

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (LAE) διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτείνεται από τους Son et al. (2003). Το αιθανολικό εκχύλισμα του ελαιοπυρήνα και τα κλάσματά του (5 mg) διαλύονται σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού 50 mM (pH 7.0) που περιέχει 10 mL αιθανόλη, 4,87 mL απεσταγμένου νερού, 0,13 mL λινελαϊκού οξέος και αναμιγνύονται μέσα σε κωνικές φιάλες με εσμίρισμα. Οι φιάλες σφραγίζονται σφικτά με πόμα και επωάζονται στους 40 ± 1 °C στο σκοτάδι. Για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκαν και αντίστοιχα δείγματα συστήματος λινελαϊκού οξέος με προσθήκη α-τοκοφερόλης και BHT στην ίδια συγκέντρωση.

3.3.4.4 *Ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε ηλιέλαιο*

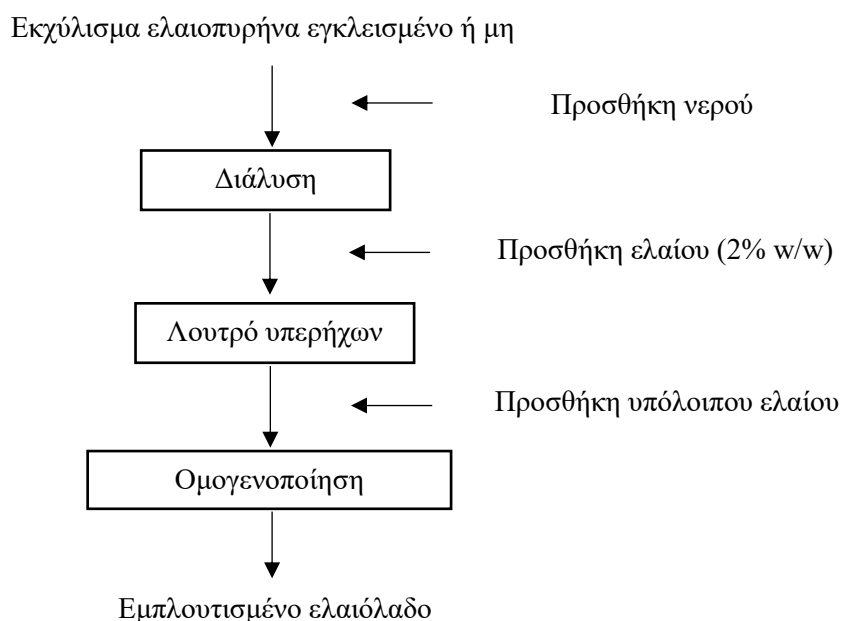
Το αιθανολικό εκχύλισμα ελαιοπυρήνα και τα κλάσματά του, διαλυμένα σε αιθανόλη, προστίθενται σε ηλιέλαιο σε συγκέντρωση 200 ppm. Μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων, τα έλαια αναμιγνύονται έντονα για 10 min χρησιμοποιώντας ένα μαγνητικό αναδευτήρα. Η αιθανόλη απομακρύνεται με έναν περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, ώστε να απομακρυνθούν οι πιθανές επιδράσεις της αιθανόλης στη θερμική οξείδωση του ηλιέλαιου. Το ηλιέλαιο (10 g) με αιθανολικό εκχύλισμα και με τα κλάσματά του ζυγίζονται σε ποτήρια ζέσεως, πραγματοποιείται η θερμική οξείδωση για 60 h στους 80 ± 1 °C, και η οξειδωτική σταθερότητα αξιολογείται με τη μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων. Για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκαν και αντίστοιχα δείγματα ηλιέλαιου με προσθήκη α-τοκοφερόλης και BHT στην ίδια συγκέντρωση.

3.3.4.5 *Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο)*

Ο εμπλουτισμός του ελαιόλαδου με εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη ορισμένης ποσότητας εκχυλίσματος, ώστε το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) του εμπλουτισμένου ελαιόλαδου να αντιστοιχεί σε περίπου 160 mg GAE/kg ελαίου. Επιπλέον, για τον εμπλουτισμό του ελαιόλαδου εξετάστηκαν και εκχυλίσματα που προέκυψαν έπειτα από εγκλεισμό σε φορέα μαλτοδεξτρίνης. Για τον εγκλεισμό ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 20 g μαλτοδεξτρίνης (19 DE) διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 mL και το διάλυμα του φορέα εγκλεισμού παραμένει υπό ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης διασπορά του, και στη συνέχεια προστίθεται στο διάλυμα εκχύλισμα ελαιοπυρήνα (1g). Το μίγμα ομογενοποιείται στις 10000 rpm για 5 min χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Unidrive X 1000, CAT). Εν συνεχεία, το προκύπτον διάλυμα διασποράς καταψύχεται για 24 h στους -30 °C και οδηγείται σε ξηραντήρα λυοφιλικής τύπου Freeze - dryer, FD- Christ Alpha 1-4 LD Plus, όπου παραμένει προς ξήρανση για 48 h σε ανοικτά τριβλία Petri (διάμετρος 60 mm, 10 mL διαλύματος) στις ακόλουθες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας: $P=0.017$ mbar και $T=-57$ °C. Τέλος, το λυοφιλικό εκχύλισμα φαινολικών συστατικών κονιοποιείται με τη βοήθεια ιγδίου και αποθηκεύεται σε περιέκτη με σίλικα (silica gel) στους -25 °C μέχρι περαιτέρω εξέτασης.

Η διαδικασία του εμπλουτισμού είχε ως εξής (Σχήμα 42): κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος, εγκλεισμένο ή μη, ανάλογα με το αρχικό TPC, διαλύεται σε νερό και αναμιγνύεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διασπορά με αναμικτήρα τύπου vortex. Στο προκύπτον διάλυμα διασποράς

προστίθεται μία μικρή ποσότητα ελαίου (2% w/w ελαίου), ώστε να προκύψει ένα γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας ένα λουτρό υπερήχων (Elmasonic S30 (H), 60.0kHz, 280W, ElmaSchmidbauerGmbH, Germany). Το γαλάκτωμα κατόπιν ομογενοποιείται με το υπόλοιπο έλαιο (στα 120 mL) χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Unidrive X 1000, CAT) σε 11000 rpm για 5 min. Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα αποθηκεύονται σε σκοτεινές φιάλες και τοποθετούνται σε φούρνο αέρα σε επιταχυνόμενες συνθήκες οξείδωσης στους 80 °C για 15 ημέρες.



Σχήμα 42. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας εμπλουτισμένου ελαιόλαδου από φαινολικά συστατικά ελαιοπυρήνα

Τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα μελετήθηκαν για τις μεταβολές της τιμής του αριθμού υπεροξειδίων (PV), της ρ-Ανισιδίνης, των συντελεστών απορρόφησης K232 και K270 αυτών. Επίσης προσδιορίστηκαν το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), η αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH) καθώς και οι επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC-DAD των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων.

3.4 Μέθοδοι - Αναλύσεις - Μετρήσεις

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μετρήσεις - αναλύσεις που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας διατριβής διακρίνονται σε αυτές που πραγματοποιήθηκαν για την ανάκτηση του ελαίου και των βιοδραστικών συστατικών του

και σε αυτές για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα και περιγράφονται παρακάτω.

3.4.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας του ελαιοπυρήνα έγινε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 925.09 (1999). Σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης με κάλυμμα, ζυγίζεται ποσότητα 2 g περίπου δείγματος νεπού ελαιοπυρήνα. Το φιαλίδιο με ανοιχτό το κάλυμμά του τοποθετείται μέσα σε προθερμασμένο (105 °C) κλίβανο ξήρανσης για 4 h. Στη συνέχεια το φιαλίδιο κλείνεται με το κάλυμμά του, αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα και ζυγίζεται, ενώ η διαδικασία (ξηρανση-ψύξη-ζύγιση) επαναλαμβάνεται επιπλέον μία ή δύο φορές μέχρι σταθερού βάρους και υπολογίζεται η % περιεκτικότητα του δείγματος ελαιοπυρήνα σε υγρασία.

3.4.2 Προσδιορισμός περιεχόμενου λιπαρού

Ο προσδιορισμός του περιεχόμενου λιπαρού του ελαιοπυρήνα έγινε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOCS Am 5-04 (2013). Ζυγίζεται ποσότητα 3-5 g περίπου δείγματος ξηρού ελαιοπυρήνα και τοποθετείται σε φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού (καρτούσα) και εκχυλίζεται σε διάταξη Soxhlet προσαρμοσμένη με σφαιρική φιάλη που περιέχει πετρελαϊκό αιθέρα (250 mL) για περίπου 14 h. Στο τέλος της εκχύλισης, το ελαιοδιάλυμα (miscella) συλλέγεται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό κενό στους 80-90 °C με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (BUCHI 461, Buchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland). Τα ίχνη του διαλύτη απομακρύνονται περαιτέρω με ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη ψύχεται σε ξηραντήρα, ζυγίζεται και υπολογίζεται η % περιεκτικότητα σε έλαιο του ελαιοπυρήνα.

3.4.3 Προσδιορισμός του ασαπωνοποίητου υλικού

Για τον προσδιορισμό του ασαπωνοποίητου υλικού στο έλαιο ακολουθήθηκε μία διαδικασία που προτείνεται από τους Sanchez-Machado, López-Hernández, Paseiro-Losada, & López-Cervantes, (2004) και τους Yuan et al., (2017) με μερικές τροποποιήσεις. Δείγμα ελαίου (2,50 ± 0,01 g) ζυγίζεται σε μία σφαιρική φιάλη και σαπωνοποιείται υπό κάθετο ψυκτήρα (στους 60 °C) με 25 mL 95% αιθανόλης και 1,5 mL 50% KOH για 30 min με συνεχή ανάδευση. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη με προσθήκη 50 mL νερού και 50 mL διαιθυλαιθέρα για να παραληφθεί το ασαπωνοποίητο κλάσμα. Το μίγμα αναταράσσεται έντονα για 1 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα διαχωριστική χοάνη. Η εκχύλιση επαναλαμβάνεται δύο φορές με προσθήκη 50 mL διαιθυλαιθέρα και τα διαιθυλαιθερικά κλάσματα συνδυάζονται (συνολικά 150 mL) και γίνονται εκπλύσεις αυτών με νερό, με διάλυμα KOH 0,5 M (δύο φορές) και πάλι με νερό έως ότου οι υγρά έκπλυσης να δίνουν ουδέτερη αντίδραση. Το διαιθυλαιθερικό κλάσμα (που

περιέχει το συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και ειδικά τις στερόλες και το σκουαλένιο) εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους 50 °C (Buchi Laboratorium Technik AG, Flawil, Ελβετία) και τα ίχνη του διαλύτη απομακρύνονται με ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 3 mL της κινητής φάσης (30:70 v/v μεθανόλη: ακετονιτρίλιο) και έπειτα διηθείται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm πριν την ανάλυσή του με HPLC-DAD. Το ασαπωνοποίητο υλικό του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου εκφράζεται ως ποσοστό κατά βάρος του εκχυλιζόμενου ελαίου.

3.4.4 Παραλαβή φαινολικών εκχυλισμάτων πυρηνέλαιου

Το πυρηνέλαιο (που έχει παραληφθεί με εκχύλιση) κατεργάζεται με μεθανόλη και εξάνιο για να επιτευχθεί εκχύλιση των βιοδραστικών φαινολικών συστατικών του όπως περιγράφεται από τους Janu et al., (2014), με μικρές τροποποιήσεις. Περίπου 1 g πυρηνέλαιου διαλύεται σε 1 mL εξανίου. Η στοιβάδα εξανίου εκχυλίζεται διαδοχικά με 2 mL μεθανόλης 60% (τρεις έως τέσσερις φορές). Τα μεθανολικά κλάσματα αναμιγνύονται και εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού για απομάκρυνση του διαλύτη. Το υπόλειμμα στη συνέχεια διαλύεται σε μεθανόλη (2 mL) και το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20 °C και στη συνέχεια αναλύεται για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχόμενου και της αντιοξειδωτικής του δράσης.

3.4.5 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχόμενου (Total phenol content - TPC)

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων άμεσα από τον ελαιοπυρήνα και από τα ανακτημένα πυρηνέλαια προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Εν συντομία, 100 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος εκχυλίσματος προστίθεται σε 7,9 mL απεσταγμένου νερού και 500 μL Folin-Ciocalteu. Μετά από ανάδευση σε vortex, προστίθεται στο μίγμα 1,5 mL διαλύματος 20% (w/v) ανθρακικού νατρίου. Τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται και ακολουθεί επώαση του διαλύματος για 30 min σε λουτρό θέρμανσης στους 40°C. Στη συνέχεια, μετρείται η απορρόφησή του διαλύματος στα 765 nm με φασματόμετρο (Helios Unicam, USA). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών υδροξυ-ομάδων που βρίσκονται στο υπό ανάλυση δείγμα. Τα φαινολικά ιόν οξειδώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού συμπλόκου του αντιδραστηρίου, με αποτέλεσμα το χρωματισμό του διαλύματος από κίτρινο σε μπλε και τη δυνατότητα μέτρησης της απορρόφησής του στα 765nm. Οι τιμές των μετρήσεων παρεμβάλλονται σε καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος από όπου υπολογίζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και εκφράζεται ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξύ (Gallic acid equivalents, GAE) σε g ξηρού ελαιοπυρήνα ή ελαίου.

3.4.6 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μέθοδος DPPH)

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και από τα ανακτημένα πυρηνέλαια έγινε με τη μέθοδο DPPH (2,2 - διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο) των Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, (1995). Το DPPH είναι μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου με έντονο ιώδες χρώμα. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά του προς ανάλυση δείγματος δεσμεύουν αυτή τη ρίζα, οδηγώντας στον αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ιώδες σε υποκίτρινο. Η ελάττωση της απορρόφησης μετρείται στα 515 nm. Το αποτέλεσμα για την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα υπολογίζεται ως IC50 (g ξηρού ελαιοπυρήνα/g DPPH). Το ποσοστό της δέσμευσης της DPPH ρίζας εκτιμώμενο από το ποσοστό του εναπομένοντος αντιδραστηρίου DPPH (% rem) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50% ορίζεται ως IC50. Συνεπώς όσο μικρότερη ποσότητα δείγματος απαιτείται ανά 1 g DPPH, τόσο πιο μεγάλη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του υλικού. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από τα ανακτημένα πυρηνέλαια κατασκευάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης Trolox στην κλίμακα 0,04-0,28 mg/mL ($r^2 = 0.998$) και τα αποτελέσματα για τα ανακτημένα έλαια εκφράζονται σε αντιοξειδωτική ικανότητα ισοδύναμη με Trolox (mg Trolox/g ελαίου d.w.).

Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν στο ψηφιακό φασματοφωτόμετρο Hitachi, U-2900 UV/Vis.

3.4.7 Προσδιορισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ευτηκτικών διαλυτών

Οι ακόλουθες ιδιότητες εξετάστηκαν για τους ευτηκτικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα. Η πυκνότητα μετρήθηκε με πυκνόμετρο στους 25 °C. Το ιξώδες μετρήθηκε με το ιξωδόμετρο Brookfield (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Stoughton, MA) (στέλεχος S61 ή S62, 40 rpm) στους 40 και 60 °C. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης αέρα / ευτηκτικού διαλύτη διεξήχθη στους 40 °C και 60 °C χρησιμοποιώντας την πλάκα Wilhelmy (Sigma 702, Biolin Scientific, Finland).

3.4.8 Προσδιορισμός υπεροξειδίων με τη μέθοδο του θειοκυανικού αμμωνίου

Ο προσδιορισμός των υπεροξειδίων του συστήματος γαλακτώματος του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του με λινελαϊκό οξύ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την

ακόλουθη μέθοδο που προτείνουν οι Lee et al. (2009). Ένα κλάσμα του συστήματος (100 μ L) αναμιγνύεται με 75% αιθανόλη (4,7 mL), 30% θειοκυανικό αμμώνιο (100 μ L) και 20 mM διαλύματος χλωριούχου σιδήρου σε 3,5% υδροχλωρικό οξύ (100 μ L). Παράλληλα γίνεται και λευκός προσδιορισμός με την προσθήκη όλων των παραπάνω διαλυμάτων εκτός του δείγματος. Η περιεκτικότητα σε υπεροξειδία μετρείται με απορρόφηση στα 500 nm, μετά από μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου με 75% αιθανόλη.

3.4.9 Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων (Peroxide Value, PV)

Ο αριθμός υπεροξειδίων (PV) στα εμπλουτισμένα έλαια προσδιορίστηκε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOCS Cd 8b-90 (AOCS, 2013) με χρήση 0,01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ για την τιτλοδότηση. Η τιμή PV εκφράζεται σε χιλιοστοϊσοδύναμα (meq) υπεροξειδίου ανά kg ελαίου.

3.4.10 Προσδιορισμός αριθμού p-Ανισιδίνης (p-Anisidine Value, p-AV)

Ο αριθμός p-Ανισιδίνης προσδιορίζει ποσοτικά τις αλδεϋδες που περιέχονται σε μία λιπαρή ύλη. Η μέθοδος είναι επίσημη κατά AOCS (AOCS Cd 18-90), βασίζεται στην αντίδραση της p-ανισιδίνης με τις αλδεϋδες προς παραγωγή βάσεων κατά Schiff και τα προϊόντα έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 350 nm.

3.4.11 Προσδιορισμός συντελεστών απορρόφησης K232 και K270

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση UV στα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC (AOAC, 1999), με μικρές τροποποιήσεις. Οι συντελεστές απορρόφησης K232 και K270 προσδιορίστηκαν μέσω μέτρησης της απορρόφησης διαλύματος ελαίου 1% σε ισοοκτάνιο στα 232 και 270 nm και με κυψελίδα 1 cm με χρήση του φασματοφωτόμετρου (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200V).

3.4.12 Αξιολόγηση της οξειδωτικής σταθερότητας των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες (Μέθοδος Oxitest)

Η αξιολόγηση της οξειδωτικής σταθερότητας των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες διεξήχθη ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Katsouli, Polychniatou, & Tzia, (2017), χρησιμοποιώντας έναν αντιδραστήρα οξείδωσης (Oxitest®, Velp Scientifica, Usmate, Milan, Italy). Η πίεση του θαλάμου παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας και προσδιορίζεται το σημείο επαγωγής (Induction Point, IP) του δείγματος. Στη δοκιμή χρησιμοποιείται ποσότητα δείγματος 10 g ελαίου.

3.4.13 Ανάλυση των στερολών και του σκουαλένιου με HPLC-DAD

Το ασαπωνοποίητο υλικό του ανακτημένου πυρηνέλαιου αναλύθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των στερολών και του σκουαλένιου. Ο υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης, HP 1100, ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), και στήλη Hypersil C18 column ODS 5 μ m, 250 \times 4,6 mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Τα χρωματογραφικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Chem Station for LC 3D Software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Οι διαλύτες έκλουσης αποτελούνται από μεθανόλη: ακετονιτρίλιο 30:70 με ρυθμό ροής 0,8 mL/min. Οι στερόλες και το σκουαλένιο ταυτοποιούνται με σύγκριση των χρόνων έκλουσης και των φασμάτων απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας με τα αντίστοιχα που λαμβάνονται για τις πρότυπες ουσίες, αλλά και με αύξηση της κορυφής με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου. Η ποσοτικοποίηση των στερολών επιτυγχάνεται με την απορρόφηση που καταγράφεται στα χρωματογραφήματα στα 205 nm, ενώ η εργοστερόλη προσδιορίζεται στα 280 nm. Το σκουαλένιο προσδιορίζεται επίσης στα 205 nm. 20 μ L του εκχυλίσματος εγχέονταν κάθε φορά στη στήλη της HPLC.

3.4.14 Προσδιορισμός των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών με HPLC-DAD

Η ανάλυση των επιμέρους φαινολών των παραγόμενων εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και από τα ανακτημένα πυρηνέλαια πραγματοποιήθηκε σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC) που αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης, HP 1100, ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), και στήλη Hypersil C18 column ODS 5 μ m, 250 \times 4,6 mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Τα χρωματογραφικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Chem Station for LC 3D Software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Η ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο που προτείνεται από τους Japón-Luján, Luque-Rodríguez, & Luque de Castro, (2006). Το σύστημα διαλυτών αποτελείται από νερό HPLC με οξικό οξύ 6% και 2mM οξικό νάτριο (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο HPLC (διαλύτης B). Χρησιμοποιείται βαθμωτή έκλουση ως εξής: 0-25 min, 100-50% A και 0-50% B, ροή 0,8 mL/min; 25-26 min, 50-0% A και 50-100% B, ροή 0,8 mL/min; 26-27 min, 0% A και 100% B, ροή 0,8-1,2 mL/min; 27-40 min, 0% A και 100% B, ροή 1,2 L/min; 40-41 min, 0-100% A και 100-0% B, ροή 1,2-0,8 mL/min, 41-45 min,

100% A και 0% B, ροή 0,8 mL/min. Ως βασικά μήκη κύματος για την ανίχνευση των συστατικών επιλέχθηκαν τα 280, 330, 340 and 350 nm. Για τον προσδιορισμό των περιεχόμενων φαινολικών κατασκευάζονται καμπύλες αναφοράς για τις εξής πρότυπες ουσίες: ρουτίνη, λουτεολίνη, καφεϊκό οξύ, βανιλίνη, υδροξυτυροσόλη και ελευρωπαΐνη. Η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε mg/g ελαιοπυρήνα ή ελαίου.

3.5 Επεξεργασία - Υπολογισμοί

3.5.1 Απόδοση εκχύλισης στερεού-υγρού

Η απόδοση της εκχύλισης ελαίου (extraction yield, Y) για κάθε διαδικασία εκφράζεται ως το ποσοστό του βάρους του ανακτημένου ελαίου ως προς την αρχική ξηρή μάζα του δείγματος προς εκχύλιση.

$$Y (\%) = \frac{\text{Ανακτημένο έλαιο (g)}}{\text{Μάζα του δείγματος προς εκχύλιση (g)}} \times 100\% \quad (\text{Εξ. 11})$$

3.5.2 Κινητικά μοντέλα

Για την περιγραφή των πειραματικών δεδομένων σχετικά με την κινητική της εκχύλισης του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά δύο κύρια μαθηματικά μοντέλα: το πρώτο που έχει προταθεί από τους So & Macdonald, (1986) και το δεύτερο που προτείνεται από τους Sulaiman, Aziz, & Kheireddine, (2013). Οι παράμετροι και των δύο μοντέλων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση με χρήση του προγράμματος Sigma Plot (Version 10 SYSTAT, Point Richmond, CA, USA).

3.5.2.1 Μοντέλο των So & Macdonald (1986)

Το μοντέλο των So και Macdonald (1986) περιλαμβάνει μία τροποποίηση του μοντέλου που είχαν προτείνει οι Patricelli, Assogna, Casalaina, Emmi, & Sodini (1979) και λαμβάνει υπόψη δύο μηχανισμούς εκχύλισης, δηλαδή την ταχεία απομάκρυνση ελαίου από την εξωτερική επιφάνεια του σπόρου κατά την έκλουσή του με το διαλύτη στην αρχή της διεργασίας (washing step) και την εκχύλιση του εναπομένου ελαίου από διασπασμένα ή μη κύτταρα μέσω του φαινομένου της διάχυσης στο εσωτερικό του σπόρου (diffusion step).

Με αυτό τον τρόπο, η απόδοση του ελαίου κάθε χρονική στιγμή (t) μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη εξίσωση:

$$Y_t = Y_e^w [1 - e^{-k_w t}] + Y_e^d [1 - e^{-k_d t}] \quad (\text{Εξ. 12})$$

όπου Y_t είναι η απόδοση του ελαίου κάθε χρονική στιγμή, Y_e^w και Y_e^d είναι οι υποθετικές αποδόσεις ελαίου σε κατάσταση ισορροπίας λόγω των μηχανισμών πλύσης και διάχυσης,

αντίστοιχα, k_w και k_d είναι οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για τους διάφορους μηχανισμούς εκχύλισης (min^{-1}).

Η συνολική απόδοση του ελαίου στην κατάσταση ισορροπίας θα είναι:

$$Y_e = Y_e^w + Y_e^d \quad (\text{Εξ. 13})$$

όπου Y_e είναι η απόδοση του ελαίου στις συνθήκες ισορροπίας και προσδιορίζεται πειραματικά.

3.5.2.2 Μοντέλο των Sulaiman et al. (2013)

Καθώς η διεργασία της εκχύλισης ελέγχεται από τη διάχυση, οι Sulaiman et al. (2013) πρότειναν τη χρήση ενός μοντέλου διάχυσης που χρησιμοποιεί το νόμο του Fick για να εξηγήσει τη μεταφορά μάζας του ελαίου από το στερεό στο διαλύτη. Ωστόσο, η μεταφορά μάζας με διάχυση απαιτεί τη γνώση της συγκέντρωσης του μέσου εντός των σωματιδίων, η οποία είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Γι' αυτό το λόγο, λαμβάνεται υπόψη η υπόθεση ότι στη διεπιφάνεια στερεού/υγρού, η μεταφορά μάζας με διάχυση είναι ίση με τη μεταφορά μάζας με συναγωγή. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μεταφορά μάζας του ελαίου από το στερεό προς το διαλύτη είναι ο κύριος μηχανισμός που ελέγχει το ρυθμό της εκχύλισης και ότι δεν λαμβάνει χώρα καμία αντίδραση μεταξύ του ελαίου και του διαλύτη, ο ρυθμός της μεταφοράς μάζας μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\frac{dW_t}{dt} = k A (C_e - C_t) \quad (\text{Εξ. 14})$$

όπου dW_t/dt είναι ο ρυθμός της μεταφοράς μάζας του ελαίου (g/min), k είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (m/min), A είναι η επιφάνεια για τη μεταφοράς της μάζας (m^2), και C_t και C_e είναι οι συγκεντρώσεις του ελαίου στο διάλυμα κατά το χρόνο t και στην ισορροπία (g/m^3), αντίστοιχα.

Καθώς η εκχύλιση διεξάγεται με διαδικασία διαλείποντος έργου (batch process) και ο όγκος είναι σταθερός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, η παραπάνω εξίσωση μπορεί να γραφεί ως:

Καθώς η εκχύλιση διεξάγεται σε διαδικασία διαλείποντος έργου (batch process) και ο όγκος είναι σταθερός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, η παραπάνω εξίσωση μπορεί να γραφτεί ως:

$$\frac{dW_t}{dt} = k \frac{A}{V} (W_e - W_t) \quad (\text{Εξ. 15})$$

$$\frac{dW_t}{dt} = k \alpha (W_e - W_t) \quad (\text{Εξ. 16})$$

όπου $k \cdot \alpha$ είναι ο συντελεστής της ογκομετρικής μεταφοράς μάζας (min^{-1}).

Με λογαρίθμηση, αν υποθεθεί ότι δε συμβαίνει μεταφορά μάζας ελαίου στο χρόνο μηδέν, λαμβάνεται η ακόλουθη εξίσωση:

$$W_t = W_e [1 - e^{-(k a)t}] \quad (\text{Εξ. 17})$$

Δεδομένου ότι η απόδοση ανά μάζα στερεών Y_c είναι ανάλογη με το W_c , μπορεί να προκύψει η ακόλουθη εξίσωση:

$$Y_t = Y_e [1 - e^{-(k a)t}] \quad (\text{Εξ. 18})$$

όπου Y_e είναι η απόδοση του ελαίου ή του ασαπωνοποίητου υλικού στις συνθήκες ισορροπίας.

3.5.3 Θερμοδυναμικές παράμετροι

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι, η μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας, για την εκχύλιση του ελαιοπυρήνα, προσδιορίστηκαν από την εξίσωση van't Hoff:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{Εξ. 19})$$

όπου K είναι η σταθερά χημικής ισορροπίας, ΔH είναι η μεταβολή της ενθαλπίας (kJ mol^{-1}) και ΔS είναι η μεταβολή της εντροπίας ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, ΔG (kJ mol^{-1}) για τη διεργασία της εκχύλισης εκτιμάται ως εξής:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Εξ. 20})$$

Η σταθερά χημικής ισορροπίας (K) υπολογίζεται ως εξής:

$$K = \frac{Y_e \text{ miscella}}{Y_e \text{ solid}} \quad (\text{Εξ. 21})$$

όπου $Y_e \text{ solid}$ είναι η ποσότητα του ανεκχύλιστου ελαίου που παραμένει στο στερεό υπόλειμμα σε θερμοκρασία T (K) και $Y_e \text{ miscella}$ είναι η απόδοση ισορροπίας σε θερμοκρασία T (K). Η τιμή του $Y_e \text{ solid}$ υπολογίστηκε με την αφαίρεση της μέσης συνολικής περιεκτικότητας σε έλαιο του ελαιοπυρήνα και της τιμής του $Y_e \text{ miscella}$.

3.5.4 Σχεδιασμός Box-Behnken για την αριστοποίηση της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους

Η μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου υποβοηθούμενη με υπέρηχους καθώς εκτιμά την επίδραση πολλαπλών μεταβλητών και των αλληλεπιδράσεών τους στην απόκριση με τον ελάχιστο αριθμό δοκιμών

(πειραμάτων). Χρησιμοποιήθηκε σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) για τρεις ανεξάρτητους παράγοντες (μεταβλητές διαδικασίας) (Box, & Behnken, 1960). Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι: θερμοκρασία εκχύλισης (°C, X1), αναλογία στερεού: υγρού διαλύτη (g/mL, X2) και μέγεθος σωματιδίων (mm, X3) και ο κάθε ένας από αυτούς ορίζεται σε τρία ισαπέχοντα επίπεδα (-1, 0, +1). Τα επίπεδα των τριών παραγόντων επιλέγονται βάσει προκαταρκτικών πειραμάτων. Ο πλήρης σχεδιασμός περιλαμβάνει 17 πειράματα που περιέχουν δώδεκα συνδυασμούς παραγόντων και πέντε επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο. Η απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο (%), το συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό (%), το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών και η αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου επιλέγονται ως μεταβλητές απόκρισης (Y). Ο πειραματικός σχεδιασμός καθορίζει την επίδραση των τριών κύριων παραγόντων (X1, X2, X3) και τις αλληλεπιδράσεις τους στη μεταβλητή απόκριση (Y) και περιγράφεται από ένα μοντέλο παλινδρόμησης 10 συντελεστών, του γενικού τύπου: για το συνδυασμό των ανεξάρτητων μεταβλητών.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Εξ. 22})$$

όπου β_0 είναι σταθερός συντελεστής (σημείο τομής), β_i είναι ο γραμμικός συντελεστής των κύριων παραγόντων, β_{ii} είναι ο τετραγωνικός συντελεστής για τους κύριους παράγοντες και β_{ij} είναι ο συντελεστής αλληλεπίδρασης δεύτερης τάξης. Τα τρισδιάστατα γραφήματα απόκρισης, το διάγραμμα των προβλεπόμενων τιμών καθώς και το επιθυμητό επίπεδο για όλους τους παράγοντες απεικονίζονται γραφικά με τη χρήση του λογισμικού STATISTICA.

Παρόμοιος σχεδιασμός ακολουθήθηκε για την αριστοποίηση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με συμβατική εκχύλιση και με χρήση υπερήχων. Ως παράγοντες (μεταβλητές διαδικασίας) του σχεδιασμού Box-Behnken χρησιμοποιούνται η συγκέντρωση του διαλύτη (X1), η θερμοκρασίας εκχύλισης (X2) και το είδος του διαλύτη (X3) και ως μεταβλητές απόκρισης (Y) το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), η αντιοξειδωτική δράση και τα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα.

3.6 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στον Πίνακα 16 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι σειρές των πειραμάτων που σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν, ανάλογα με το σκοπό και τις σχεδιαστικές συνθήκες κάθε πειράματος.

Πίνακας 16. Σειρές πειραμάτων

1. Εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα	
1.1	<p>Κινητική μελέτη συμβατικής εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο)</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση της θερμοκρασίας (40, 50 και 60 °C), της αναλογίας στερεού/υγρού διαλύτη (1:4, 1:8 και 1:12 w/v), της ταχύτητας ανάδευσης (100, 400 και 800 rpm) και του χρόνου εκχύλισης (1-60 min, ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα)
	<ul style="list-style-type: none"> • Προσδιορισμός του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού και ανάλυση των επιμέρους συστατικών του: στερόλες, σκουαλένιο με HPLC-DAD ➤ Υπολογισμός απόδοσης σε (μάζα ελαίου) έλαιο - Κινητικά μοντέλα ➤ Κινητικά μοντέλα για το ασαπωνοποίητο υλικό, τις κύριες στερόλες, και το σκουαλένιο
1.2	<p>Μελέτη εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας με Soxhlet (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο)</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη και της πολικότητας [εξάνιο, ισοπροπανόλη και μίγματα εξανίου-ισοπροπανόλης (9:1, 4:1, 3:1 και 3:2)], αναλογία στερεού/υγρού διαλύτη (1:8 w/v), χρόνος (8 h)
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Προσδιορισμός του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού και ανάλυση των επιμέρους συστατικών του: στερόλες, σκουαλένιο με HPLC-DAD ➤ Υπολογισμός απόδοσης σε (μάζα ελαίου) έλαιο
1.3	<p>Μελέτη εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους (Ultrasound Assisted - extraction, UAE)</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση της θερμοκρασίας (40, 50 και 60 °C), της αναλογίας στερεού/υγρού διαλύτη (1:4, 1:8 και 1:12 w/v) και της κοκκομετρίας (2,0, 1,0 και 0,5 mm), χρόνος (1 h)

	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Προσδιορισμός του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού και ανάλυση των επιμέρους συστατικών του: στερόλες, σκουαλένιο με HPLC-DAD • Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών, και επιμέρους φαινολικών συστατικών των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων με HPLC - DAD και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης ➤ Υπολογισμός απόδοσης σε (μάζα ελαίου) έλαιο • Αριστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM)
2. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από ελαιοπυρήνα	
2.1	Συμβατική Εκχύλιση (CE)
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη (αιθανόλη, ακετόνη και μεθανόλη σε αναλογία 90%, 70% και 50% v/v, αντίστοιχα, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,5), της θερμοκρασίας (40 και 60 °C) και του χρόνου εκχύλισης (1 και 4 h) • Αριστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM)
2.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (UAE)
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη (αιθανόλη, ακετόνη και μεθανόλη σε αναλογία 90%, 70% και 50% v/v, αντίστοιχα, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4), της θερμοκρασίας (40, 60 και 80 °C) και του χρόνου εκχύλισης (30 min) • Αριστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (Response Surface Methodology, RSM)
2.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (MAE)
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4), της θερμοκρασίας (40 και 60 °C) και του χρόνου εκχύλισης (5 και 30 min). Ένταση μικροκυμάτων: 200 W

2.4	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (ΗΑΕ) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4), της θερμοκρασίας (40 και 60 °C), της ταχύτητας ανάδευσης (4000, 12000 και 20000 rpm) και του χρόνου εκχύλισης (30 min).
2.5	Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υψηλή υδροστατική πίεση (ΗΗΡΑΕ) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Επίδραση του είδους του διαλύτη (αιθανόλη 70% v/v, ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,4), της πίεσης (300 και 600 MPa) και του χρόνου εκχύλισης (5 και 10 min)
2.6	Υδατική ενζυμική εκχύλιση και ενζυμική προκατεργασία ελαιοπυρήνα <ol style="list-style-type: none"> 1. Αξιολόγηση της δράσης των ενζύμων σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, μηχανικό ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και υψηλή υδροστατική πίεση • Μελέτη της επίδρασης της ενζυμικής προκατεργασίας στην εκχύλιση με μηχανικό ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και με υψηλή υδροστατική πίεση στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών, των επιμέρους φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC - DAD και της αντιοξειδωτικής δράσης τους
2.7	Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από ελαιοπυρήνα με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES)
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Μελέτη της χρήσης νέων πράσινων ευτηκτικών διαλυτών σε συνδυασμό με την εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, με υπέρηχους, με μηχανικό ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και με υψηλή υδροστατική πίεση ✓ Προσδιορισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ευτηκτικών διαλυτών ✓ Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών, των επιμέρους φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC - DAD και της αντιοξειδωτικής δράσης τους

<p>3. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων</p>
<p>3.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ ή και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο</p>
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ανάκτηση εκχυλίσματος αιθανόλης 70% και κλασμάτων του με εξάνιο, χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα και νερό ❖ Ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του σε λινελαϊκό οξύ, σε πρότυπο σύστημα λινελαϊκού οξέος (LAE) και σε ηλιέλαιο ✓ Προσδιορισμός του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών, των επιμέρους φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC - DAD και της αντιοξειδωτικής δράσης τους ✓ Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων (PV) του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε λινελαϊκό οξύ και σε ηλιέλαιο ✓ Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο πρότυπο σύστημα λινελαϊκού οξέος (LAE)
<p>3.2 Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων (ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή) σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Προσδιορισμός του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών, των επιμέρους φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC - DAD και της αντιοξειδωτικής δράσης τους ✓ Προσδιορισμός αριθμού υπεροξειδίων, p-Ανισιδίνης και συντελεστών απορρόφησης K232 και K270 των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων • Αξιολόγηση της οξειδωτικής σταθερότητας των εμπλουτισμένων με φαινολικά συστατικά ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες (Μέθοδος Oxitest)

3.6 Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα πειράματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού STATISTICA (StatSoft. Inc, Chicago, IL, USA). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και παρουσιάζεται ο μέσος όρος αυτών. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και η χρήση του κριτηρίου διαφοράς Duncan's test με βαθμό εμπιστοσύνης 95% ($P < 0.05$) για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων που αναφέρθηκαν τόσο για την ανάκτηση ελαίου και βιοδραστικών του συστατικών όσο και φαινολικών συστατικών απευθείας από ελαιοπυρήνα. Το λογισμικό SIGMAPLOT 10.0 (Systat Software Inc. Chicago Ill. USA) χρησιμοποιήθηκε για τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των πειραματικών δεδομένων και των παραμέτρων της εξίσωσης για την πρόβλεψη της κινητικής της εκχύλισης του πυρηνέλαιου και του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού όπως και των επιμέρους κλασμάτων του/συστατικών του (στερόλες, σκουαλένιο). Για την αριστοποίηση των παραμέτρων της εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken και η μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών μέσω του λογισμικού STATISTICA (StatSoft. Inc, Chicago, IL, USA, 1999). Επίσης, εφαρμόστηκε η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis - PCA) μέσω του λογισμικού STATISTICA (StatSoft. Inc, Chicago, IL, USA, 1999) για την αξιολόγηση της επίδρασης των ευτηκτικών διαλυτών και των διάφορων μεθόδων εκχύλισης στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, στα επιμέρους φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων μέσω προσδιορισμού HPLC - DAD και στην αντιοξειδωτική δράσης τους.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Σύμφωνα με το σχεδιασμό πειραμάτων όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρατίθενται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των επί μέρους πειραματικών σταδίων.

4.1 Εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα

4.1.1 Κινητική μελέτη συμβατικής εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο)

Τις τελευταίες δεκαετίες, η παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης και της εκχύλισης του πυρηνέλαιου. Στο παρελθόν, η μηχανική συμπίεση χρησιμοποιείτο για την εξαγωγή του ελαιόλαδου, η οποία αντικαταστάθηκε από τα συστήματα συνεχούς φυγοκέντρωσης τριών φάσεων και αργότερα δύο φάσεων (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012). Η εξαγωγή του ελαιόλαδου, ανεξάρτητα από το σύστημα που χρησιμοποιείται, παράγει ένα στερεό υπόλειμμα γνωστό ως ελαιοπυρήνα (Caputo, Scacchia, & Pelagagge, 2003, Amarni & Kadi, 2010). Ο ελαιοπυρήνας περιέχει υγρασία σε ποσοστό εξαρτώμενο από το εκάστοτε σύστημα εξαγωγής του ελαιόλαδου και έλαιο (πυρηνέλαιο), το οποίο εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το ελαιόλαδο ως προς τη σύσταση (Sánchez Moral & Ruiz Méndez, 2006). Το πυρηνέλαιο είναι πλουσιότερο σε ασαπωνοποίητα συστατικά από το ελαιόλαδο και συγκεκριμένα εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ορισμένες στερόλες και σε σκουαλένιο (Rodríguez et al., 2008). Τα περισσότερα εξ αυτών των συστατικών θεωρούνται βιοδραστικά συστατικά καθώς εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, και αντικαρκινική δράση (Aludatt et al., 2010, Czaplicki, Ogrodowska, Derewiaka, Tańska, & Zadernowski, 2011).

Η εκχύλιση με διαλύτη είναι η πλέον ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική για την εξαγωγή ελαίου από ελαιούχους σπόρους. Το εξάνιο χρησιμοποιείται συχνά για την εκχύλιση φυτικών ελαίων από τη βιομηχανία, κυρίως λόγω της αποτελεσματικής διαλυτικής του ικανότητας και της ευκολίας ανάκτησής του. Ο σκοπός της κινητικής μελέτης και μοντελοποίησης μίας διεργασίας εκχύλισης είναι να καθορίσει τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη διεργασία, όπως η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού, η ταχύτητα ανάδευσης και το μέγεθος σωματιδίων του στερεού, προκειμένου να εκτιμηθεί μαθηματικά η εξέλιξη της διεργασίας και να

αξιολογηθεί το κόστος για τη βιωσιμότητα και τη δυνατότητα εφαρμογής της σε βιομηχανική κλίμακα. Έχουν προταθεί πολλές θεωρίες που εξηγούν το μηχανισμό ανάκτησης ελαίου από ελαιούχους σπόρους (Meziane & Kadi, 2008, Bäumlner, Carelli, Crapiste, & Carrín, 2011, Kostić et al., 2013, So & Macdonald, 1986, Sulaiman, Aziz, & Kheireddine, 2013, Amarante, Oliveira, Schwantes, & Morón-Villarreyes, 2014, Toda, Sawada, & Rodrigues, 2016, Dagostin, Carpiné, & Corazza, 2015). Σύμφωνα με αυτές τις θεωρίες, η απόδοση μίας διαδικασίας εκχύλισης ελέγχεται τόσο από φαινόμενα μεταφοράς μάζας όσο και από φαινόμενα θερμοδυναμικής ισορροπίας (Chanioti, Liadakis, & Tzia, 2014). Η θερμοκρασία είναι κατά κύριο λόγο ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του πυρηνέλαιου. Υψηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης εκχύλισης, καθώς ενώ μειώνεται το ιξώδες και η επιφανειακή τάση του διαλύτη, ενισχύεται η διαλυτοποίηση και βελτιώνεται η διείσδυσή του στη στερεή μήτρας. Υπάρχουν τρία κύρια βήματα που συμβαίνουν κατά τη διεργασία της εκχύλισης με διαλύτη: 1. διείσδυση ή διάχυση του διαλύτη μέσα στους πόρους του στερεού, 2. διάλυση της διαλυτοποιούμενης ουσίας (solute) στο διαλύτη και μεταφορά του διαλύματος από το εσωτερικό του στερεού στην επιφάνειά του και 3. μετακίνηση στερεών από την εξωτερική επιφάνεια της στερεής μήτρας μέσα στο διάλυμα (Aguilera, 2003).

Η 1^η σειρά πειραμάτων αφορά την κινητική μελέτη της συμβατικής εκχύλισης του πυρηνέλαιου από τον ελαιοπυρήνα καθώς και την ανάκτηση των βιοδραστικών του συστατικών. Μέχρι τώρα, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κινητική μελέτη της εκχύλισης ελαίων από ελαιούχους σπόρους και δεν έχουν δώσει έμφαση στα επιμέρους συστατικά τους, όπως τα ασαπωνοποίητα συστατικά. Όσον αφορά τη μελέτη της εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του από τον ελαιοπυρήνα, στη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν υπάρχουν δεδομένα. Έτσι, η γνώση του ρυθμού εκχύλισης του ασαπωνοποίητου υλικού υπό καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας, αναλογίας στερεού/υγρού και ταχύτητας ανάδευσης αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου σε βιοδραστικές ενώσεις.

Στόχος της 1^{ης} σειράς πειραμάτων ήταν ο προσδιορισμός των κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων της εκχύλισης του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του από ελαιοπυρήνα, χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αναλογίες στερεού/υγρού και ταχύτητες ανάδευσης. Τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν τα πειραματικά δεδομένα ήταν: το μοντέλο των So & Macdonald (1986) και το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013), τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 3.5.2.

Πειράματα κινητικής μελέτης

Ο ελαιοπυρήνας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της κινητικής μελέτης είχε αρχική περιεκτικότητα σε υγρασία $45,0 \pm 0,11\%$ (w/w, ξ.β.) και $4,5 \pm 0,08\%$ (w/w, ξ.β.) μετά την ξήρανση. Μετά την άλεση μετατράπηκε σε σωματίδια με μέση διάμετρο $0,79 \pm 0,09$ mm. Το περιεχόμενο του ελαιοπυρήνα σε έλαιο ήταν $8,52 \pm 0,08\%$ (w/w, ξ.β.) και το ποσοστό του ασαπωνοποιήτου υλικού αυτού ήταν $4,68 \pm 0,05\%$ στο έλαιο.

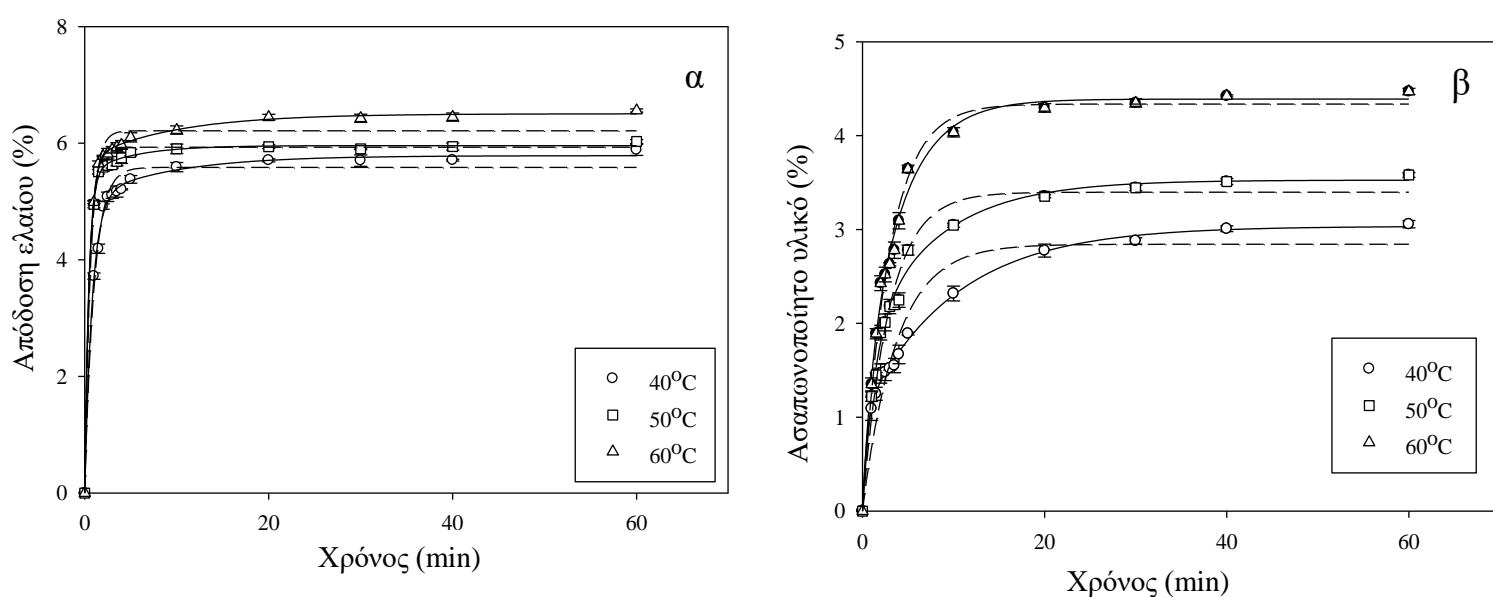
Τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από τη εκχύλιση του ελαίου από τον ελαιοπυρήνα χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αναλογίες στερεού/υγρού και ταχύτητες ανάδευσης παρουσιάζονται στα Σχήματα 43α, 44α, 45α, αντιστοίχως. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι το πρώτο στάδιο της εκχύλισης κυριαρχείται από την ταχεία απομάκρυνση ελαίου από την εξωτερική επιφάνεια του σπόρου κατά την έκλουσή του με το εξάνιο (washing step). Συγκεκριμένα, στα πρώτα 10 min, η απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο έφτασε το 6% (στους 60 °C, Σχήμα 43α) που αντιστοιχεί στο 73% της συνολικής απόδοσης σε έλαιο. Στη συνέχεια, ο ρυθμός εκχύλισης μειώνεται σημαντικά, καθώς η διάχυση είναι το κυρίαρχο φαινόμενο που διέπει αυτό το στάδιο (diffusion step). Παρόμοια κινητική συμπεριφορά έχει επαληθευτεί σε μελέτες εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα (Amarni & Kadi, 2010, Meziane & Kadi, 2008), σπόρους ηλιανθου (Baümler et al., 2011, Perez, Carelli, & Crapiste, 2011), ελαιοκράμβη (Fernández, Perez, Crapiste, & Nolasco, 2012, So & Macdonald, 1986), σπόρους ινδικής πασχαλιάς (Liau et al., 2008), σπόρους του φυτού *Jatropha curcas L.* (Santos, Martins, Caneschi, Aguilar, & Coimbra, 2015), κελύφη καρύδας (Sulaiman et al., 2013), σπόρους του φυτού Ρίκινου (Amarante et al., 2014), σόγια (Toda et al., 2016, Dagostin et al., 2015) όπως και επίσης για την εξαγωγή πολυφαινολών από σπόρους σταφυλιών (Tao, Zhang, & Sun, 2014, Guerrero, Torres, & Nuñez, 2008) και μούρων (Cacace & Mazza, 2003).

4.1.1.1 Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη διεργασία της εκχύλισης μελετήθηκε από τους 40 έως τους 60 °C και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 43. Με βάση τα κινητικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι η απόδοση σε έλαιο αυξάνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας. Σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες, η απόδοση σε έλαιο αυξάνεται ταχέως στην αρχή της διεργασίας, η οποία διέπεται από το στάδιο έκπλυσης (washing step). Ωστόσο, ο ρυθμός εκχύλισης επιβραδύνεται στο μεταγενέστερο στάδιο της διάχυσης (diffusion step). Η τελική απόδοση σε έλαιο μεταβάλλεται από 5,88% σε 6,56% καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία της εκχύλισης από τους 40 στους 60 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της διαλυτότητας του ελαίου στο εξάνιο, ενώ ταυτόχρονα καθώς μειώνεται το ιξώδες και του ελαίου και του εξανίου,

ευνοείται ο ρυθμός μεταφοράς της μάζας (Sulaiman et al., 2013, Amarante et al., 2014, Toda et al., 2016).

Αν και υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο από τους ερευνητές όσο και από τη βιομηχανία για τη μελέτη της ανάκτησης του ελαίου από ελαιούχους σπόρους με εκχύλιση με διαλύτη, εν τούτοις μέχρι σήμερα υπάρχει περιορισμένη έρευνα σχετικά με τη μελέτη της ανάκτησης του ασαπωνοποίητου υλικού των ελαίων. Η κινητική της εκχύλισης του ασαπωνοποίητου υλικού παρουσιάζεται στο Σχήμα 43β. Παρόμοια με ότι συμβαίνει στην εκχύλιση του ελαίου (Σχήμα 43α), και εδώ παρατηρήθηκε ένα πρώτο στάδιο ταχείας εκχύλισης (στάδιο έκπλυσης) και ένα επακόλουθο βραδύτερο στάδιο (στάδιο διάχυσης), φτάνοντας σε ισορροπία σε 20 min. Στο Σχήμα 43β, μπορεί να παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προάγει επίσης την εκχύλιση του ασαπωνοποίητου υλικού. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλες κινητικές μελέτες που αφορούν την εκχύλιση μικρότερων συστατικών (σαπωνοποιήσιμων ή μη) όπως ελεύθερων λιπαρών οξέων από σογιέλαιο (Toda et al., 2016) και τοκοφερολών και φωσφολιπιδίων από ηλιέλαιο (Baümler et al., 2011). Το τελικό ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου μεταβάλλεται από 3,05% σε 4,47% καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία της εκχύλισης από τους 40 στους 60 °C.



Σχήμα 43. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Συνθήκες: αναλογία στερεού υγρού 1:4 g/mL, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (συνεχής γραμμή)

Κινητικά μοντέλα

Τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 43α χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των μεταβλητών των μαθηματικών μοντέλων που προτείνονται από τους So & Macdonald, (1986) και τους Sulaiman et al. (2013). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν πολύ καλή προσαρμογή στα παραπάνω μοντέλα, με συντελεστή προσδιορισμού που κυμαίνεται μεταξύ 0,993 και 0,997 για το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) και μεταξύ 0,998 και 0,999 για το μοντέλο των So & Macdonald (1986). Το τελευταίο μοντέλο παρουσιάζει επίσης σχετικά χαμηλές μέσες τιμές σχετικής απόκλισης (ARD), οι οποίες κυμαίνονται από 0,66% έως 1,42%, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) κυμαίνονται μεταξύ 1,73% και 3,13% (Πίνακας 17). Όσον αφορά την κινητική μελέτη του ασαπωνοποίητου υλικού (Σχήμα 43β), τα πειραματικά δεδομένα είχαν επίσης πολύ καλή προσαρμογή στο μοντέλο των So & Macdonald (1986), με υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού ($0,998 \leq R^2 \leq 0,999$) και χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($1,98 \leq ARD \leq 3,05$). Το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) εμφάνισε αντίστοιχα χαμηλότερες τιμές συντελεστή προσδιορισμού ($0,975 \leq R^2 \leq 0,994$) και υψηλότερες τιμές σχετικής απόκλισης ($5,73 \leq ARD \leq 3,75$) (Πίνακας 17).

Στον Πίνακα 17α παρουσιάζονται οι συντελεστές μεταφοράς μάζας και οι αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας που υπολογίστηκαν για την κινητική εκχύλισης του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του σε διαφορετικές θερμοκρασίες, χρησιμοποιώντας το μοντέλο των So & Macdonald (1986). Σύμφωνα με τις μεταβλητές του κινητικού μοντέλου (Πίνακας 17α), το στάδιο της έκπλυσης (washing step) αποδείχθηκε ότι επικρατεί καθώς οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για το στάδιο της έκπλυσης (k_w), είναι σχεδόν 13 φορές υψηλότεροι από τους αντίστοιχους συντελεστές μεταφοράς μάζας για το στάδιο της διάχυσης (k_d). Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι οι υψηλότεροι συντελεστές παρατηρούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (50 και 60 °C). Όπως έχει αναφερθεί από τους Toda et al. (2016) σε πειράματα εκχύλισης σογιέλαιου χρησιμοποιώντας αιθανόλη ως διαλύτη, η υψηλότερη θερμοκρασία ενισχύει την απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο στην κατάσταση ισορροπίας. Οι Meziane & Kadi (2008) έχουν αναφέρει παρόμοια αποτελέσματα για την κινητική εκχύλισης του ελαιοπυρήνα με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη και συγκεκριμένα έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20 στους 50 °C έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε έλαιο. Όσον αφορά τα κινητικά δεδομένα στον Πίνακα 17 σχετικά με το ασαπωνοποίητο υλικό, η εκχύλιση του εξελίχθηκε παρόμοια με εκείνη που παρουσιάστηκε προηγουμένως για την κινητική της εκχύλισης του ελαίου. Υψηλότερες τιμές συντελεστών μεταφοράς μάζας παρατηρήθηκαν στο κυρίαρχο στάδιο της έκπλυσης, όπου οι συντελεστές είναι σχεδόν 8 φορές υψηλότεροι από τους αντίστοιχους συντελεστές διάχυσης.

Στον Πίνακα 17β παρουσιάζονται οι συντελεστές μεταφοράς μάζας και οι αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας που προσεγγίζονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) για την

κινητική εκχύλισης πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα κινητικά δεδομένα του πίνακα, οι τιμές των μεταβλητών Y_e και k αυξήθηκαν αυξανόμενης της θερμοκρασίας τόσο για το έλαιο όσο και για το ασαπωνοποίητο υλικό του. Αυτές οι παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με μελέτες που δημοσιεύθηκαν προηγουμένως από τους Sulaiman et al. (2013) και τους Liauw et al. (2008).

Πίνακας 17. Επίδραση της θερμοκρασίας (T) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των So & Macdonald (1986) (α) και των Sulaiman et al. (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του

α. Μοντέλο των So & Macdonald								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	Συντελεστές μεταφοράς μάζας (min^{-1}) ^a		Αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας			R^2 ^c	ARD ^d
		k_w	k_d	Y_e^w	Y_e^d	Y_e		
	T (°C)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	40	1,24 ± 0,09	0,11 ± 0,06	4,92 ± 0,02	0,49 ± 0,08	5,41 ± 0,10	0,998	1,42
	50	2,05 ± 0,07	0,12 ± 0,02	5,49 ± 0,04	0,52 ± 0,03	6,01 ± 0,07	0,999	0,66
	60	2,27 ± 0,08	0,21 ± 0,06	5,71 ± 0,05	0,79 ± 0,07	6,50 ± 0,12	0,999	0,67
	T (°C)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	40	0,78 ± 0,09	0,10 ± 0,01	1,02 ± 0,07	1,97 ± 0,05	2,99 ± 0,12	0,999	1,98
	50	1,09 ± 0,02	0,12 ± 0,03	1,80 ± 0,02	1,79 ± 0,03	3,59 ± 0,05	0,998	2,88
	60	2,02 ± 0,06	0,24 ± 0,07	1,12 ± 0,07	3,28 ± 0,02	4,40 ± 0,09	0,998	3,05
β. Μοντέλο των Sulaiman et al.								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	$k \cdot \alpha^b$ (min^{-1})		Y_e^b (%)			R^2 ^c	ARD ^d
	T (°C)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	40	0,97 ± 0,06		5,59 ± 0,07			0,993	3,04
	50	1,83 ± 0,11		5,93 ± 0,04			0,997	1,73
	60	1,86 ± 0,03		6,21 ± 0,07			0,993	3,13
	T (°C)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	40	0,27 ± 0,03		2,84 ± 0,11			0,975	5,73
	50	0,34 ± 0,03		3,40 ± 0,08			0,989	4,46
	60	0,34 ± 0,02		4,33 ± 0,07			0,994	3,75

^a Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (12)

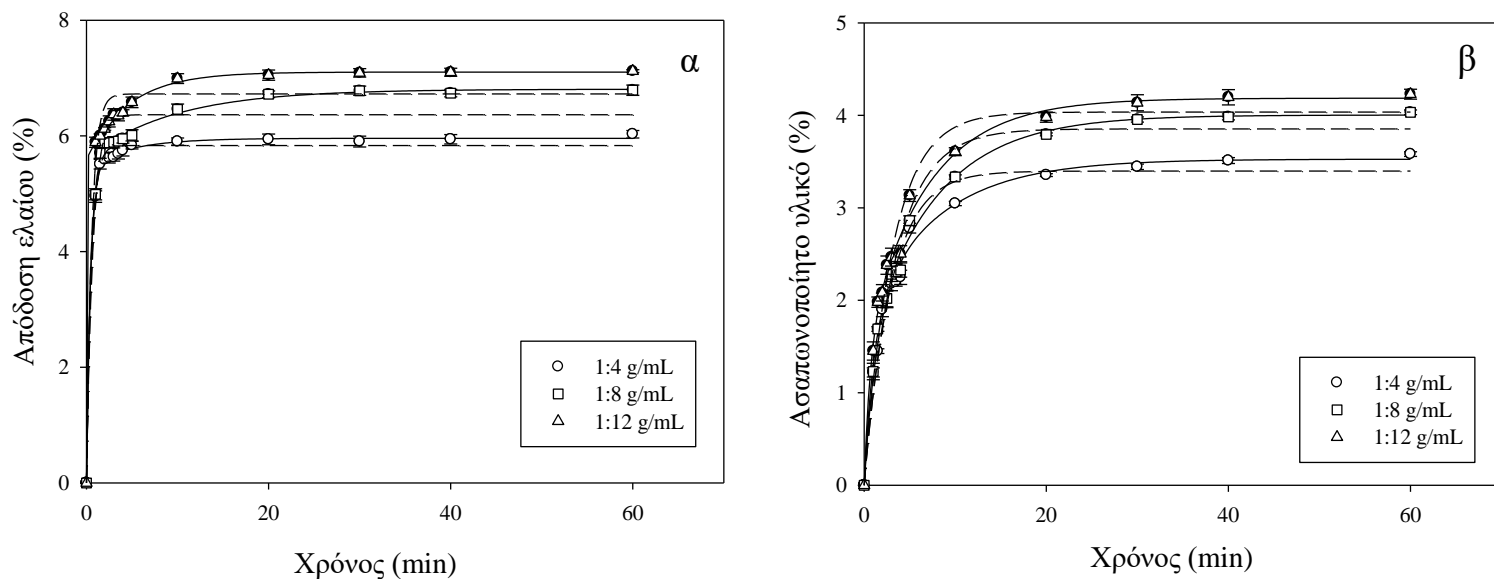
^b Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (18)

^c Συντελεστής προσαρμογής

^d Μέση σχετική απόκλιση

4.1.1.2 Επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού

Η επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού μελετήθηκε για τιμές από 1:4 έως 1:12 g/mL και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 44. Παρατηρήθηκε στην αρχή της διεργασίας μία ταχύτερη μεταφορά του ελαίου στο διαλύτη, και ακολούθησε στη συνέχεια μία μείωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας του ελαίου μέχρι την κατάσταση ισορροπίας, που αντιστοιχεί και στη μέγιστη απόδοση της εκχύλισης. Η ποσότητα του ελαίου αυξάνεται μειώνοντας την αναλογία στερεού/υγρού. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί καθώς η βαθμίδα συγκέντρωσης του μέσου αποτελεί την κινητήρια δύναμη στη διεργασία της εκχύλισης, και έχει αποδειχθεί ότι είναι υψηλότερη όταν η αναλογία στερεού/υγρού μειώνεται, οδηγώντας σε υψηλότερο ρυθμό διάχυσης και περαιτέρω σε υψηλότερη απόδοση (Meziane & Kadi, 2008, Şahin & Şamli, 2013). Η τελική απόδοση σε έλαιο μεταβάλλεται από 6,03% σε 7,12%, μειώνοντας την αναλογία στερεού/υγρού από 1:4 σε 1:12 g/mL. Η κινητική της εκχύλισης του ασαπωνοποιήτου υλικού ως προς τις διάφορες αναλογίες στερεού/υγρού παρουσιάζεται στο Σχήμα 44β. Το ασαπωνοποιήτο υλικό του πυρηνέλαιου μεταβάλλονται από 3,58% σε 4,23% καθώς μειώνεται η αναλογία στερεού/υγρού από 1:4 σε 1:12 g/mL. Το στάδιο έκπλυσης της εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποιήτου υλικού του πραγματοποιήθηκε κατά τα πρώτα 10 και 20 min επαφής μεταξύ του ελαιοπυρήνα και του εξανίου και η απόδοση σε έλαιο έφτασε στο 69 έως 82% της συνολικής απόδοσης, και το ασαπωνοποιήτο υλικό του ελαίου στο 72 έως 85% του συνολικού ασαπωνοποιήτου υλικού, αντίστοιχα. Οι Toda et al. (2016) ανέφεραν ότι στην αρχή της διεργασίας της εκχύλισης (στα πρώτα 10 min) στους 60 °C με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη, η απόδοση σε έλαιο αντιπροσώπευε το 85% της συνολικής απόδοσης.



Σχήμα 44. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές αναλογίες στερεού/υγρού. Συνθήκες: θερμοκρασία 50 °C, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (συνεχής γραμμή)

Κινητικά μοντέλα

Στον Πίνακα 18α οι συντελεστές μεταφοράς μάζας και οι αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας υπολογίστηκαν για την κινητική εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού σε διαφορετικές αναλογίες στερεού/υγρού, χρησιμοποιώντας το μοντέλο των So & Macdonald (2013). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν πολύ καλή προσαρμογή στο μοντέλο, με όλες τις τιμές του συντελεστή προσδιορισμού να είναι 0,999 και με πολύ χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($0,40 \leq \text{ARD} \leq 1,12$). Ομοίως, οι τιμές του συντελεστή προσδιορισμού για την εκχύλιση του ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου (Πίνακας 18α) κυμάνθησαν από 0,996 έως 0,998 και οι τιμές της σχετικής απόκλισης ήταν σχετικά χαμηλές ($2,77 \leq \text{ARD} \leq 3,13$). Από τις μεταβλητές του κινητικού μοντέλου της εκχύλισης ελαίου (Πίνακας 18α) επαληθεύτηκε και πάλι ότι το στάδιο της έκπλυσης επικρατεί σε σχέση με το στάδιο της διάχυσης, δεδομένου ότι οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για το στάδιο της έκπλυσης βρέθηκαν κατά μέσο όρο, περίπου 14 φορές υψηλότεροι από τους αντίστοιχους συντελεστές του σταδίου της διάχυσης. Εξετάζοντας τα κινητικά δεδομένα για το ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου (Πίνακας 18α), παρομοίως, οι τιμές των συντελεστών μεταφοράς μάζας του σταδίου έκπλυσης ήταν περίπου 8 φορές υψηλότεροι από εκείνους του σταδίου διάχυσης. Επιπλέον, όπως αναμενόταν, οι συντελεστές μεταφοράς μάζας και οι αποδόσεις εκχύλισης αυξήθηκαν με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού.

Ο Πίνακας 18β δείχνει τους συντελεστές μεταφοράς μάζας και τις αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας που προτείνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) για την κινητική εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποιήτου υλικού του αντίστοιχα. Με αυτό το μοντέλο τα πειραματικά δεδομένα για την εκχύλιση ελαίου είχαν επίσης καλή προσαρμογή (Πίνακας 18β), με τις τιμές των συντελεστών προσδιορισμού να κυμαίνονται από 0,985 έως 0,997 και με χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($1,81 \leq \text{ARD} \leq 4,60$). Όσον αφορά την κινητική της εκχύλισης του ασαπωνοποιήτου υλικού (Πίνακας 18β), οι τιμές του συντελεστή προσδιορισμού κυμάνθηκαν από 0,980 έως 0,991 και οι τιμές της σχετικής απόκλισης βρέθηκαν υψηλότερες από τις αντίστοιχες που προκύπτουν από το μοντέλο των So & Macdonald (1986) (Πίνακας 18α) ($4,49 \leq \text{ARD} \leq 5,63$). Μπορεί να παρατηρηθεί στον Πίνακα 18β ότι οι τιμές των παραμέτρων Y_e και k αυξάνονται με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού τόσο για την εκχύλιση του ελαίου όσο και του ασαπωνοποιήτου υλικού του. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με άλλους ερευνητές, οι οποίοι ανέφεραν παρόμοια επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού στην απόδοση της εκχύλισης ελαίου και αντιοξειδωτικών συστατικών από ρόδι (Goula, 2013, Qu, Pan, & Ma, 2010).

Πίνακας 18. Επίδραση της αναλογίας στερεού - υγρού (S:L) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των So & Macdonald (1986) (α) και των Sulaiman et al. (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του

α. Μοντέλο των So & Macdonald								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	Συντελεστές μεταφοράς μάζας (min ⁻¹) ^a		Αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας			R ² ^c	ARD ^d
		k _w	k _d	Y _e ^w	Y _e ^d	Y _e		
	S:L (g/mL)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	1:4	2,22 ± 0,05	0,12 ± 0,08	5,45 ± 0,04	0,46 ± 0,03	5,91 ± 0,07	0,999	0,68
	1:8	2,26 ± 0,07	0,20 ± 0,04	5,65 ± 0,04	1,21 ± 0,02	6,86 ± 0,06	0,999	1,12
	1:12	2,27 ± 0,07	0,21 ± 0,05	5,60 ± 0,08	1,51 ± 0,01	7,11 ± 0,09	0,999	0,40
	S:L (g/mL)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	1:4	0,76 ± 0,12	0,13 ± 0,04	1,82 ± 0,05	1,71 ± 0,03	3,53 ± 0,08	0,996	2,97
	1:8	1,13 ± 0,09	0,13 ± 0,02	1,44 ± 0,07	2,56 ± 0,05	4,00 ± 0,12	0,998	2,77
	1:12	1,50 ± 0,06	0,15 ± 0,03	1,48 ± 0,08	2,71 ± 0,08	4,19 ± 0,16	0,996	3,13
β. Μοντέλο των Sulaiman et al.								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	k·a ^b (min ⁻¹)		Y _e ^b (%)		R ² ^c	ARD ^d	
	S:L (g/mL)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	1:4	1,36 ± 0,08		5,81 ± 0,07		0,997	1,81	
	1:8	1,68 ± 0,09		6,45 ± 0,10		0,985	4,60	
	1:12	1,81 ± 0,02		6,89 ± 0,09		0,991	4,40	
	S:L (g/mL)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	1:4	0,29 ± 0,04		3,38 ± 0,09		0,991	4,49	
	1:8	0,31 ± 0,01		3,87 ± 0,11		0,987	5,51	
	1:12	0,32 ± 0,03		4,03 ± 0,12		0,980	5,63	

^a Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (12)

^b Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (18)

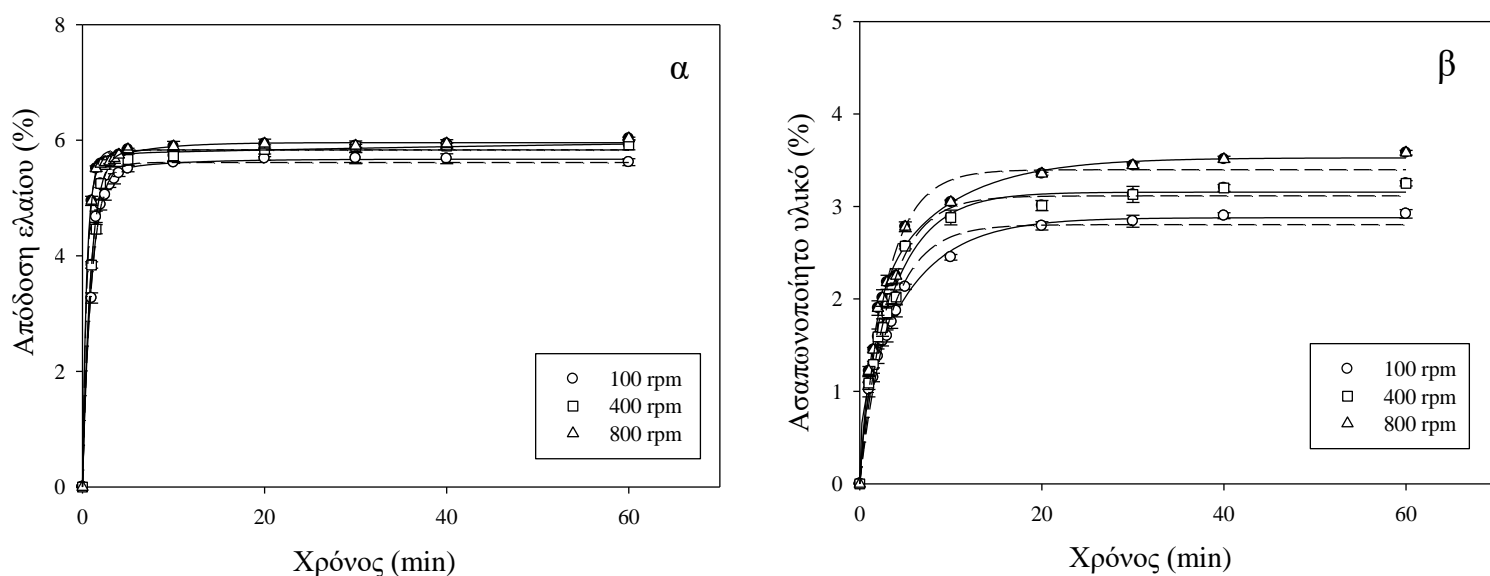
^c Συντελεστής προσαρμογής

^d Μέση σχετική απόκλιση

4.1.1.3 Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης

Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στη διεργασία της εκχύλισης μελετήθηκε από 100 έως 800 rpm, για αναλογία στερεού/υγρού 1:4 g/mL και θερμοκρασία 50 °C και τα αποτελέσματα για την κινητική μελέτη της εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του παρουσιάζονται στο Σχήμα 45. Η υψηλή ταχύτητα ανάδευσης προκαλώντας στροβιλισμό, έχει

ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας της προς διάλυση ουσίας στο διαλύτη και περαιτέρω την αύξηση της απόδοσης σε έλαιο και ασαπωνοποίητο υλικό. Αυξάνοντας την ταχύτητα ανάδευσης ενισχύεται η διάχυση των προς διάλυση ουσιών στο διάλυμα και τείνει προς μείωση η αντίσταση του οριακού στρώματος. Με αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης παρεμποδίζεται επίσης η καθίζηση, παρέχοντας ένα ομοιογενές διάλυμα. Ωστόσο, εφαρμόζοντας χαμηλή ταχύτητα (100 rpm) ένα μεγάλο μέρος του στερεού παραμένει στον πυθμένα της φιάλης οδηγώντας σε χαμηλές αποδόσεις (Diphare & Muzenda, 2014, Zhou et al., 2015). Η τελική απόδοση σε έλαιο μεταβάλλεται από 5,60% σε 6,02%, ενώ το ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου από 2,92% σε 3,58% καθώς αυξάνεται η ταχύτητα ανάδευσης από 100 σε 800 rpm. Το στάδιο έκπλυσης της εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του πραγματοποιήθηκε κατά τα πρώτα 5 και 20 min, αντίστοιχα, της επαφής μεταξύ του ελαιοπυρήνα και του εξανίου και η απόδοση σε έλαιο έφτασε στο 65 έως 69% της συνολικής απόδοσης, και σε ασαπωνοποίητο υλικό αντίστοιχα στο 60 έως 72% του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου. Οι Zhou et al. (2015) ανέφεραν αύξηση στην απόδοση και στους συντελεστές διάχυσης κατά την εκχύλιση φλαβονονών από σπόρους του φυτού *Oroxylum indicum*, καθώς αυξανόταν η ταχύτητα ανάδευσης από 300 σε 1400 rpm.



Σχήμα 45. Εκχύλιση του πυρηνέλαιου (α) και του ασαπωνοποίητου υλικού του (β) σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης. Συνθήκες: θερμοκρασία 50 °C, αναλογία στερεού/υγρού 1:4 g/mL. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι είναι οι τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που λαμβάνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) (διακεκομμένη γραμμή) και το μοντέλο των So & Macdonald (1986) (συνεχής γραμμή)

Κινητικά μοντέλα

Στον Πίνακα 19α, οι συντελεστές της μεταφοράς μάζας και οι αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας υπολογίστηκαν για την κινητική εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης, χρησιμοποιώντας το μοντέλο των So & Macdonald (1986). Τα πειραματικά δεδομένα είχαν πολύ καλή προσαρμογή στο μοντέλο, με τις τιμές των συντελεστών προσδιορισμού να ποικίλλουν από 0,996 έως 0,999 και με χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($0,66 \leq \text{ARD} \leq 1,72$). Ομοίως, για την εκχύλιση του ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου (Πίνακας 19α) οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού κυμάνθηκαν από 0,996 έως 0,998 και οι τιμές της σχετικής απόκλισης ήταν σχετικά χαμηλές ($2,21 \leq \text{ARD} \leq 2,91$). Από τις μεταβλητές του κινητικού μοντέλου της εκχύλισης ελαίου (Πίνακας 19α) επαληθεύτηκε πάλι η επικράτηση του σταδίου της έκπλυσης έναντι του σταδίου της διάχυσης, δεδομένου ότι οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για το στάδιο της έκπλυσης βρέθηκαν κατά μέσο όρο, περίπου 8 φορές υψηλότεροι από τους αντίστοιχους συντελεστές του σταδίου της διάχυσης. Εξετάζοντας τα κινητικά δεδομένα για το ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου (Πίνακας 19α), παρομοίως, οι τιμές των συντελεστών μεταφοράς μάζας του σταδίου έκπλυσης ήταν περίπου 9 φορές υψηλότεροι από εκείνους του σταδίου διάχυσης. Επιπλέον, η απόδοση σε έλαιο που ελήφθη με ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm ήταν ελαφρά αυξημένη σε σύγκριση με την αντίστοιχη με 400 rpm (Σχήμα 45α). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα προκύπτει ότι αυτή η ταχύτητα ανάδευσης δεν επηρεάζει την απόδοση σε έλαιο αλλά επηρεάζει τους συντελεστές της διάχυσης. Αυτή η παρατήρηση έχει επαληθευτεί και στην εκχύλιση ελαίου από ελαιοκράμβη από τους So & Macdonald (1986).

Ο Πίνακας 19β δείχνει τους συντελεστές μεταφοράς μάζας και τις αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας που προτείνονται από το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013) για την κινητική εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του αντίστοιχα. Με αυτό το μοντέλο τα πειραματικά δεδομένα για την εκχύλιση ελαίου είχαν επίσης καλή προσαρμογή (Πίνακας 19β), με τις τιμές των συντελεστών προσδιορισμού να κυμαίνονται από 0,997 έως 0,998 και με χαμηλές τιμές σχετικής απόκλισης ($1,66 \leq \text{ARD} \leq 2,16$). Όσον αφορά την κινητική της εκχύλισης του ασαπωνοποίητου υλικού του ελαίου (Πίνακας 19β), οι τιμές του συντελεστή προσδιορισμού κυμαίνονταν από 0,981 έως 0,985 και οι τιμές της σχετικής απόκλισης βρέθηκαν υψηλότερες από τις αντίστοιχες για το μοντέλο των So & Macdonald (1986) (Πίνακας 19α) ($4,12 \leq \text{ARD} \leq 5,53$). Μπορεί να παρατηρηθεί στον Πίνακα 19β ότι οι τιμές των παραμέτρων Y_e και k αυξάνονται με την αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης για την εκχύλιση του ελαίου όσο και του ασαπωνοποίητου υλικού του. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με την έρευνα των Diphare & Muzenda (2014) οι οποίοι ανέφεραν ότι η απόδοση της εκχύλισης ελαίου από τα απόβλητα λιπαντικού γράσου αυξήθηκε από 49% σε 75% με αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης από 200 σε 1200 rpm.

Πίνακας 19. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης (AS) στις παραμέτρους των κινητικών μοντέλων των So & Macdonald (1986) (α) και των Sulaiman et al. (2013) (β) για την εκχύλιση του πυρηνέλαιου και του ασαπωνοποίητου υλικού του.

α. Μοντέλο των So & Macdonald								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	Συντελεστές μεταφοράς μάζας (min^{-1}) ^a		Αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας			R ² ^c	ARD ^d
		k _w	k _d	Y _e ^w	Y _e ^d	Y _e		
	AS (rpm)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	100	1,05 ± 0,10	0,13 ± 0,09	5,42 ± 0,02	0,24 ± 0,03	5,66 ± 0,05	0,996	1,72
	400	1,10 ± 0,06	0,20 ± 0,09	4,75 ± 0,09	1,05 ± 0,08	5,80 ± 0,17	0,998	1,28
	800	2,26 ± 0,07	0,21 ± 0,09	5,48 ± 0,04	0,48 ± 0,03	5,96 ± 0,07	0,999	0,66
	AS (rpm)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	100	1,25 ± 0,08	0,15 ± 0,02	0,78 ± 0,05	2,08 ± 0,06	2,86 ± 0,11	0,998	2,21
	400	1,55 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,81 ± 0,08	2,32 ± 0,07	3,13 ± 0,15	0,996	2,79
	800	1,78 ± 0,09	0,18 ± 0,05	1,81 ± 0,04	1,74 ± 0,02	3,55 ± 0,06	0,997	2,91
β. Μοντέλο των Sulaiman et al.								
Συστατικό	Παράμετρος εκχύλισης	k · a ^b (min^{-1})		Y _e ^b (%)		R ² ^c	ARD ^d	
	AS (rpm)							
Πυρηνέλαιο (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)	100	0,98 ± 0,05		5,62 ± 0,05		0,996	2,16	
	400	1,06 ± 0,04		5,79 ± 0,04		0,998	1,66	
	800	1,83 ± 0,11		5,83 ± 0,04		0,997	1,73	
	AS (rpm)							
Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)	100	0,30 ± 0,02		2,80 ± 0,06		0,982	5,53	
	400	0,32 ± 0,02		3,12 ± 0,06		0,985	4,12	
	800	0,34 ± 0,03		3,40 ± 0,08		0,981	4,46	

^a Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (12)

^b Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (18)

^c Συντελεστής προσαρμογής

^d Μέση σχετική απόκλιση

4.1.1.4 Θερμοδυναμικές παράμετροι

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι (η μεταβολή της ενθαλπίας, η μεταβολή της εντροπίας και η ελεύθερη ενέργεια Gibbs) της διεργασίας της εκχύλισης ελαίου εκτιμήθηκαν με βάση τα δεδομένα για την απόδοση της διεργασίας σε έλαιο στις συνθήκες ισορροπίας. Ο Πίνακας 20 παρουσιάζει την απόδοση σε έλαιο στις συνθήκες ισορροπίας (Y_e miscella), το ανεκχύλιστο

ποσό ελαίου (Y_e) στις συνθήκες ισορροπίας (υπόλειμμα ελαίου στο στερεό) και τη θερμοδυναμική σταθερά (K), η οποία υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την Εξ. (21) και τις κύριες θερμοδυναμικές παραμέτρους της εκχύλισης του ελαίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκχύλισης.

Πίνακας 20. Θερμοδυναμικές παράμετροι της εκχύλισης του πυρηνέλαιου.

Μοντέλο	T(°C)	Y _e miscella (%)	Y _e solid (%)	K ^a	ΔH ^b (kJ mol ⁻¹)	ΔS ^b (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG ^c (kJ mol ⁻¹)
<i>So & Macdonald</i>	40	5,41	3,11	1,74	26,65	89,77	-1,44
	50	6,01	2,51	2,39			-2,34
	60	6,50	2,02	3,22			-3,24
<i>Sulaiman et al.</i>	40	5,59	2,93	1,91	14,87	52,88	-1,69
	50	5,93	2,59	2,29			-2,21
	60	6,21	2,31	2,69			-2,74

^a Εκτιμώμενες τιμές που προκύπτουν από την Εξ. (21)

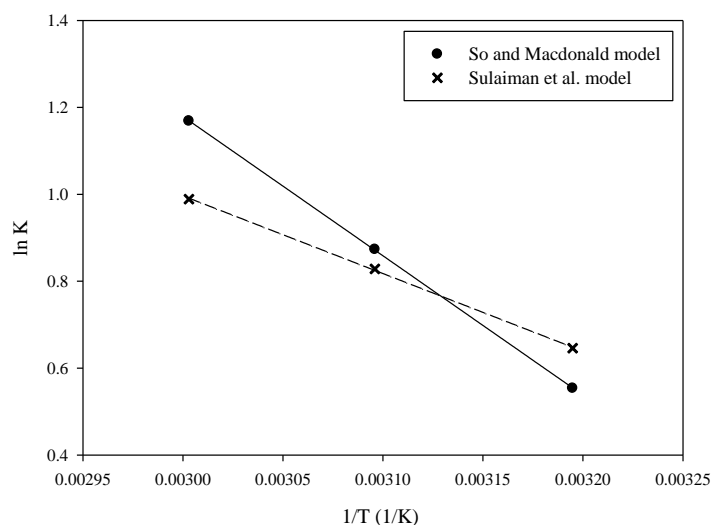
^b Εκτιμώμενες τιμές που προκύπτουν από την Εξ. (19)

^c Εκτιμώμενες τιμές που προκύπτουν από την Εξ. (20)

Το Σχήμα 46 δείχνει τη γραμμική εξάρτηση του lnK από το 1/T για τα δεδομένα που λαμβάνονται και από τα δύο μοντέλα (R² = 0,999 για το μοντέλο των So & Macdonald και 0,996 για το μοντέλο των Sulaiman et al.). Οι τιμές της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) υπολογίστηκαν από την κλίση και το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα y, αντίστοιχα, και βρέθηκαν: ΔH= 26,65 και 14,87 kJ mol⁻¹, για το μοντέλο των So & Macdonald και το μοντέλο των Sulaiman et al., αντίστοιχα και ΔS= 89,77 και 52,88 J mol⁻¹ K⁻¹, για το μοντέλο των So & Macdonald και το μοντέλο των Sulaiman et al., αντίστοιχα. Η θετική τιμή της ενθαλπίας δείχνει ότι το σύστημα θα πρέπει να απορροφήσει μία ποσότητα ενέργειας για να καταστεί δυνατή η εκχύλιση του ελαίου, και συνεπώς η διεργασία είναι ενδόθερμη. Η εκχύλιση των μορίων του ελαίου οδηγεί σε αύξηση της εντροπίας του συστήματος, ενώ η θετική τιμή της υποδεικνύει το μη αντιστρεπτό χαρακτήρα της διεργασίας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από άλλους έρευνες σχετικά με εκχύλιση ελαίου από ελαιοπυρήνα (Meziane & Kadi, 2008), σπόρους του φυτού *Jatropha curcas L.* (Santos et al., 2015), κελύφη καρύδας (Sulaiman et al., 2013), σπόρους του φυτού Ρίκινου (Amarante et al., 2014), σόγια (Toda et al., 2016, Dagostin et al., 2015), λιναρόσπορο (Kostić et al., 2013), και βαμβακόσπορο (Saxena, Sharma, & Sambhi, 2011).

Οι τιμές ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG) ήταν αρνητικές και κυμαίνονταν μεταξύ 1,44 και 3,24 kJ mol⁻¹. Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν ότι η εκχύλιση του ελαίου ήταν δυνατή και αυθόρμητη. Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί τις αυθόρμητες διεργασίες υποδηλώνοντας ότι η εκχύλιση του ελαίου ενισχύεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα συμφωνούν

με τις αντίστοιχες τιμές ΔG από άλλες έρευνες (Meziane & Kadi, 2008, Amarante et al., 2014, Amin, Hawash, Diwani, & Rafei, 2010, Rodrigues, Pinto, & Fernandes, 2008).



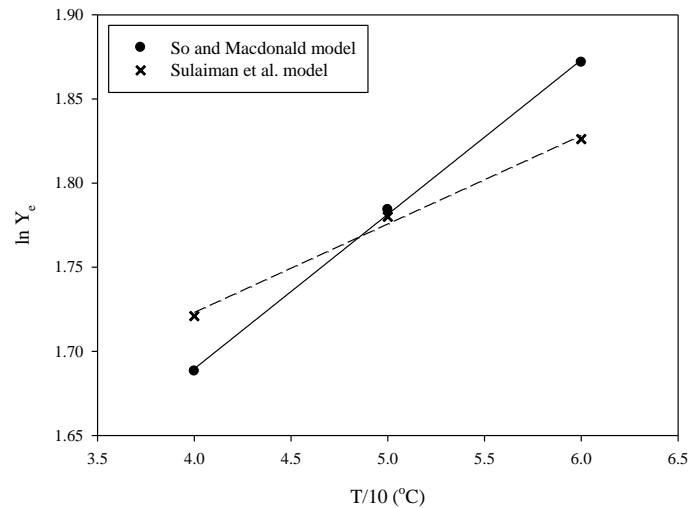
Σχήμα 46. Εξάρτηση της $\ln K$ (σταθερά ισορροπίας) επί του $1/T$ (θερμοκρασία, K). Συνθήκες: αναλογία στερεού/υγρού 1:4 g/mL, ταχύτητα ανάδευσης 800 rpm. Εξ. (19)

4.1.1.5 Συντελεστής θερμοκρασίας εκχύλισης

Ο συντελεστής της θερμοκρασίας εκχύλισης (γ) υποδηλώνει την αύξηση της εκχύλισης του ελαίου από τον ελαιοπυρήνα για κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ και ορίζεται ως:

$$Y_e = Y_{e0} \cdot \gamma^{T/10} \quad \text{Εξ. 23}$$

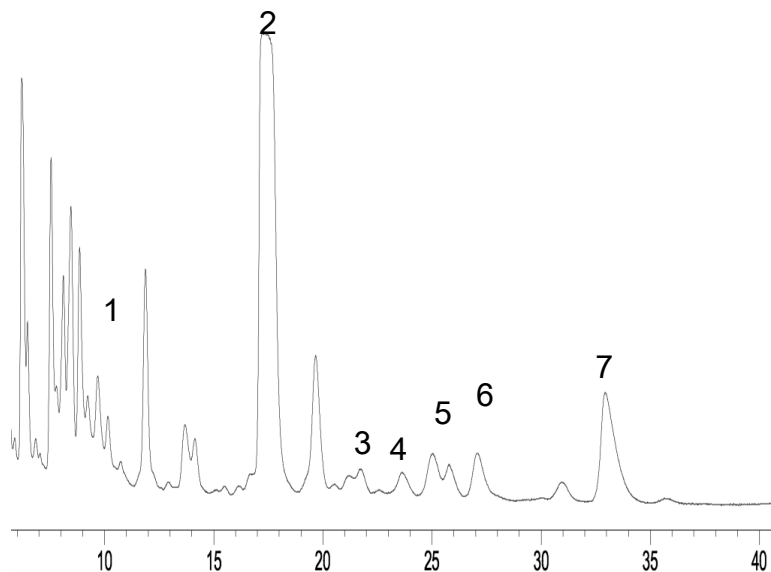
Όπου γ είναι ο συντελεστής της θερμοκρασίας, Y_e και Y_{e0} είναι η απόδοση σε έλαιο σε θερμοκρασίες T ($^{\circ}\text{C}$) και $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, αντίστοιχα. Το Σχήμα 47 παρουσιάζει την εξάρτηση του $\ln Y_e$ επί του $T/10$ ($^{\circ}\text{C}$). Η τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας εκχύλισης (γ) που λαμβάνεται από την κλίση του γραμμικού μετασχηματισμού της παραπάνω εκχύλισης ($R^2=0,995$ και $R^2=0,993$, για το μοντέλο των So & Macdonald και για το μοντέλο των Sulaiman et al, αντίστοιχα) ήταν $1,096 \pm 0,03$ και $1,054 \pm 0,01$ για το μοντέλο των So & Macdonald και το μοντέλο των Sulaiman et al., αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο αυξάνεται κατά ένα συντελεστή περίπου 1,096 ή 1,054 για κάθε $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ αύξησης της θερμοκρασίας. Η τιμή του συντελεστή γ βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία για την εκχύλιση ελαίου από λιναρόσπορο και ελαιοπυρήνα (Kostić et al., 2013, Meziane & Kadi, 2008).



Σχήμα 47. Εξάρτηση του $\ln Y_e$ επί του $T/10$. Εξ. (23)

4.1.1.6 Πειράματα κινητικής εκχύλισης των επιμέρους στερολών και του σκουαλένιου

Η περιεκτικότητα του πυρηνέλαιου σε επιμέρους στερόλες και σκουαλένιο που λαμβάνεται με εκχύλιση Soxhlet και εξάνιο ως διαλύτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 21. Οι τιμές τους κυμαίνονται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Boskou, 2011, Gu et al., 2016, Yuan, Ju, Jin, Ren, & Liu, 2015). Η κινητική μελέτη διεξήχθη χωριστά για τις επιμέρους κύριες στερόλες (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη) και για το σκουαλένιο του πυρηνέλαιου.



Σχήμα 48. Τυπικό χρωματογράφημα ανάλυσης των στερολών και του σκουαλένιου του πυρηνέλαιου. 1 ερυθροδιόλη, 2 σκουαλένιο, 3 εργοστερόλη, 4 χοληστερόλη, 5 καμπεστερόλη, 6 στιγμαστερόλη, 7 β-σιτοστερόλη

Πίνακας 21. Περιεκτικότητα του πυρηνέλαιου σε στερόλες και σκουαλένιο

Βιοδραστικό συστατικό	Περιεκτικότητα (mg/g πυρηνέλαιου)
Στερόλες	
Ερυθροδιόλη	0,103±0,003
Χοληστερόλη	0,009±0,001
Εργοστερόλη	0,017±0,001
Καμπεστερόλη	0,158±0,005
Στιγμαστερόλη	0,091±0,003
β-Σιτοστερόλη	0,911±0,008
Σύνολο ^a	1,289±0,010
Σκουαλένιο	4,112±0,007

^a Σύνολο των προσδιοριζόμενων στερολών

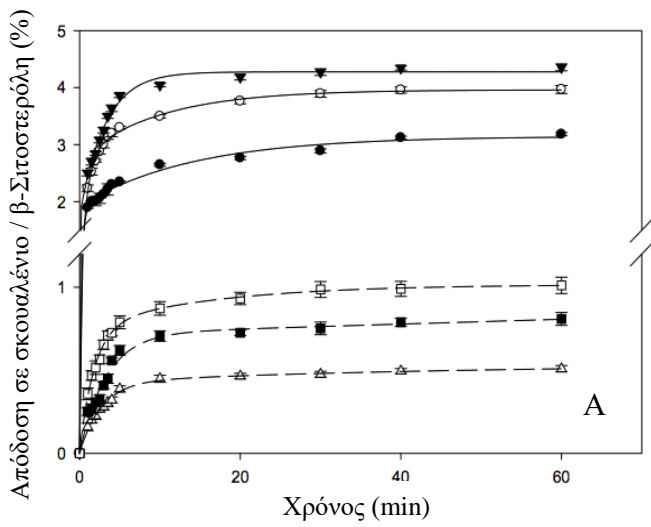
Τα αναλυτικά δεδομένα για το περιεχόμενο του πυρηνέλαιου σε σκουαλένιο και στις κύριες στερόλες (β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη) (mg/g ελαίου) που λαμβάνεται από τον ελαιοπυρήνα με χρήση εξανίου ως διαλύτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αναλογίες στερεού/υγρού και ταχύτητες ανάδευσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 49. Το κινητικό μοντέλο που προτάθηκε από τους So & Macdonald (1986) χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων καθώς αυτό το μοντέλο περιγράφει τη διεργασία της εκχύλισης του ελαίου και του ασαπωνοποιήτου υλικού του και έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με το μοντέλο που προτείνεται από τους Sulaiman et al. (2013), όπως περιγράφεται αναλυτικά στις παραπάνω ενότητες (Chanioti & Tzia, 2019).

Η επίδραση της θερμοκρασίας (40, 50 και 60 °C) στην εκχύλιση του σκουαλένιου και των στερολών φαίνεται στα Σχήματα 49A και 49B. Ομοίως, όπως συνέβη στην εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποιήτου υλικού του, η κινητική των επιμέρους αυτών συστατικών χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ στάδιο έκπλυσης και ένα ακόλουθο βραδύτερο στάδιο διάχυσης το οποίο φθάνει σε ισορροπία ανάλογα με την εξαγόμενη ουσία. Τα έλαια περιέχουν πολλά επιμέρους συστατικά, καθένα εκ των οποίων παρουσιάζει διαφορετική εκχυλισιμότητα. Οι στερόλες και το σκουαλένιο έχουν ασθενή πολικότητα, και είναι εγγενώς δεσμευμένα σε δομές του ελαίου, για αυτό το λόγο και η εκχύλισή τους παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με εκείνη του ελαίου (Tir, Dutta, & Badjah-hadj-ahmed, 2012, Baümler et al., 2011). Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την εκχύλιση του σκουαλένιου και των επιμέρους στερολών, με το ποσοστό εκχύλισης του σκουαλένιου στα πρώτα 30 min να ανέρχεται σε 66,4% στους 40 °C, 89,4% στους 50 °C και 98,1% στους 60 °C. Η καμπύλη εκχύλισης της β-σιτοστερόλης έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με το σκουαλένιο με ποσοστό εκχύλισης 92,3% στους 60 °C στα πρώτα 20 min (Σχήμα 49A). Η περιεκτικότητα στιγμαστερόλης και καμπεστερόλης στο έλαιο

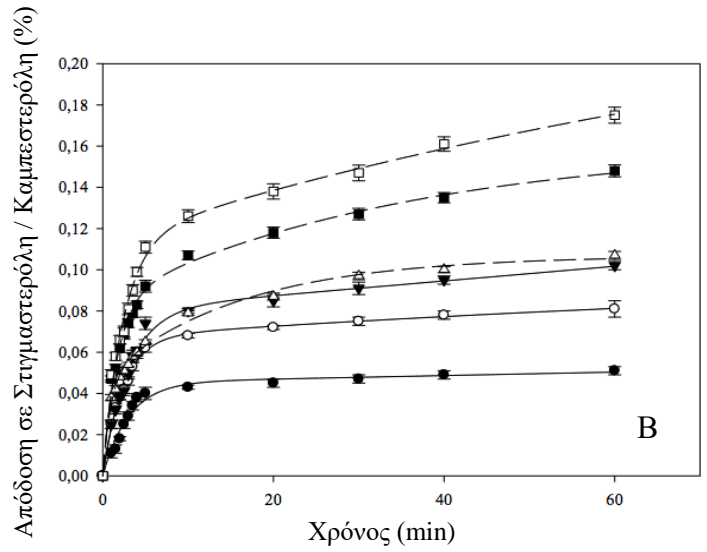
αυξήθηκε επίσης με τη θερμοκρασία. Ειδικότερα, η στιγμαστερόλη και η καμπεστερόλη εκχυλίστηκαν από 46,1% έως 89,2% και από 55,4% έως 84,0%, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από 40 °C στους 60 °C σε χρόνο 30 min, αντίστοιχα (Σχήμα 49B). Είναι αξιοσημείωτο ότι το στάδιο της έκπλυσης είναι σημαντικά υψηλότερο στους 60 °C για όλες τις καμπύλες όλων των στερολών και του σκουαλένιου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας στη διαλυτότητα και το ιξώδες αυτών των δευτερευόντων συστατικών. Οι Baümler et al. (2011) ανέφεραν παρόμοια αύξηση του ποσοστού εκχύλισης δευτερευόντων συστατικών, όπως φωσφολιπιδίων από 64,8% σε 96,2% από τους 40 °C στους 60 °C σε 150 min και τοκοφερολών στους 60 °C για 30 min με ποσοστό 99,5% επί του συνόλου των τοκοφερολών.

Η επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού από 1/4 έως 1/12 g/mL φαίνεται στα Σχήματα 49Γ και 49Δ. Παρατηρείται ότι όσο μικρότερη ήταν η αναλογία στερεού/υγρού, τόσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα των εκχυλιζόμενων δευτερευουσών ενώσεων. Όταν ο όγκος του διαλύτη της εκχύλισης αυξάνεται, το φαινόμενο της διάχυσης είναι πιο αποτελεσματικό. Το στάδιο της έκπλυσης του σκουαλένιου και της β-σιτοστερόλης συμβαίνει στα πρώτα 10 min επαφής μεταξύ του ελαιοπυρήνα και του εξανίου· σε αυτή τη χρονική στιγμή με τη μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού από 1/4 έως 1/12 g/mL, το σκουαλένιο εκχυλίστηκε φτάνοντας από 80,4% έως 91,9% της συνολικής ποσότητάς του, ενώ η β-σιτοστερόλη αντίστοιχα από 70,3% έως 81,2% της συνολικής ποσότητάς της (Σχήμα 49Γ). Ομοίως, στα πρώτα 20 min της εκχύλισης, η στιγμαστερόλη βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 70,6% έως 82,4% της συνολικής ποσότητάς της, ενώ η καμπεστερόλη έφτασε από 67,4% έως 90,3% της συνολικής ποσότητάς της, καθώς μειωνόταν η αναλογία στερεού/υγρού από 1/4 έως 1/12 g/mL (Σχήμα 49Δ). Παρόμοια επίδραση της αναλογίας στερεού/υγρού έχει παρατηρηθεί στην εκχύλιση ελαίου από ελαιοκράμβη (Perrier et al., 2017).

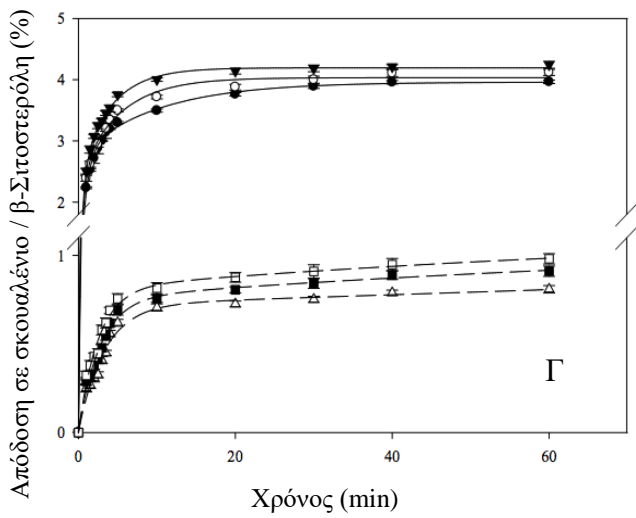
Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης από 100 έως 800 rpm παρουσιάζεται στα Σχήματα 49Ε και 49Ζ. Παρατηρείται ότι όσο υψηλότερη ήταν η ταχύτητα ανάδευσης, τόσο μεγαλύτερος ήταν ο ρυθμός της μεταφοράς της μάζας της προς διάλυση ουσίας. Το στάδιο έκπλυσης του σκουαλένιου και της β-σιτοστερόλης λαμβάνει χώρα στα πρώτα 20 και 10 min αντίστοιχα της επαφής μεταξύ του ελαιοπυρήνα και του εξανίου· με αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης από 100 έως 800 rpm, το σκουαλένιο εκχυλίστηκε από 68,9% έως 86,9% της συνολικής ποσότητάς του, ενώ η β-σιτοστερόλη βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 41,6% έως 70,3% της συνολικής ποσότητάς της (Σχήμα 49Ε). Ομοίως, στα πρώτα 20 min της εκχύλισης, η στιγμαστερόλη έφτασε από 54,9% έως 70,58% της συνολικής ποσότητάς της, ενώ η καμπεστερόλη βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 68,8% έως 86,9% της συνολικής ποσότητάς της, καθώς αυξήθηκε η ταχύτητα ανάδευσης από 100 σε 800 rpm. (Σχήμα 49Ζ).



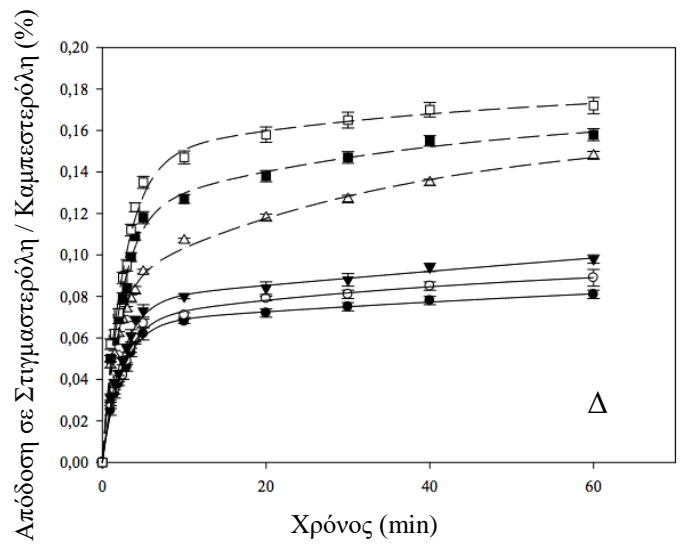
- 40°C - Squalene △ 40°C - b-Sitosterol
- 50°C - Squalene ■ 50°C - b-Sitosterol
- ▼ 60°C - Squalene □ 60°C - b-Sitosterol



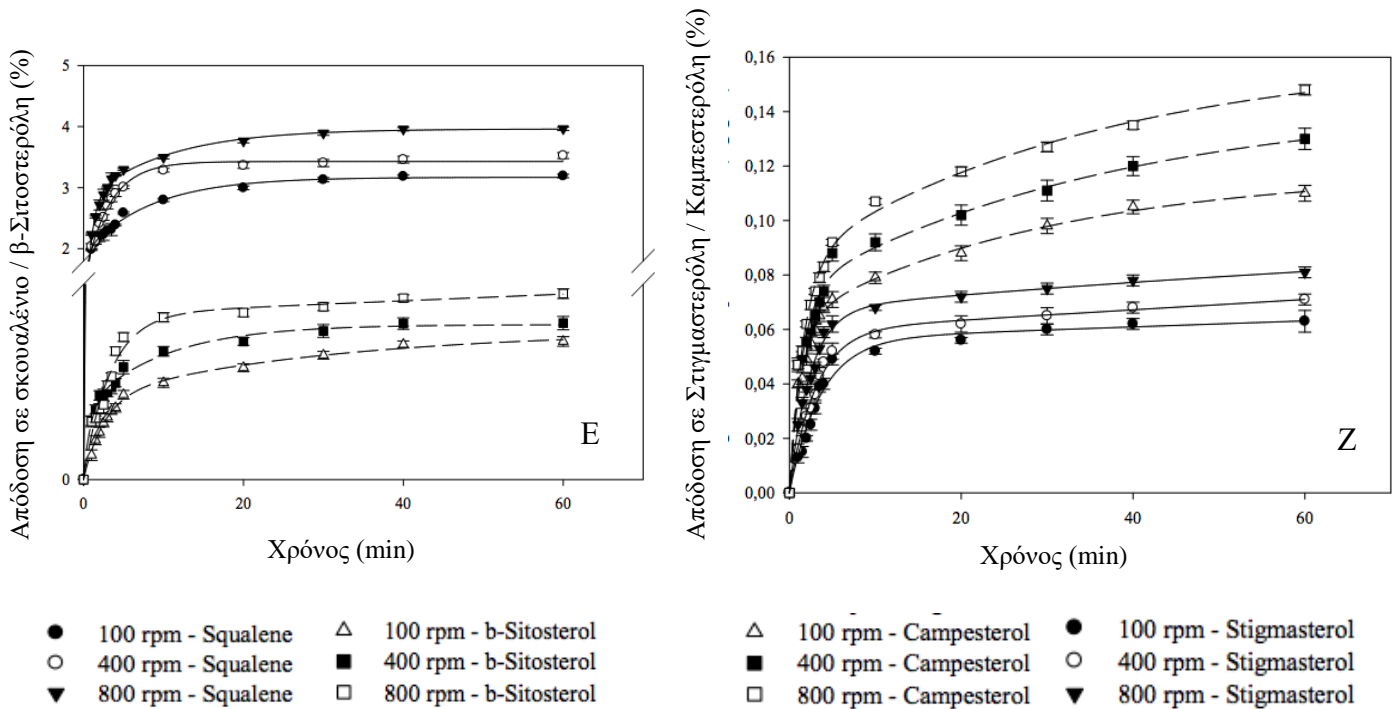
- 40°C - Stigmasterol △ 40°C - Campesterol
- 50°C - Stigmasterol ■ 50°C - Campesterol
- ▼ 60°C - Stigmasterol □ 60°C - Campesterol



- 1/4 g/mL - Squalene △ 1/4 g/mL - b-Sitosterol
- 1/8 g/mL - Squalene ■ 1/8 g/mL - b-Sitosterol
- ▼ 1/12 g/mL - Squalene □ 1/12 g/mL - b-Sitosterol



- 1/4 g/mL - Stigmasterol △ 1/4 g/mL - Campesterol
- 1/8 g/mL - Stigmasterol ■ 1/8 g/mL - Campesterol
- ▼ 1/12 g/mL - Stigmasterol □ 1/12 g/mL - Campesterol



Σχήμα 49. Η εκχύλιση του σκουαλένιου, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης σε διαφορετικές θερμοκρασίες (A, B) (S:L=1:4 g/mL, AS=800 rpm) αναλογίες στερεού/υγρού (Γ, Δ) (T=50 °C, AS=800 rpm) και ταχύτητες ανάδευσης (E, Z) (S:L=1:4 g/mL, T=50 °C). Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές των πειραμάτων, οι ράβδοι τις τυπικές αποκλίσεις και οι γραμμές αντιστοιχούν στις καμπύλες προσαρμογής που έχουν ληφθεί από το μοντέλο των So & Macdonald

Ο Πίνακας 22 παρουσιάζει τους συντελεστές μεταφοράς μάζας και τις αποδόσεις στις συνθήκες ισορροπίας που υπολογίστηκαν για την κινητική εκχύλιση του σκουαλένιου και των κύριων στερολών σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αναλογίες στερεού/υγρού και ταχύτητες ανάδευσης με τη χρήση του μοντέλου των So & Macdonald (1986). Το μοντέλο έδειξε πολύ καλά αποτελέσματα (Πίνακας 22), με όλους τους συντελεστές προσδιορισμού να κυμαίνονται από 0,991 έως 0,999. Όσον αφορά τις μεταβλητές του κινητικού μοντέλου εκχύλισης για το σκουαλένιο, τη β-σιτοστερόλη, τη στιγμαστερόλη και την καμπεστερόλη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, αποδείχθηκε η επικράτηση του σταδίου έκπλυσης έναντι του σταδίου της διάχυσης, δεδομένου ότι οι συντελεστές μεταφοράς μάζας του σταδίου της έκπλυσης είναι κατά μέσο όρο 30, 13, 56 και 21 φορές υψηλότεροι από τους αντίστοιχους για το στάδιο της διάχυσης. Ομοίως, για τις διαφορετικές αναλογίες στερεού/υγρού, οι συντελεστές μεταφοράς μάζας για το στάδιο της έκπλυσης για το σκουαλένιο, τη β-σιτοστερόλη, τη στιγμαστερόλη και τη καμπεστερόλη είναι κατά μέσο όρο, 11, 30, 31 και 19 φορές υψηλότεροι από τους

αντίστοιχους συντελεστές του σταδίου της διάχυσης. Όσον αφορά τα κινητικά δεδομένα για τις διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης η επικράτηση του σταδίου έκπλυσης επαληθεύεται και πάλι, δεδομένου ότι οι τιμές των συντελεστών μεταφοράς μάζας στο στάδιο αυτό βρέθηκαν, κατά μέσο όρο, περίπου 12, 5, 48 και 23 φορές υψηλότερες από αυτές των συντελεστών του σταδίου της διάχυσης για την εκχύλιση του σκουαλένιου, της β-σιτοστερόλης, της στιγμαστερόλης και της καμπεστερόλης, αντίστοιχα.

Πίνακας 22. Επίδραση της θερμοκρασίας (T), της αναλογίας στερεού/υγρού (S:L) και της ταχύτητας ανάδευσης (AS) στις παραμέτρους του κινητικού μοντέλου των So & Macdonald για την εκχύλιση του σκουαλένιου, της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης

Συστατικό (mg/ g ελαίου)	Παράμετρος εκχύλισης (min-1) ^a	Συντελεστές μεταφοράς μάζας		Αποδόσεις ισορροπίας		στις	συνθήκες	R ²
		k _w	k _d	Y _e ^w	Y _e ^d	Y _e		
T (°C)								
Σκουαλένιο	40	2,33±0,07	0,07±0,01	1,97±0,07	1,18±0,07	3,15±0,14	0,997	
	50	2,77±0,10	0,09±0,02	2,72±0,09	1,23±0,08	3,95±0,17	0,998	
	60	2,98±0,12	0,11±0,02	3,01±0,09	1,26±0,07	4,27±0,16	0,998	
β-Σιτοστερόλη	40	0,370±0,041	0,022±0,004	0,426±0,041	0,112±0,040	0,538±0,081	0,996	
	50	0,384±0,052	0,025±0,002	0,719±0,052	0,158±0,032	0,877±0,084	0,991	
	60	0,556±0,053	0,060±0,008	0,749±0,053	0,267±0,041	1,016±0,094	0,999	
Καμπεστερόλη	40	0,372±0,061	0,016±0,007	0,087±0,002	0,025±0,008	0,112±0,010	0,998	
	50	0,587±0,052	0,028±0,008	0,125±0,012	0,028±0,009	0,153±0,021	0,998	
	60	0,616±0,025	0,032±0,009	0,134±0,011	0,039±0,009	0,173±0,020	0,998	
Στιγμαστερόλη	40	0,329±0,048	0,005±0,001	0,045±0,002	0,012±0,002	0,057±0,004	0,998	
	50	0,421±0,052	0,008±0,002	0,067±0,003	0,026±0,007	0,093±0,010	0,997	
	60	0,453±0,074	0,009±0,002	0,081±0,006	0,030±0,008	0,111±0,014	0,996	
S:L (g/mL)								
Σκουαλένιο	1:4	1,33±0,10	0,09±0,02	2,33±0,09	1,63±0,08	3,96±0,17	0,999	
	1:8	1,95±0,42	0,19±0,03	2,39±0,22	1,64±0,21	4,03±0,43	0,998	
	1:12	2,04±0,24	0,25±0,02	2,42±0,13	1,77±0,13	4,19±0,26	0,999	
β-Σιτοστερόλη	1:4	0,30±0,05	0,01±0,00	0,71±0,05	0,31±0,03	1,02±0,08	0,991	
	1:8	0,36±0,05	0,01±0,00	0,75±0,07	0,35±0,07	1,10±0,14	0,995	
	1:12	0,41±0,05	0,02±0,00	0,81±0,07	0,37±0,07	1,18±0,14	0,995	

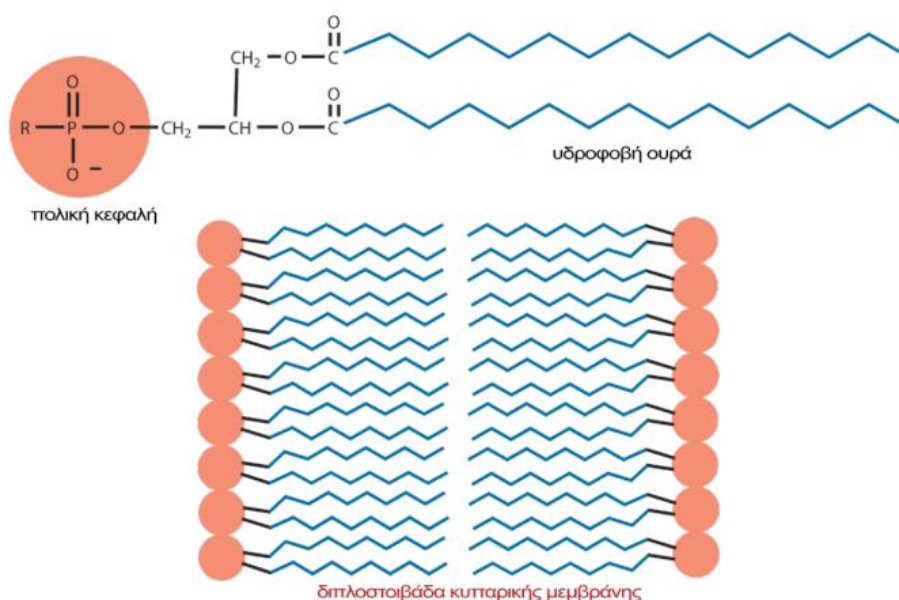
Καμπεστερόλη	1:4	0,30±0,03	0,02±0,00	0,09±0,00	0,02±0,00	0,11±0,00	0,998
	1:8	0,38±0,05	0,02±0,00	0,12±0,01	0,03±0,00	0,15±0,01	0,996
	1:12	0,43±0,05	0,03±0,00	0,15±0,01	0,05±0,01	0,20±0,01	0,995
Στιγμαστερόλη	1:4	0,35±0,03	0,01±0,00	0,06±0,00	0,03±0,00	0,09±0,00	0,998
	1:8	0,38±0,05	0,01±0,00	0,07±0,00	0,04±0,00	0,11±0,00	0,996
	1:12	0,42±0,03	0,02±0,00	0,09±0,01	0,05±0,01	0,14±0,02	0,997
AS (rpm)							
Σκουαλένιο	100	1,15±0,61	0,09±0,01	1,46±0,07	1,25±0,05	2,71±0,12	0,998
	400	1,21±0,71	0,10±0,01	1,91±0,05	1,96±0,05	3,87±0,10	0,999
	800	1,33±0,10	0,12±0,01	1,94±0,09	2,01±0,01	3,95±0,10	0,99
β-Σιτοστερόλη	100	0,288±0,05	0,03±0,01	0,353±0,03	0,29±0,03	0,643±0,06	0,998
	400	0,304±0,16	0,10±0,01	0,361±0,03	0,31±0,04	0,671±0,07	0,996
	800	0,388±0,05	0,12±0,02	0,419±0,09	0,39±0,05	0,809±0,14	0,991
Καμπεστερόλη	100	0,589±0,12	0,026±0,011	0,063±0,003	0,055±0,005	0,118±0,008	0,997
	400	0,662±0,06	0,028±0,016	0,073±0,007	0,070±0,008	0,143±0,015	0,994
	800	0,720±0,02	0,033±0,010	0,084±0,005	0,076±0,007	0,160±0,012	0,998
Στιγμαστερόλη	100	0,273±0,05	0,006±0,001	0,056±0,008	0,017±0,004	0,073±0,012	0,997
	400	0,329±0,037	0,007±0,003	0,059±0,005	0,022±0,007	0,081±0,012	0,996
	800	0,421±0,035	0,008±0,002	0,067±0,003	0,036±0,008	0,100±0,011	0,998

^a Εκτιμώμενες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από την καμπύλη προσαρμογής του μοντέλου της εξίσωσης Εξ. (12)

4.1.2 Μελέτη εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα με μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας με συσκευή Soxhlet (συνολικό ασαπωνοποίητο υλικό και επιμέρους κλάσματα/συστατικά του: στερόλες, σκουαλένιο)

Η παραγωγή του πυρηνέλαιου διεξάγεται κυρίως με εκχύλιση με χρήση εξάνιου. Το εξάνιο έχει επιλεγεί ως εξαιρετικός διαλύτης εκχύλισης και χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια, εξαιτίας των μη πολικών ιδιοτήτων του, της υψηλής εκλεκτικότητας στα έλαια, της αποδοτικής εκχύλισης των ελαίων, της αποδοτικής ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησής του και του χαμηλού ενεργειακού κόστους της διεργασίας ανάκτησης (H. Li et al., 2004).

Στην επιφάνεια των φυτικών κυττάρων βρίσκονται τα φωσφολιπίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της διπλοστοιβάδας της κυτταρικής τους μεμβράνης. Τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από μία άπολη υδρόφοβη ουρά, που είναι οι μακριές αλειφατικές αλυσίδες των δύο λιπαρών οξέων και από μία πολική υδρόφιλη κεφαλή που είναι η φωσφορική ομάδα διατάσσονται στην κυτταρική μεμβράνη σε διπλοστοιβάδα (Σχήμα 50). Τα υδρόφοβα τμήματα βρίσκονται στο εσωτερικό της μεμβράνης και τα υδρόφιλα στις δύο επιφάνειες αυτής, γι' αυτό το λόγο κατά τη διάρκεια της εκχύλισης των λιπαρών είναι δυνατό να εμποδίζουν την πρόσβαση του μη πολικού διαλύτη, του εξάνιου, στο έλαιο και να καθυστερούν τη διεργασία (Tir et al., 2012).



Σχήμα 50. Διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης

Επομένως, μερικές φορές στην εκχύλιση των λιπαρών χρησιμοποιείται ένας συν-διαλύτης, προκειμένου να αυξηθεί η πολικότητα της υγρής φάσης, επιτρέποντας έτσι την ανάκτηση και άλλων συστατικών με διαφορετικές πολικότητες κατά τη διάρκεια της ίδιας της διεργασίας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη των πολικών αλκοολών, όπως η ισοπροπυλική αλκοόλη ως συν-διαλύτης σε ένα μη-πολικό διαλύτη, βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Ryckebosch, Paulina, Bermúdez, & Termote-verhalle, 2014, Balasubramanian, Yen Doan, & Obbard, 2013). Η ισοπροπυλική αλκοόλη είναι ένας αποτελεσματικός και επωφελής διαλύτης εκχύλισης για τους ελαιούχους σπόρους με υψηλή διαθεσιμότητα, είναι βιο-αποικοδομήσιμο υλικό, έχει χαμηλή τοξικότητα, και παρουσιάζει υψηλή απόδοση εκχύλισης σε έλαιο εμπλουτισμένο με πολύτιμες βιοδραστικές ενώσεις, όπως ορισμένες ενώσεις του ασαπωνοποιήτου κλάσματος, αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική και λειτουργική αξία του ανακτώμενου ελαίου (Capellini, Giacomini, Cuevas, & Rodrigues, 2017, Seth, Agrawal, Ghosh, Jayas, & Singh, 2007, Seth et al., 2007). Μολονότι η ισοπροπυλική αλκοόλη εξατμίζεται σε υψηλότερη θερμοκρασία (σημείο ζέσεως 82 °C) από ότι το εξάνιο, μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής ισοπροπυλικής αλκοόλης εξατμίζεται κατά τη διεργασία της εκχύλισης (κάτι που δεν είναι επιθυμητό), με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ενέργειας (Seth et al., 2007). Οι Navarro et al. (2016) αναφέρουν ότι η χρήση αλκοολών ως συν-διαλυτών για εκχύλιση ελαίου επιτρέπει την επίτευξη υψηλότερης συγκέντρωσης βιοδραστικών ενώσεων στο έλαιο, όπως σε στερόλες. Σε αυτή την πειραματική σειρά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως σε στερόλες και σκουαλένιο με τη χρήση μιγμάτων διαλυτών διαφορετικής πολικότητας και αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπήρχε νωρίτερα κάποια σχετική αναφορά στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η ισοπροπυλική αλκοόλη ως συνδιαλύτης του εξανίου.

4.1.2.1 Απόδοση σε έλαιο - Ασαπωνοποιήτο υλικό ελαίου (%)

Οι αποδόσεις σε έλαιο κατά την εκχύλιση του ελαιοπυρήνα με χρήση διαφόρων διαλυτών κυμαίνονταν από 9,80 έως 13,70%, όπως φαίνεται στον Πίνακα 23. Σε φθίνουσα σειρά ανάλογα με το διαλύτη, οι αποδόσεις ήταν: Η: I=3:2> Η: I=3:1> Η: I=4:1> Η: I=9:1> ισοπροπανόλη> εξάνιο. Αυτό δείχνει ότι το σύστημα εκχύλισης που περιέχει ισοπροπανόλη ήταν πιο αποτελεσματικό για την εκχύλιση ελαίου από ελαιοπυρήνα. Αυτή η συμπεριφορά έχει επίσης επαληθευτεί σε μελέτες εκχύλισης λιπαρού από μικροφύκη *Nannochloropsis* (Long & Abdelkader, 2011), ασταξανθίνης από *Phaffiarhodozyma* (Yin, Yang, Liu, & Yan, 2013) και ελαίου από σπόρους σησαμιού (Uddin et al., 2013). Η χρήση ισοπροπανόλης μπορεί να διανοίξει το κυτταρικό τοίχωμα, επιτρέποντας σε περισσότερο διαλύτη να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων, ενώ επίσης μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις εστερικές ομάδες των τριγλυκεριδίων σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου (Tir et al., 2012). Παρατηρήθηκε ότι δεν

υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόδοση εκχυλιζόμενου ελαίου με εξάνιο και ισοπροπανόλη. Αυτοί οι διαλύτες παρείχαν απόδοση ελαίου της τάξης των 9,80-9,98%. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα της διεργασίας της εκχύλισης είναι συνάρτηση της μοριακής συγγένειας μεταξύ διαλύτη και διαλυτής ουσίας. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτεύχθηκε με τα μίγματα ισοπροπανόλης: εξανίου ως διαλύτες εκχύλισης. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τις μελέτες των Chen & Bergman (2005), Xie et al. (2017) και Tir et al. (2012).

Μεταξύ των μιγμάτων διαλυτών που εξετάστηκαν στην εκχύλιση, η υψηλότερη ανάκτηση ελαίου από τον ελαιοπυρήνα επιτεύχθηκε με το μίγμα Η:Ι=3:2 (13,70%). Η συγκεκριμένη αναλογία των δύο διαλυτών επιτρέπει στους διαλύτες να διεισδύσουν στις διπλοστοιβάδες της κυτταρικής μεμβράνης και να εκχυλίσουν ένα ευρύ φάσμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των φωσφολιπιδίων, των λιπαρών οξέων, των στεροειδών, και ακόμη και μερικών πρωτεϊνών (Tir et al., 2012.). Όπως έχει αναφερθεί από τους Ryckebosch et al. (2014), τους Tir et al. (2012) και τους Li et al. (2004) σε πειράματα εκχύλισης ελαίου από τη βιομάζα του άλγους *Nannochloropsis gaditana*, από σπόρους σησαμιού και σόγιας, αντίστοιχα, το μίγμα διαλυτών Η:Ι σε αναλογία 3:2 έδειξε επίσης την καλύτερη απόδοση μεταξύ των άλλων συστημάτων διαλυτών που δοκιμάστηκαν. Πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ακόμη πλεονέκτημα της εκχύλισης με μίγμα εξανίου/ισοπροπανόλης είναι οι ελάχιστες ποσότητες γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων (<3%) στο εκχυλισμένο έλαιο διευκολύνοντας το μετέπειτα εξευγενισμό του (Ryckebosch et al., 2014, Uddin et al., 2013).

Το ασαπωνοποίητο υλικό των εκχυλιζόμενων ελαίων με διάφορα συστήματα διαλυτών κυμάνθηκε από 3,68 έως 4,92% του ελαίου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 23. Παρατηρήθηκε ότι το σύστημα διαλυτών που περιέχει ισοπροπανόλη τείνει να εξαγάγει περισσότερα ασαπωνοποίητα συστατικά από ότι το εξάνιο. Η αύξηση της πολικότητας του διαλύτη εκχύλισης επιταχύνει την διάρρηξη των δεσμών των λιπιδίων με τις κυτταρικές μεμβράνες ή με τις λιποπρωτεΐνες (Tir et al., 2012). Η χρήση της ισοπροπανόλης και του μίγματος Η:Ι=3:2 ως διαλύτες εκχύλισης συνεισέφερε σε μεγαλύτερο ασαπωνοποίητο υλικό στο έλαιο που κυμάνθηκε από 4,88 έως 4,92%, αντίστοιχα.

Πίνακας 23. Απόδοση σε έλαιο και ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου (USM) % από ελαιοπυρήνα που εκχυλίζεται με διαφορετικά συστήματα διαλυτών

Σύστημα διαλυτών	Απόδοση σε έλαιο (%)	Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)
H	9,80±0,10 ^e	3,68±0,10 ^c
H:I=9:1	10,35±0,08 ^d	3,81±0,17 ^c
H:I=4:1	11,75±0,14 ^c	4,18±0,07 ^b
H:I=3:1	13,05±0,05 ^b	4,34±0,01 ^b
H:I=3:2	13,70±0,10 ^a	4,92±0,08 ^a
I	9,98±0,22 ^{de}	4,88±0,07 ^a

Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c, d, e) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.1.2.2 Περιεχόμενο στερολών και σκουαλένιου του εκχυλιζόμενου ελαίου

Οι κύριες στερόλες που βρέθηκαν σε όλα τα εκχυλιζόμενα έλαια ήταν η β-σιτοστερόλη (κατά μέσο όρο το 70% του συνόλου των προσδιοριζόμενων στερολών), και ακολούθησαν η καμπεστερόλη, η στιγμαστερόλη και η ερυθροδιόλη, ενώ η χοληστερόλη και η εργοστερόλη ανιχνεύτηκαν μόνο σε σχετικά μικρές ποσότητες (Σχήμα 48). Οι αλκοόλες έχουν την τάση να εκχυλίζουν περισσότερες ενώσεις του ασαπωνοποίητου κλάσματος των ελαίων που δεν μπορούν να ανακτηθούν με το εξάνιο, λόγω της μεγαλύτερης πολικότητάς τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική μοριακή δομή της ισοπροπανόλης. Η διαλυτοποίηση μπορεί να ευνοηθεί περισσότερο μεταξύ της ισοπροπανόλης και του μορίου των στερολών παρά με το εξάνιο, επιτρέποντας έτσι την υψηλότερη συνολικά εκχύλιση των στερολών (Πίνακας 24). Ως εκ τούτου, το έλαιο που παρελήφθη με εξάνιο περιείχε μικρότερο περιεχόμενο σε ολικές στερόλες και ακολούθησαν τα έλαια με τα συστήματα διαλυτών: H:I=9:1, H:I=4:1, H:I=3:1, H:I=3:2 και ισοπροπανόλη. Το προφίλ του κλάσματος των στερολών των πυρηνέλαιων που εκχυλίστηκαν με τους διάφορους διαλύτες ήταν παρόμοιο και σύμφωνο με αυτό που αναφέρεται σε προηγούμενες εργασίες, ενώ οι συγκεντρώσεις παρουσίασαν διαφοροποιήσεις (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012, Ghanbari, Anwar, Alkharfy, & Gilani, 2012).

Η ισοπροπανόλη και το εξάνιο εκχύλισε έλαια που εμφάνισαν την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε β-σιτοστερόλη, συγκεκριμένα 1,501 και 0,911 mg/g, αντίστοιχα.

Η υψηλή συγκέντρωση β-σιτοστερόλης βρίσκεται σε συμφωνία με εκείνη που αναφέρεται για το ελαιόλαδο (1,03-2,01 mg/g) (Boskou, 2009). Οι συγκεντρώσεις της στιγμαστερόλης, της χοληστερόλης και της εργοστερόλης ήταν παρόμοιες σε όλα τα έλαια που παρελήφθησαν. Η συγκέντρωση της καμπεστερόλης που εκχυλίστηκε με την ισοπροπανόλη (0,284 mg/g) και με το μίγμα Η:Ι=3:2 (0,228 mg/g) ήταν η υψηλότερη από όλες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που ελήφθησαν με τους άλλους εξετασθέντες διαλύτες. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα έλαια που λαμβάνονται με μίγματα Η:Ι έχουν συγκεντρώσεις στερολών με τιμές ενδιάμεσες των αντίστοιχων συγκεντρώσεων των ελαίων που λαμβάνονται χωριστά με εξάνιο και ισοπροπανόλη. Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες των Tir et al. (2012) και των Ryckebosch et al. (2014), οι οποίοι εκχύλισαν έλαιο από σησάμι και από βιομάζα του άλγους *Nannochloropsis Gaditana*, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη ως συν-διαλύτη.

Όσον αφορά το σκουαλένιο, η υψηλότερη συγκέντρωσή του βρέθηκε σε έλαιο που εκχυλίστηκε με ισοπροπανόλη (5,992 mg/g), και ακολούθησαν τα έλαια που ελήφθησαν με τα μίγματα Η:Ι=3:2 (5,257 mg/g) και Η:Ι=3:1 (4,780 mg/g). Οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία που αναφέρει ότι το πυρηνέλαιο μπορεί να περιέχει 2,06-6,17 mg σκουαλένιο/g ελαίου (Sánchez-Gutiérrez, Ruiz-Méndez, Jiménez-Castellanos, & Lucero, 2017).

Πίνακας 24. Περιεκτικότητα στερολών και σκουαλένιου σε εκχυλιζόμενο πυρηνέλαιο που λαμβάνεται από από διαφορετικά συστήματα διαλυτών (mg/g ελαίου)

Στερόλες	H	H:I=9:1	H:I=4:1	H:I=3:1	H:I=3:2	I
Ερυθροδιόλη	0,103±0,003 ^d	0,120±0,008 ^a	0,144±0,004 ^c	0,160±0,006 ^{bc}	0,174±0,011 ^b	0,204±0,006 ^a
Χοληστερόλη	0,009±0,001 ^b	0,011±0,004 ^b	0,012±0,003 ^b	0,013±0,005 ^b	0,014±0,006 ^b	0,045±0,004 ^a
Καμπεστερόλη	0,158±0,005 ^d	0,179±0,011 ^{cd}	0,188±0,008 ^{cd}	0,207±0,012 ^{bc}	0,228±0,002 ^b	0,284±0,012 ^a
Στιγμαστερόλη	0,091±0,003	0,093±0,003	0,095±0,005	0,097±0,005	0,101±0,004	0,106±0,006
β-Σιτοστερόλη	0,911±0,008 ^e	0,945±0,007 ^{ed}	0,988±0,009 ^{cd}	1,019±0,010 ^c	1,121±0,028 ^b	1,501±0,010 ^a
Εργοστερόλη	0,017±0,001	0,019±0,007	0,021±0,009	0,024±0,007	0,028±0,005	0,035±0,006
Σύνολο	1,289±0,021 ^e	1,367±0,040 ^{ed}	1,458±0,043 ^{cd}	1,530±0,045 ^c	1,706±0,056 ^b	2,195±0,044 ^a
Σκουαλένιο	4,112±0,007 ^e	4,381±0,070 ^{ed}	4,585±0,115 ^{cd}	4,770±0,035 ^c	5,217±0,115 ^b	5,992±0,131 ^a

Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c, d, e, f) στην ίδια γραμμή ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.1.3 Μελέτη εκχύλισης ελαίου και βιοδραστικών συστατικών του από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους (Ultrasound Assisted-Extraction, UAE)

Η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα και η ανάκτηση του πυρηνέλαιου αλλά και των πολύτιμων βιοδραστικών συστατικών του (στερόλες, σκουαλένιο), όπως έχει αναφερθεί, πραγματοποιείται συνήθως με συμβατικές διεργασίες εκχύλισης, ενώ πρόσφατα αναπτύχθηκαν νέες εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης που παρέχουν αποτελεσματική και εκλεκτική εκχύλιση ελαίου, μειώνοντας ταυτόχρονα την υποβάθμιση των βιοδραστικών συστατικών του. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (UAE) έχει αναγνωριστεί ως μία τέτοια καινοτόμος μέθοδος που χρησιμοποιεί την ακουστική ενέργεια για την εκχύλιση των ενώσεων-στόχων από διάφορα φυτικά υλικά. Η αρχή του υπερήχων διέπεται από το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης (Minjares-Fuentes et al., 2014, Chanioti et al., 2014). Η μέθοδος UAE έχει προταθεί μεταξύ άλλων εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης λόγω πολλών πλεονεκτημάτων όπως η βελτιωμένη απόδοση και η μείωση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης, αποφεύγοντας τη θερμική υποβάθμιση των εκχυλισμάτων και διατηρώντας τη δομή και τις χημικές ιδιότητες των βιοδραστικών ενώσεων των ελαίων (Tian, Xu, Zheng, & Martin Lo, 2013).

Στην παρούσα εργασία, η εφαρμογή της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους δεν επικεντρώνεται μόνο στην παραλαβή του πυρηνέλαιου, αλλά και στην ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών του ασαπωνοποίητου υλικού του. Η απόδοση της UAE επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες (συνθήκες), όπως η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού, το μέγεθος σωματιδίων, ο χρόνος και ο διαλύτης. Όταν διάφοροι παράγοντες ή/και οι αλληλεπιδράσεις τους μπορεί να επηρεάσουν μία επιθυμητή απόκριση, η μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (RSM) θεωρείται ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της διεργασίας (Stroescu, Stoica-Guzun, Ghergu, Chira, & Jipa, 2013) και έχει βρει πολλές εφαρμογές στην εκχύλιση στερεών-υγρών τα τελευταία χρόνια (Huang, Li, Niu, Li, & Zhang, 2008, Zhang et al., 2009, Liu et al., 2009, Samaram et al., 2015).

Σκοπός αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν η βελτιστοποίηση της UAE του ελαιοπυρήνα από την άποψη της απόδοσης σε πυρηνέλαιο εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (RSM). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού και το μέγεθος των σωματιδίων είναι οι κυριότερες συνθήκες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης ελαίου από διαφορετικές πηγές (Huang et al., 2008, Zhang et al., 2009, Goula, 2013, T. Li, Qu, Zhang, & Wang, 2012, Minjares-Fuentes et al., 2014). Οι συνθήκες αυτές έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν επίσης την εκχύλιση ενδογενών βιοδραστικών ενώσεων, που ανήκουν στο ασαπωνοποίητο υλικό (USM%) και στα φαινολικά συστατικά

(TPC) του ελαίου (Rodrigues et al., 2008, Wang et al., 2013, Şahin & Şamli, 2013, Chanioti, Siamandoura, & Tzia, 2016, Ghafoor, Choi, Jeon, & Jo, 2009) καθώς και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (Huang et al., 2008, Gan & Latiff, 2011, Şahin & Şamli, 2013, Chanioti & Tzia, 2017, Ghafoor et al., 2009). Επομένως, κατά τη διάρκεια του πειράματος εκχύλισης μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης (X1), της αναλογίας στερεού/υγρού (X2) και του μεγέθους των σωματιδίων (X3) στην απόδοση σε έλαιο, καθώς και στο ποσοστό του ασαπωνοποιήτου υλικού (USM), στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου.

Τα αποτελέσματα των 17 πειραμάτων με βάση το σχεδιασμό Box-Behnken πραγματοποιήθηκαν με τυχαία σειρά και παρουσιάζονται στον Πίνακα 25.

Πίνακας 25. Σχεδιασμός Box-Behnken με τις αποκρίσεις για την απόδοση της εκχύλισης (%), το ασαπωνοποιήτο υλικό (%), τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά –TPC (mg GA/g ελαίου) και την αντιοξειδωτική ικανότητα - DPPH (mg Trolox/g ελαίου) του εκχυλιζόμενου ελαίου

A/A	Επίπεδα μεταβλητών			Αποκρίσεις					
	X ₁ (θερμοκρασία, °C)	X ₂ (S:L, g/mL)	X ₃ (Μέγεθος σωματιδίων, mm)	Απόδοση (%)	USM (%)	TPC (mg ελαίου)	GA/g	DPPH (mg ελαίου)	Trolox/g
1	-1 (40)	-1 (1:4)	0 (1)	5,18	2,83	0,165		0,168	
2	1 (60)	-1 (1:4)	0 (1)	6,68	3,50	0,193		0,185	
3	-1 (40)	1 (1:12)	0 (1)	7,53	2,92	0,179		0,178	
4	1 (60)	1 (1:12)	0 (1)	9,61	3,98	0,209		0,190	
5	-1 (40)	0 (1:8)	-1 (2)	5,50	2,52	0,144		0,162	
6	1 (60)	0 (1:8)	-1 (2)	7,82	3,13	0,197		0,177	
7	-1 (40)	0 (1:8)	1 (0,5)	9,60	3,02	0,207		0,186	
8	1 (60)	0 (1:8)	1 (0,5)	10,72	3,90	0,216		0,197	
9	0 (50)	-1 (1:4)	-1 (2)	4,16	3,35	0,158		0,168	
10	0 (50)	1 (1:12)	-1 (2)	6,72	3,88	0,184		0,175	
11	0 (50)	-1 (1:4)	1 (0,5)	7,95	4,11	0,221		0,188	
12	0 (50)	1 (1:12)	1 (0,5)	10,88	4,38	0,246		0,195	
13	0 (50)	0 (1:8)	0 (1)	8,28	3,89	0,252		0,209	
14	0 (50)	0 (1:8)	0 (1)	7,99	3,82	0,255		0,208	
15	0 (50)	0 (1:8)	0 (1)	8,13	3,87	0,262		0,210	
16	0 (50)	0 (1:8)	0 (1)	8,21	3,88	0,248		0,209	
17	0 (50)	0 (1:8)	0 (1)	7,97	3,86	0,255		0,208	

Απόδοση: Απόδοση της εκχύλισης πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)

USM: Ασαπωνοποιήτο υλικό (% ελαίου)

TPC: Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg GA/g ελαίου)

DPPH: Αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg Trolox/g ελαίου)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση της εκχύλισης σε πυρηνέλαιο κυμάνθηκε από 4,16 έως 10,88%. Η μέγιστη απόδοση βρέθηκε στις εξής πειραματικές συνθήκες: X1 = 50 °C, X2 = 1:12g/mL και X3 = 0,5 mm. Το ασαπωνοποίητο υλικό (USM) % του πυρηνέλαιου κυμάνθηκε από 2,52 έως 4,38% και το μέγιστο σημείο βρέθηκε επίσης στις συνθήκες X1 = 50 °C, X2 = 1:12 g/mL και X3 = 0,5 mm. Περαιτέρω, το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) του πυρηνέλαιου και η αντιοξειδωτική του δράση (προσδιορισμός με DPPH) κυμάνθηκε από 0,144 έως 0,262 mg GA/g ελαίου και από 0,168 έως 0,210 mg Trolox/g ελαίου, αντίστοιχα. Το πυρηνέλαιο με το υψηλότερο TPC και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση προέκυψε με εκχύλιση στις συνθήκες X1 = 50 °C, X2 = 1:8 g/mL και X3 = 0,5 mm. Το TPC του πυρηνέλαιου ήταν παρόμοιο με αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (0,207-0,210 mg GA/g ελαίου) (Cioffi et al., 2010). Ως εκ τούτου, θα πρέπει να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες διεργασίας, προκειμένου να επιτευχθεί η εκχύλιση του ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενη με υπέρηχους (UAE) που θα παρέχει τη μέγιστη απόδοση σε έλαιο, καθώς και έλαιο με το μέγιστο ποσοστό ασαπωνοποίητου υλικού (USM%) και ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC) και με τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση.

4.1.3.1 Μοντέλα προσαρμογής

Ο Πίνακας 26 παρουσιάζει τα αποτελέσματα προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων στα μοντέλα. Η ακρίβεια των μοντέλων που αναπτύχθηκαν αξιολογήθηκαν με βάση την τιμή του συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Οι τιμές R^2 ήταν 0.9964, 0.9812, 0.9986 και 0.9826 για την απόδοση σε έλαιο, το USM, το TPC και την αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου, αντίστοιχα (Πίνακας 26), υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα αντιπροσωπεύουν επαρκώς τη σχέση μεταξύ των επιλεγμένων παραμέτρων. Η σημασία των διαφορετικών όρων για κάθε συντελεστή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την τιμή F και την τιμή P. Μεγάλη τιμή F ή μικρή τιμή P αντίστοιχα συνεπάγεται σημαντική επίδραση στην αντίστοιχη μεταβλητή απόκρισης (Yolmeh, Habibi Najafi, & Farhoosh, 2014). Η συσχέτιση μεταξύ της απόδοσης σε έλαιο (Y), και του ασαπωνοποίητου υλικού (USM) %, του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC) και της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) του εκχυλιζόμενου ελαίου με τις τρεις παραμέτρους επεξεργασίας (X1, X2, X3) περιγράφηκε από τις ακόλουθες πολυωνυμικές εξισώσεις:

$$\text{Απόδοση σε έλαιο (Y)\%} = 8,12 + 0,88X_1 + 1,35X_2 + 1,87X_3 - 0,92X_2^2 + 0,24X_3^2 - 0,30X_1X_3$$

$$\text{USM\%} = 3,86 + 0,40X_1 + 0,17X_2 + 0,32X_3 - 0,67X_1^2 + 0,12X_2^2 - 0,05X_3^2 + 0,10X_1X_2 + 0,07X_1X_3 - 0,07X_2X_3$$

$$\text{TPC} = 0,254 + 0,015X_1 + 0,010X_2 + 0,026X_3 - 0,040X_1^2 - 0,0283X_2^2 - 0,024X_3^2 - 0,011X_1X_3$$

$$DPPH=0,209+0,007X1+0,004X2+0,011X3-0,015X1^2-0,014X2^2-0,014X3^2-0,001X1X2$$

Πίνακας 26. Ανάλυση διακύμανσης της επιφάνειας απόκρισης της απόδοσης της εκχύλισης σε έλαιο (%), του ασαπωνοποιήτου υλικού – USM (%), της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά –TPC (mg GA/g ελαίου) και της αντιοξειδωτικής δράσης - DPPH (mg Trolox/g ελαίου) του εκχυλιζόμενου ελαίου

Απόκριση	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας (DF)	Μέσο τετραγώνων (MS)	F-value
Απόδοση (%)^a						
Μοντέλο	8,12	0,07	52,82	9	5,87	211,89***
X1	0,88	0,06	6,16	1	6,16	336,98***
X2	1,35	0,06	14,50	1	14,50	793,17***
X3	1,87	0,06	27,94	1	27,94	1528,33***
X1 ²	0,06	0,08	0,01	1	0,01	0,78 ^{NS}
X2 ²	-0,92	0,08	3,60	1	3,60	196,76***
X3 ²	0,24	0,08	0,23	1	0,24	12,80*
X1X2	0,15	0,08	0,08	1	0,08	4,60**
X1X3	-0,30	0,08	0,36	1	0,36	19,69**
X2X3	0,09	0,08	0,03	1	0,03	1,87 ^{NS}
Υπόλοιπο			0,19	7	0,03	
Έλλειψη προσαρμογής			0,12	3	0,04	2,20 ^{NS}
Σύνολο			53,02	16		
USM (%)^b						
Μοντέλο	3,86	0,02	4,36	9	0,48	202,51***
X1	0,40	0,02	1,30	1	1,30	1775,41***
X2	0,17	0,02	0,23	1	0,23	321,39***
X3	0,32	0,02	0,80	1	0,80	1096,05***
X1 ²	-0,67	0,02	1,90	1	1,90	2604,67***
X2 ²	0,12	0,02	0,06	1	0,06	76,94***
X3 ²	-0,05	0,02	0,01	1	0,01	14,13*
X1X2	0,10	0,02	0,04	1	0,04	52,09***
X1X3	0,07	0,02	0,02	1	0,02	24,97***
X2X3	-0,07	0,02	0,02	1	0,02	23,15***
Υπόλοιπο			0,02	7	0,01	
Έλλειψη προσαρμογής			0,01	3	0,01	6,31 ^{NS}
Σύνολο			4,38	16		
TPC^c						
Μοντέλο	0,254	0,003	0,022	9	0,002	43,857***
X1	0,015	0,003	0,002	1	0,002	68,441***
X2	0,010	0,003	0,001	1	0,001	31,184***
X3	0,026	0,003	0,005	1	0,005	203,655***
X1 ²	-0,040	0,004	0,007	1	0,007	250,739***
X2 ²	-0,028	0,004	0,003	1	0,003	128,446***

X3 ²	-0,024	0,004	0,002	1	0,002	90,875***
X1X2	0,001	0,004	0,000	1	0,000	0,038 ^{NS}
X1X3	-0,011	0,004	0,001	1	0,001	18,403**
X2X3	-0,001	0,004	0,000	1	0,000	0,010 ^{NS}
Υπόλοιπο			0,001	7	0,001	
Έλλειψη			0,000	3	0,000	3,653 ^{NS}
προσαρμογής						
Σύνολο			0,023	16		
<hr/>						
DRPH ^d						
Μοντέλο	0,209	0,001	0,004	9	0,001	534,282***
X1	0,007	0,000	0,000	1	0,000	540,179***
X2	0,004	0,000	0,000	1	0,000	150,179***
X3	0,011	0,000	0,001	1	0,001	1260,000***
X1 ²	-0,015	0,001	0,001	1	0,001	1313,086***
X2 ²	-0,014	0,001	0,001	1	0,001	1141,357***
X3 ²	-0,014	0,001	0,001	1	0,001	1100,305***
X1X2	-0,001	0,001	0,000	1	0,000	8,929*
X1X3	-0,001	0,001	0,000	1	0,000	5,714 ^{NS}
X2X3	0,000	0,001	0,000	1	0,000	0,000 ^{NS}
Υπόλοιπο			0,000	7	0,000	
Έλλειψη			0,000	3	0,000	1,548 ^{NS}
προσαρμογής						
Σύνολο			0,004	16		

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, NS – Μη σημαντικό

^a Ο συντελεστής προσαρμογής του μοντέλου (R²) ήταν 0,9964.

^b Ο συντελεστής προσαρμογής του μοντέλου (R²) ήταν 0,9812.

^c Ο συντελεστής προσαρμογής του μοντέλου (R²) ήταν 0,9826.

^d Ο συντελεστής προσαρμογής του μοντέλου (R²) ήταν 0,9986.

4.1.3.1.1 Απόδοση εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους

Οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης σε πυρηνέλαιο ήταν οι γραμμικοί όροι θερμοκρασίας (X1), της αναλογίας στερεού/υγρού (X2) και του μεγέθους σωματιδίων (X3), και ακολούθως ο τετραγωνικός όρος της αναλογίας στερεού/υγρού (X2²). Ο τετραγωνικός όρος του μεγέθους σωματιδίων (X3²) και οι όροι της αλληλεπίδρασης της θερμοκρασίας και του μεγέθους των σωματιδίων (X1X3) ήταν επίσης σημαντικοί (P<0,05). Αντίθετα, ο τετραγωνικός όρος της θερμοκρασίας (X1²) και η αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας και της αναλογίας στερεού: υγρού (X1X2) καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους σωματιδίων (X2X3) δεν συνέβαλαν σημαντικά στην απόδοση της υποβοηθούμενης εκχύλισης με υπέρηχους σε πυρηνέλαιο. Η τιμή F του μοντέλου 211,88 και η χαμηλή τιμή σημαντικότητας (P<0,0001) υποδηλώνουν ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Η έλλειψη προσαρμογής των στοιχείων (lack of fit) 0,23 ήταν μη-σημαντική που δείχνει ότι το αναπτυγμένο μοντέλο ήταν επαρκές για την πρόβλεψη της απόκρισης.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες. Οι Stroescu et al. (2013) ανέφεραν ότι η θερμοκρασία και η αναλογία στερεού/υγρού είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοση ελαίου από τους σπόρους *P. Oleracea*, ενώ η Goula (2013) και οι Li et al. (2012) απέδειξαν ότι η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού αλλά και το μέγεθος των σωματιδίων επηρέασαν σημαντικά την απόδοση σε έλαιο που εξήχθη με υπέρηχους από σπόρους του ροδιού και του φυτού *Isatis indigotica Fort*, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι Mani, Jaya, & Vadivambal (2003) παρατήρησαν ότι το μέγεθος των σωματιδίων είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοση ελαίου που εξήχθη από τους σπόρους *Moringa oleifera* χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη, ενώ η αλληλεπίδραση του μεγέθους σωματιδίων και της θερμοκρασίας εκχύλισης ήταν επίσης σημαντική. Ωστόσο, οι Kostić et al. (2013) ανέφεραν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ θερμοκρασίας και αναλογίας στερεού/υγρού καθώς και η θερμοκρασία και η αναλογία στερεού/υγρού είχαν σημαντική επίδραση στην απόδοση σε έλαιο από σπόρους κάνναβης.

4.1.3.1.2 Ασαπωνοποίητο υλικό (USM) % ελαίου

Όπως προέκυψε από το μοντέλο (Πίνακας 26), ο τετραγωνικός και ο γραμμικός όρος της θερμοκρασίας (X_1 , X_1^2), ο γραμμικός και τετραγωνικός όρος της αναλογίας στερεού/υγρού (X_2 , X_2^2) και ο γραμμικός όρος του μεγέθους σωματιδίων (X_3) έδωσαν τη μεγαλύτερη επίδραση στο ασαπωνοποίητο υλικό του ελαίου ($P < 0,0001$) και ακολούθως ο όρος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 και ο τετραγωνικός όρος του μεγέθους σωματιδίων (X_3^2). Η τιμή F του μοντέλου 202,51 και η χαμηλή τιμή σημαντικότητας ($P < 0,0001$) υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι επίσης σημαντικό. Η έλλειψη προσαρμογής των στοιχείων (lack of fit) 0,054 ήταν μη-σημαντική.

4.1.3.1.3 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) ελαίου

Όπως προέκυψε από το μοντέλο (Πίνακας 26), το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου επηρεάζεται κυρίως από τον τετραγωνικό όρο της θερμοκρασίας (X_1^2) και το γραμμικό όρο του μεγέθους σωματιδίων (X_3) και ακολούθως από τους τετραγωνικούς όρους της αναλογίας στερεού/υγρού (X_2^2) και του μεγέθους των σωματιδίων (X_3^2), τους γραμμικούς όρους της θερμοκρασίας (X_1) και της αναλογίας στερεού/υγρού (X_2) και της αλληλεπίδρασης τους X_1X_3 . Ωστόσο, οι όροι των αλληλεπιδράσεων X_1X_2 και X_2X_3 δεν ήταν σημαντικοί. Η τιμή F του μοντέλου 43,86 και η χαμηλή τιμή σημαντικότητας ($P < 0,0001$) υποδηλώνουν ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Η έλλειψη προσαρμογής των στοιχείων (lack of fit) 0,121 δεν ήταν σημαντική. Παρόμοια τάση έχει αναφερθεί και σε άλλες εργασίες. Οι Sahin & Samli (2013), οι Wang et al. (2013) και οι Cacace & Mazza (2003) ανέφεραν ότι η αναλογία στερεού/υγρού ήταν η σημαντικότερη παράμετρος που επηρεάζει το TPC των εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς, από το φυτό *Sparganii*

rhizome και από μαύρα φραγκοστάφυλα, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι Rodrigues et al. (2008) παρατήρησαν ότι η μεγαλύτερη επίδραση στο TPC των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από κελύφη καρύδας προάγεται όχι μόνο από την αναλογία στερεού/υγρού αλλά και από τη θερμοκρασία της εκχύλισης.

4.1.3.1.4 Αντιοξειδωτική δράση (DPPH) ελαίου

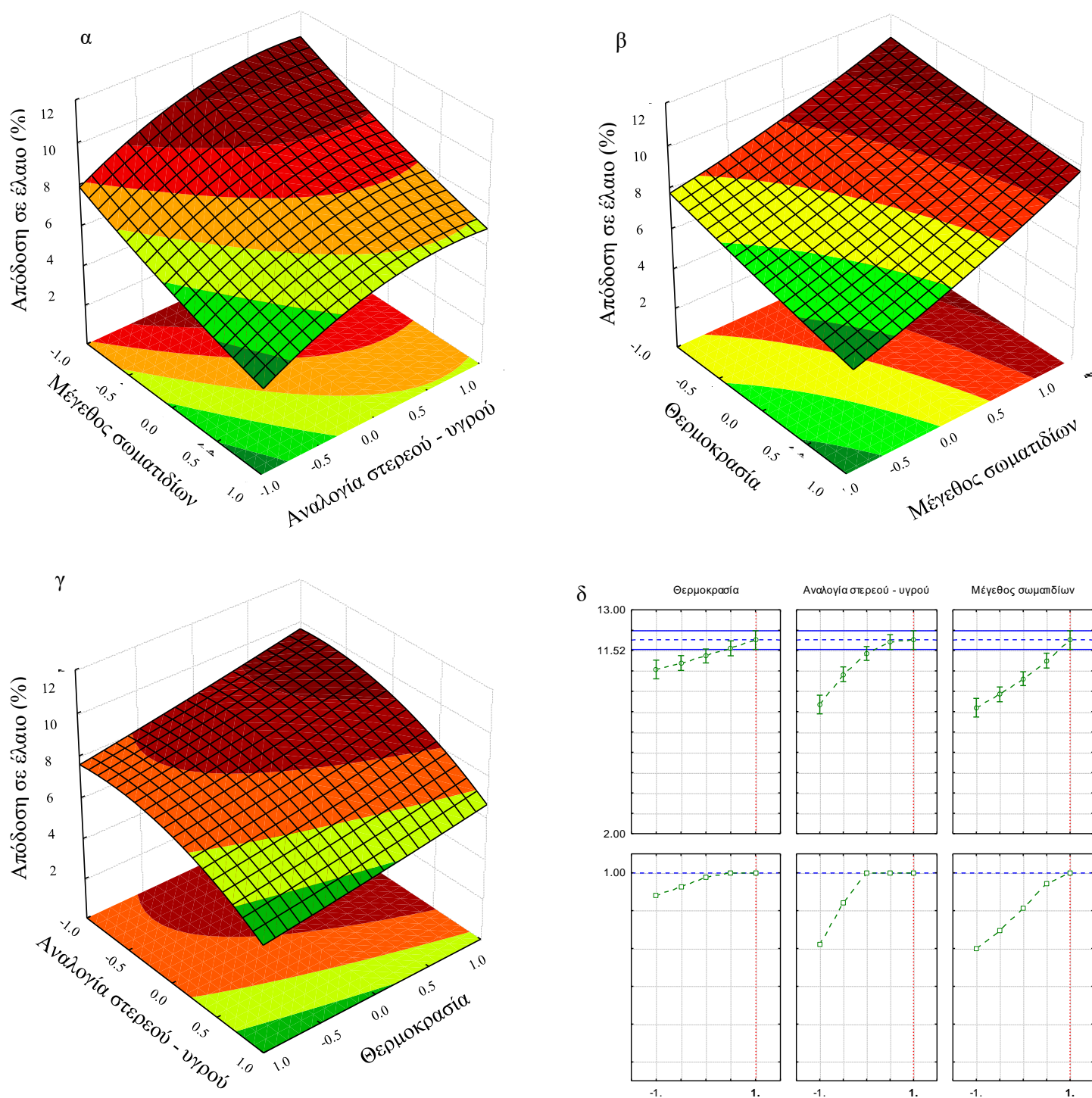
Η κυρίαρχη επίδραση στο μοντέλο που αναπτύχθηκε για την αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου αντιστοιχεί στον τετραγωνικό όρο της θερμοκρασίας ($X1^2$), στο γραμμικό και τετραγωνικό όρο του μεγέθους σωματιδίων ($X3$, $X3^2$) και στον τετραγωνικό όρο της αναλογίας στερεού/υγρού ($X2^2$) ($P < 0,0001$). Περαιτέρω, ο γραμμικός όρος της αναλογίας στερεού/υγρού ($X2$) και του μεγέθους σωματιδίων ($X3$), αλλά και ο όρος της αλληλεπίδρασης μεταξύ θερμοκρασίας και αναλογίας στερεού/υγρού ($X1X2$) βρέθηκαν επίσης σημαντικοί ($P < 0,05$). Ωστόσο, οι όροι των αλληλεπιδράσεων $X1X3$ και $X2X3$ δεν ήταν σημαντικοί. Η τιμή F του μοντέλου 534.28 και η χαμηλή τιμή σημαντικότητας ($P < 0,0001$) υποδηλώνουν ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Η έλλειψη προσαρμογής των στοιχείων (lack of fit) 0,333 δεν ήταν σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις μελέτες των Gan & Latiff (2011) και των Ghafoor et al. (2009), όπου αναφέρεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από κολοκυθόσπορους και σπόρους σταφυλιών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία εκχύλισης. Επιπλέον, οι Sahin & Samli (2013) παρατήρησαν ότι η αναλογία στερεού/υγρού ήταν επίσης σημαντική παράμετρος για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από φύλλα ελιάς.

4.1.3.2 Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας

Η σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων και των εξαρτημένων μεταβλητών απεικονίστηκε σε 3D γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δημιουργήθηκαν από το μοντέλο για την απόδοση της εκχύλισης σε έλαιο και για το USM, το TPC και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων (Σχήμα 51). Αυτά τα γραφήματα προέκυψαν απεικονίζοντας δύο μεταβλητές εντός πειραματικού εύρους και διατηρώντας την τρίτη μεταβλητή σταθερή σε μηδενικό επίπεδο.

4.1.3.2.1 Απόδοση εκχύλισης ελαίου από ελαιοπυρήνα υποβοηθούμενης με υπέρηχους

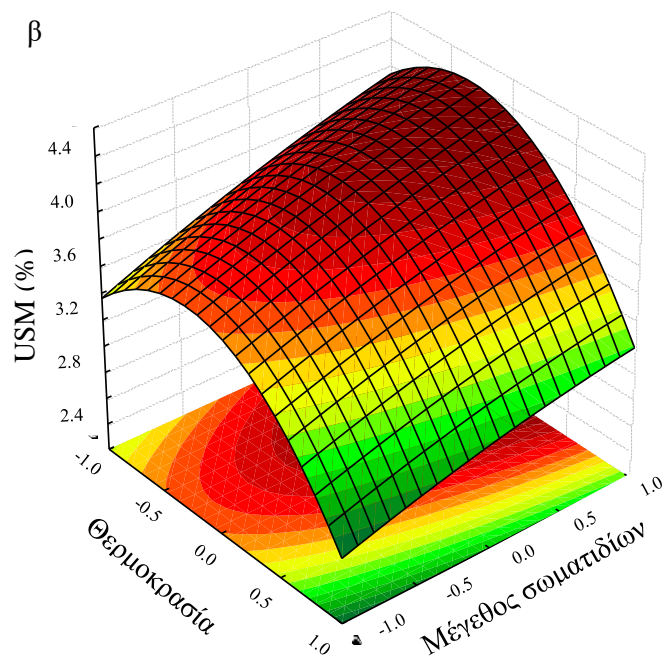
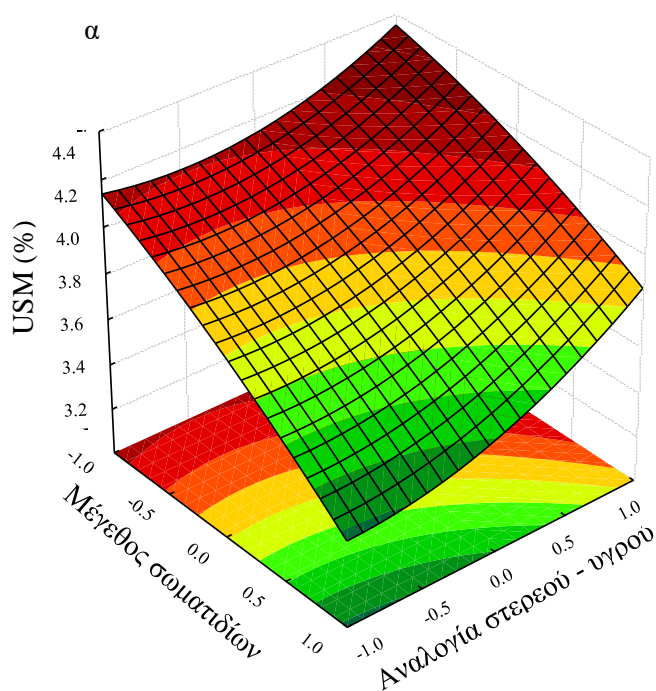
Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, τα προβλεπόμενα μοντέλα παρουσιάζονται στο Σχήμα 51 ως 3D απεικονίσεις. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 51α, η αύξηση της θερμοκρασίας από 40 σε 60 °C (για ελαιοπυρήνα κοκκομετρίας 0,5 mm) οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης από ~ 8% σε ~ 11%. Περαιτέρω, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του ελαιοπυρήνα από 2 σε 0,5 mm (στους 60 °C) οδήγησε επίσης σε σημαντική αύξηση της απόδοσης από ~ 6 σε ~ 11%. Αυτό συμφωνεί με τις μελέτες των Mani et al. (2007) και των Minjares-Fuentes et al. (2014), όπου αναφέρεται επίσης ότι αυξάνοντας τη θερμοκρασία της εκχύλισης, η απόδοση σε έλαιο από τους σπόρους *Moringa oleifera* και πηκτίνης από παραπροϊόντα σταφυλιού μεγιστοποιείται. Υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας ευνοούν τη διαλυτότητα του ελαίου στο διαλύτη, αυξάνοντας το ρυθμό διάχυσής του στο διαλύτη και οδηγώντας σε υψηλότερο ρυθμό μεταφοράς μάζας (Sulaiman et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, με χρήση αναλογίας στερεού/υγρού σε 1:12 g/mL και θερμοκρασίας εκχύλισης 50 °C, η μείωση του μεγέθους σωματιδίων του ελαιοπυρήνα από 2 σε 0,5 mm προκάλεσε αύξηση της απόδοσης από ~7 έως ~11% (Σχήμα 51β). Μικρότερο μέγεθος σωματιδίων σημαίνει μικρότερη απόσταση μεταφοράς μάζας και μεγαλύτερη επιφάνεια. Παρόμοιες παρατηρήσεις αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές (Mani et al. 2007, Goula 2013, Li et al. 2012). Μειώνοντας το μέγεθος των σωματιδίων των στερεών, αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που εκτίθενται άμεσα σε υπερηχητική σπηλαίωση κατά τη διάρκεια της διεργασίας εκχύλισης, διευκολύνοντας τη διείσδυση του διαλύτη, με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε έλαιο. Επιπλέον, όταν εκχυλίζεται ελαιοπυρήνας με μέγεθος σωματιδίων 1 mm, θερμοκρασία 60 °C και μεταβαλλόμενη αναλογία στερεού/υγρού από 1:4 έως 1:12 g/mL, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται μέχρι το 10% (Σχήμα 51γ). Η βαθμίδα συγκέντρωσης, η οποία είναι η κινητήρια δύναμη στη διαδικασία εκχύλισης, είναι υψηλότερη όταν μειώνεται η αναλογία στερεού προς διαλύτη, οδηγώντας σε υψηλότερη διάχυση και μεγαλύτερη απόδοση (Sahin, & Salmi 2013). Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί για την εκχύλιση με υπέρηχους και από άλλες πηγές (Goula 2013, Li et al. 2012).

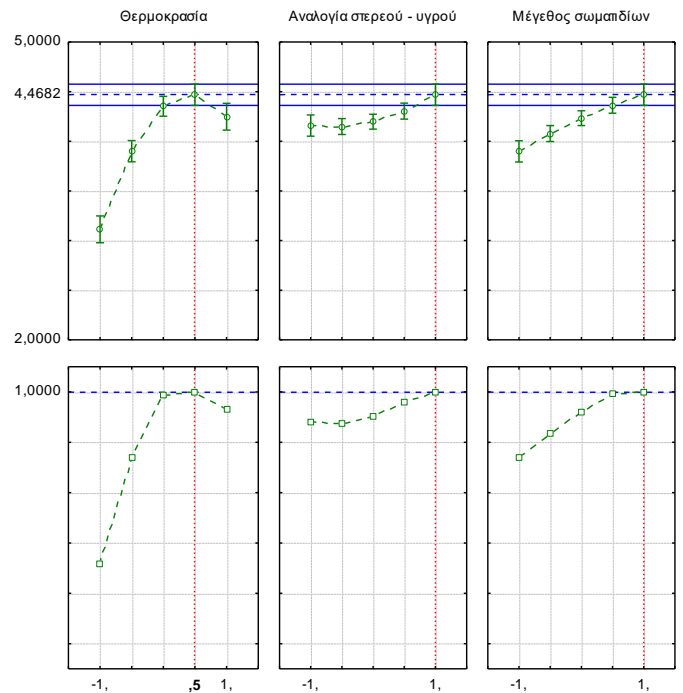
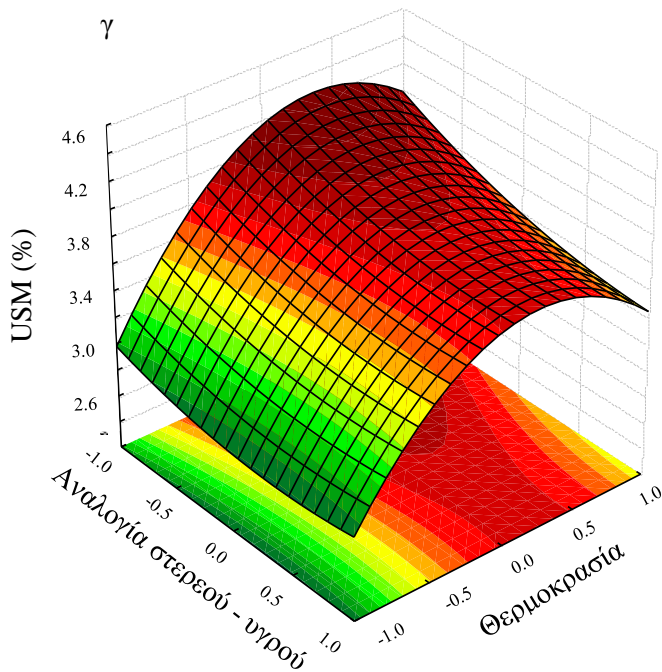


Σχήμα 51. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στην απόδοση της εκχύλισης του πυρηγέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της απόδοσης της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη απόδοση εκχύλισης ελαίου

4.1.3.2.2 Ασαπωνοποίητο υλικό (USM) % ελαίου

Τα γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που παριστάνουν τις επιδράσεις της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο USM% του πυρηνέλαιου εμφανίζονται στο Σχήμα 52. Το Σχήμα 52α δείχνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού/υγρού στο USM% σε σταθερό μέγεθος σωματιδίων 1 mm. Σε μία ορισμένη θερμοκρασία εκχύλισης, το USM% αυξήθηκε ελαφρά με αύξηση της αναλογίας στερεού/υγρού και έφτασε σε ένα μέγιστο στη χαμηλότερη αναλογία στερεού/υγρού που εξετάστηκε. Ωστόσο, η θερμοκρασία εκχύλισης έδειξε σαφώς μία τετραγωνική επίδραση στο USM% και η μέγιστη τιμή του προέκυψε στους 55 °C. Περαιτέρω, η γραμμική επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων στο USM% είναι σαφής στα Σχήματα 52β και 52γ, καθώς η ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του ελαιοπυρήνα αντανακλάται από την αύξηση του USM% ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλογία στερεού/υγρού (Σχήμα 52β) και τη θερμοκρασία που δοκιμάστηκε (Σχήμα 52γ). Το Σχήμα 52γ δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του μεγέθους των σωματιδίων στο USM % για μία σταθερή αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL. Το τετραγωνικό αποτέλεσμα της θερμοκρασίας ήταν καθαρό και το USM% έφτασε επίσης στην υψηλότερη τιμή στους 55 °C.





Σχήμα 52. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο ασαπωνοποίητο υλικό (USM%) του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού: υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές του ασαπωνοποίητου υλικού του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστο ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)

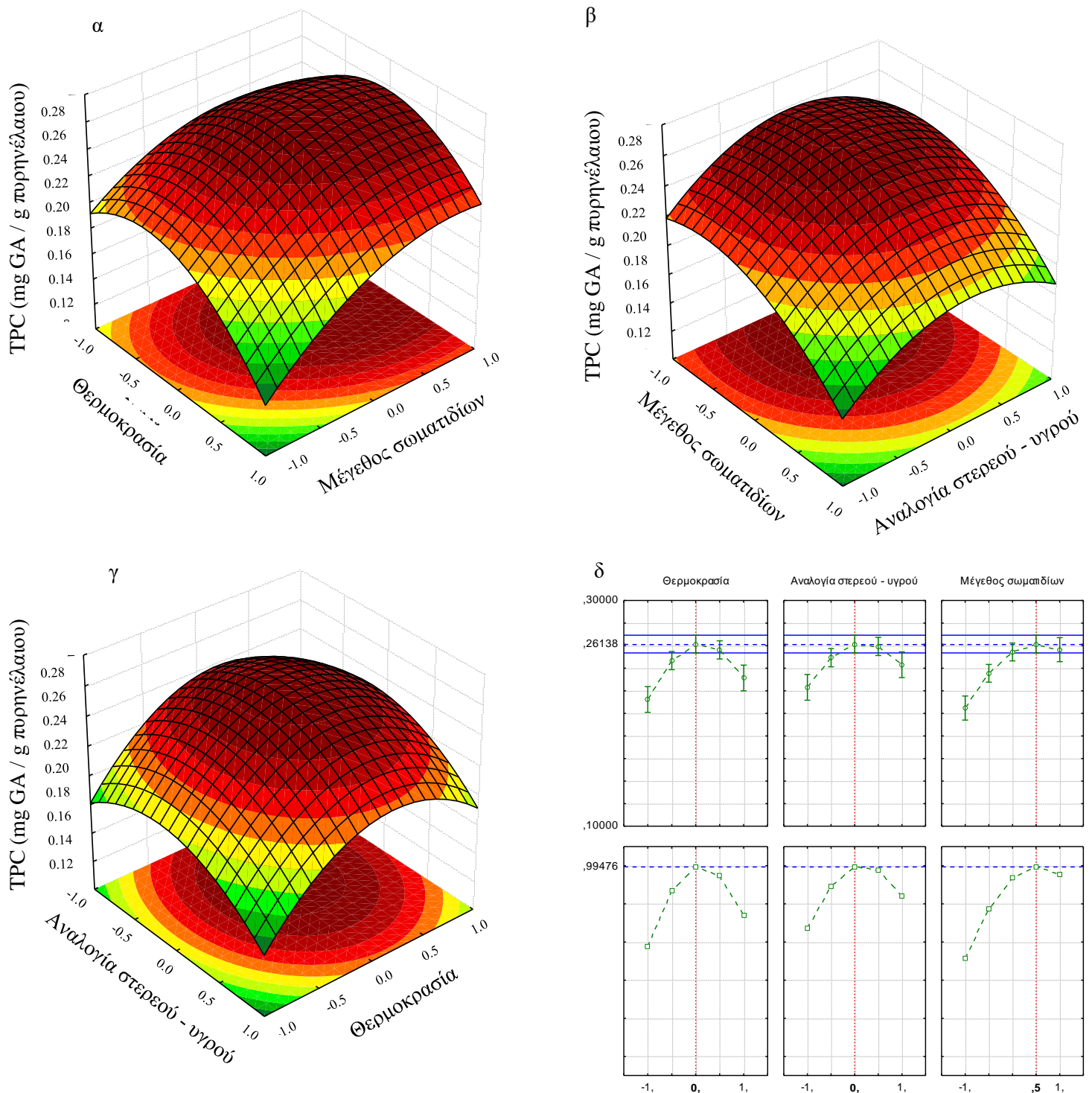
4.1.3.2.3 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) ελαίου

Τα 3D διαγράμματα που αντιστοιχούν στις επιδράσεις της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο TPC του πυρηνέλαιου εμφανίζονται στο Σχήμα 53. Η επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού/υγρού στο TPC σε σταθερό μέγεθος σωματιδίου 1 mm φαίνεται στο Σχήμα 53α. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το TPC είχε ένα μέγιστο σημείο (0,262 mg GA/g ελαίου) που προέκυψε εντός του εύρους της αναλογίας στερεού/υγρού από 1:6 έως 1:10 g/mL και σε θερμοκρασιακή περιοχή εκχύλισης από 45 έως 55 °C. Ομοίως, οι Aludatt et al. (2010) ανέφεραν σημαντική αύξηση του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC) και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από ελαιοπυρήνα, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από 25 σε 70 °C, επιβεβαιώνοντας ότι η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης. Οι Ghafoor et al. (2009) επίσης παρατήρησαν σημαντική αύξηση των ολικών φαινολών από σπόρους σταφυλιών, όταν η θερμοκρασία εκχύλισης αυξήθηκε από

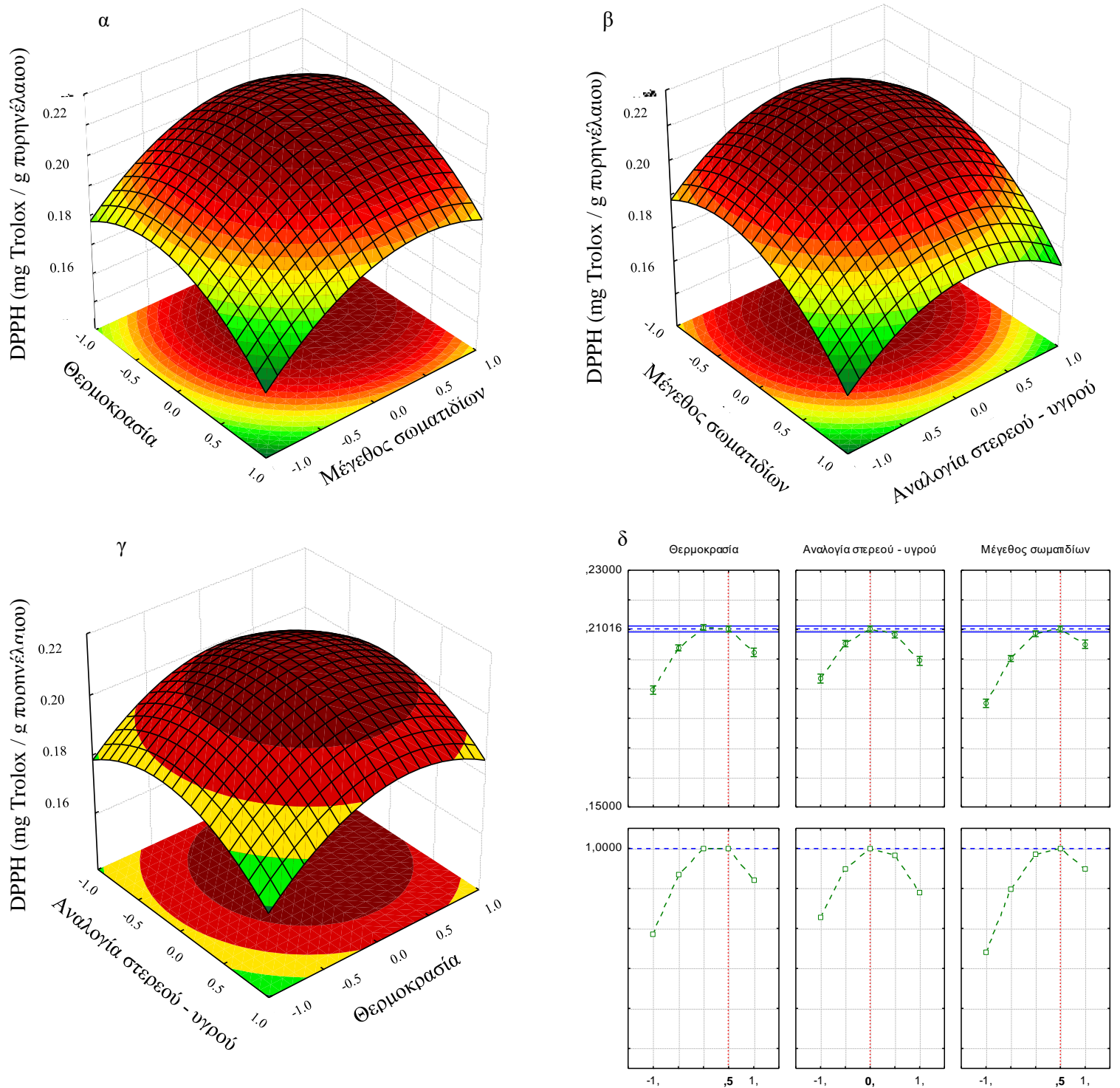
33 σε 67 °C. Περαιτέρω, οι Wang et al. (2013) ανέφεραν ότι οι τιμές του TPC των εκχυλισμάτων από το φυτό *Sparganii rhizome* με υπέρηχους, αυξήθηκαν με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού από 1:10 σε 1:30 g/mL, συμπεραίνοντας ότι με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού, μεγαλύτερος όγκος διαλύτη διαπερνά τα κύτταρα, ενώ συγχρόνως περισσότερες φαινολικές ενώσεις διαχέονται μέσα στο διαλύτη. Από την άλλη πλευρά, η επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων και της αναλογίας στερεού/υγρού φαίνεται στο Σχήμα 53β για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης 50 °C. Η τιμή TPC αυξήθηκε με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και της αναλογίας στερεού/υγρού και η μέγιστη τιμή προέκυψε με μέγεθος σωματιδίων 0,9 mm και αναλογία 1:8 g/mL. Το Σχήμα 53γ δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του μεγέθους των σωματιδίων στο TPC για σταθερή αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL. Η θερμοκρασία εκχύλισης είχε τετραγωνική καθαρή επίδραση στο TPC που έφθασε στην υψηλότερη τιμή στους 50 °C, ενώ το TPC αυξανόταν με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων.

4.1.3.2.4 Αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του ελαίου

Τα 3D διαγράμματα που αντιστοιχούν στις επιδράσεις της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στην αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου εμφανίζονται στο Σχήμα 53. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο Σχήμα 53α, η αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου (DPPH) είχε ένα μέγιστο σημείο και συμβαδίζει με το αποτέλεσμα που προκύπτει για το TPC του πυρηνέλαιου. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (~0,21 mg Trolox/g ελαίου) επιτεύχθηκε με την αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL και σε θερμοκρασία εκχύλισης 55 °C. Ομοίως, οι Gan & Latiff (2011) παρατήρησαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από 50 σε 80 °C, αύξησε την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων από παραπροϊόντα μάνγκο. Η επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων και της αναλογίας στερεού/υγρού στην αντιοξειδωτική δράση για σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης 50 °C φαίνεται στο Σχήμα 53β. Το μέγεθος σωματιδίων και η αναλογία στερεού/υγρού έδειξαν σαφώς μία τετραγωνική αλληλεπίδραση στην αντιοξειδωτική δράση και η μέγιστη τιμή προέκυψε για αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL και μέγεθος σωματιδίων 0,9 mm. Το Σχήμα 53γ δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του μεγέθους των σωματιδίων στην αντιοξειδωτική δράση για σταθερή αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL. Η αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου αυξήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης και με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αντίστοιχα. Η μέγιστη τιμή προέκυψε στους 55 °C και για μέγεθος σωματιδίων 0,9 mm.



Σχήμα 53. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στο συνολικό περιεχόμενο φαιολικών συστατικών (TPC) του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές του συνολικού περιεχόμενου φαιολικών συστατικών του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστο TPC του ελαίου



Σχήμα 54. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας στερεού/υγρού και του μεγέθους των σωματιδίων στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πυρηνέλαιου με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι μεγέθους σωματιδίων (αναλογία στερεού/υγρού=1:8 g/mL) (β) μέγεθος σωματιδίων έναντι αναλογίας στερεού/υγρού (θερμοκρασία=50 °C) (γ) αναλογία στερεού/υγρού έναντι θερμοκρασίας (μέγεθος σωματιδίων=1 mm.) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης του πυρηνέλαιου και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη αντιοξειδωτική δράση του ελαίου

4.1.3.3 Αριστοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης για την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους του πυρηνέλαιου

Στα Σχήματα 51δ, 52δ, 53δ και 54δ απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα επιθυμητά επίπεδα των παραμέτρων της εκχύλισης, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε έλαιο, USM%, TPC και DPPH του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου. Παρατηρείται ότι η μέγιστη επιθυμητή απόδοση σε έλαιο (11,22%) επιτεύχθηκε με θερμοκρασία εκχύλισης 60 °C, αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL και μέγεθος σωματιδίων 0,5 mm (Σχήμα 51δ). Πρέπει να σημειωθεί ότι η επιτυχία υψηλότερων απόδοσεων σε έλαιο από τον ελαιοπυρήνα σε υψηλότερες θερμοκρασίες εκχύλισης έχει περιορισμένη βιομηχανική εφαρμογή, επειδή η βιοδραστικότητα του πυρηνέλαιου μπορεί να μεταβληθεί. Περαιτέρω, το USM% αριστοποιήθηκε στο 4,50% με βελτιστοποιημένες μεταβλητές θερμοκρασίας 55 °C, αναλογίας στερεού/υγρού 1:12 g/mL και μεγέθους σωματιδίων 0,5 mm (Σχήμα 51δ). Η βέλτιστη τιμή του TPC του πυρηνέλαιου ήταν 0,261 mg GA/g ελαίου που μπορεί να επιτευχθεί όταν εκχυλίζεται ελαιοπυρήνας στους 50 °C, με αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL και μέγεθος σωματιδίων 0,9 mm (Σχήμα 51δ). Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο Σχήμα 51δ, η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του πυρηνέλαιου αριστοποιήθηκε στα 0,211 mg Trolox/g ελαίου που μπορεί να επιτευχθεί σε θερμοκρασία εκχύλισης 55 °C, με αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL και μέγεθος σωματιδίων 0,9 mm. Το TPC και η αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου μειώθηκαν σημαντικά, όταν η αναλογία στερεού/υγρού υπερέβη το 1:8 g/mL. Συνιστάται να χρησιμοποιείται η ελάχιστη δυνατή ποσότητα διαλύτη για λόγους κόστους, διαχείρισης και ευκολίας διαχωρισμού από το τελικό προϊόν. Τέλος, για επικύρωση των προβλεπόμενων μεταβλητών, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας τις αριστοποιημένες παραμέτρους για κάθε μεμονωμένη απόκριση. Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται επίσης στα επίπεδα μεταβλητών που αριστοποιούνται για κάθε απόκριση, οι τιμές για τις υπόλοιπες αποκρίσεις που προέκυψαν είτε από το μοντέλο ή πειραματικά. Οι πειραματικές τιμές δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις προβλεπόμενες, υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν ήταν αξιόπιστα και επαρκή στις προβλέψεις τους και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αριστοποίηση της εκχύλισης του πυρηνέλαιου υποβοηθούμενης με υπέρηχους.

Πίνακας 27. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών

Μεταβλητές της διεργασίας			Προβλεπόμενες τιμές				Πειραματικές τιμές ^a			
X1 (°C)	X2 (g/mL)	X3 (mm)	Απόδοση (%)	USM (%)	TPC (mg GA/g ελαίου)	DPPH (mg Trolox/g ελαίου)	Απόδοση (%)	USM (%)	TPC (mg GA/g ελαίου)	DPPH (mg Trolox/g ελαίου)
60	1:12	0,5	11,22	4,25	0,202	0,187	11,01± 0,17	4,09 ± 0,09	0,211 ± 0,001	0,194 ± 0,015
55	1:12	0,5	10,95	4,50	0,230	0,195	10,84± 0,12	4,51 ± 0,13	0,237 ± 0,007	0,203 ± 0,005
50	1:8	0,9	9,12	4,01	0,261	0,210	8,98 ± 0,11	3,89 ± 0,12	0,255 ± 0,021	0,209 ± 0,007
55	1:8	0,9	9,48	4,06	0,256	0,211	9,34 ± 0,04	3,99 ± 0,06	0,248 ± 0,012	0,223 ± 0,017

Απόδοση: Απόδοση της εκχύλισης πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)

USM: Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)

TPC: Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg GA/g ελαίου)

DPPH: Αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg Trolox/g ελαίου)

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση

4.1.3.4 Σύγκριση της UAE και της SE για την ανάκτηση πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους, οι βέλτιστες συνθήκες της UAE συγκρίθηκαν με τη συμβατική εκχύλιση Soxhlet (SE) και με χρήση εξάνιου, ισοπροπανόλης και του μίγματος H:I=3:2 ως διαλύτη εκχύλισης (συνθήκες εκχύλισης: αναλογία στερεού/υγρού 1:8 g/mL, θερμοκρασία ~78 °C, χρόνος 8 h, μέγεθος σωματιδίων 1 mm) όσον αφορά την απόδοση εκχύλισης σε πυρηνέλαιο και το USM%, το TPC και την αντιοξειδωτική δράση των ανακτώμενων πυρηνέλαιων. Επίσης, δοκιμάστηκε και ο συνδυασμός της χρήσης του μίγματος H:I=3:2 και της εφαρμογής των υπερήχων στις καλύτερες συνθήκες (T=50-60 °C, S:L=1:12 g/mL, t=1 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 28.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις δύο διαφορετικές μεθόδους, βρέθηκε ότι η απόδοση ελαίου και το ασαπωνοποίητο υλικό του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου που ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες με χρήση υπερήχων και διαλύτες είτε εξάνιο είτε το μίγμα H:I=3:2 έφθασε περίπου το 82% της αντίστοιχης απόδοσης ελαίου και το 92% του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού με τη μέθοδο SE και διαλύτη το μίγμα H:I=3:2. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το εκχυλιζόμενο πυρηνέλαιο που ελήφθη με χρήση υπερήχων εμφάνισε μεγαλύτερο περιεχόμενο ολικών φαινολικών συστατικών (κατά 5,5%) και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (κατά 8%)

από εκείνο που ελήφθη με τη μέθοδο SE και διαλύτη το μίγμα H:I=3:2. Πρέπει να σημειωθεί ότι το βέλτιστο αποτέλεσμα από την εκχύλιση με υπέρηχους ελήφθη σε μειωμένο χρόνο εκχύλισης (1 h), θερμοκρασία (60 °C) και αναλογία υγρού/στερεού (1:12 g/mL), ενώ το αντίστοιχο αποτέλεσμα με τη μέθοδο SE που ελήφθη σε 8 h, στους 78 °C και αναλογία 1:8 g/mL. Το πυρηνέλαιο υπό τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με υπέρηχους και με χρήση είτε εξάνιου είτε του μίγματος H:I=3:2 εμφάνισε υψηλότερη ποιότητα όσον αφορά το ασαπωνοποίητο υλικό, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση από την αντίστοιχη με τη μέθοδο Soxhlet (SE) και διαλύτη εξάνιο, ενώ παράλληλα παρουσίασε περισσότερα φαινολικά συστατικά και παρόμοια αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλιζόμενα πυρηνέλαια με τη μέθοδο Soxhlet (SE) και διαλύτη ισοπροπανόλη ή το μίγμα H:I=3:2. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η θερμική ευαισθησία των βιοδραστικών ενώσεων συνέβαλε επίσης στην αντιοξειδωτική δράση του πυρηνέλαιου, είναι προφανές ότι αυτές οι ενώσεις μπορεί να έχουν υποβαθμιστεί με τη μέθοδο Soxhlet λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και του μεγάλου χρόνου εκχύλισης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος της εκχύλισης με υπέρηχους παρέχει χαμηλότερη θερμοκρασία λειτουργίας, επομένως δεν υπάρχει θερμική υποβάθμιση πολλών μη σταθερών μικρο-συστατικών, και μικρότερο χρόνο εκχύλισης που οδηγεί στην εξοικονόμηση ενέργειας και την επίτευξη πυρηνέλαιων τόσο με υψηλή αντιοξειδωτική δράση όσο και πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις.

Πίνακας 28. Σύγκριση της UAE και της SE

Μέθοδος εκχύλισης	Σύστημα διαλυτών	Απόδοση (%)	USM (%)	TPC (mg GA/g ελαίου)	DPPH (mg Trolox/g ελαίου)
UAE	Εξάνιο	11,01 ± 0,17 ^b	4,51 ± 0,13 ^b	0,255 ± 0,021 ^a	0,223 ± 0,017 ^a
UAE	H:I 3:2	11,25±0,03 ^b	4,48±0,04 ^b	0,251± 0,004 ^a	0,218±0,006 ^a
SE	Εξάνιο	9,80 ± 0,10 ^c	3,68 ± 0,10 ^c	0,207 ± 0,009 ^c	0,189 ± 0,010 ^c
SE	Ισοπροπανόλη	9,98±0,22 ^c	4,88±0,07 ^a	0,230±0,007 ^b	0,201±0,007 ^b
SE	H:I 3:2	13,70±0,10 ^a	4,92±0,08 ^a	0,241±0,005 ^{ab}	0,205 ± 0,010 ^b

Απόδοση: Απόδοση της εκχύλισης πυρηνέλαιου από ελαιοπυρήνα (% ελαιοπυρήνα ξ.β.)

USM: Ασαπωνοποίητο υλικό (% ελαίου)

TPC: Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg GA/g ελαίου)

DPPH: Αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου (mg Trolox/g ελαίου)

SE: Εκχύλιση με συσκευή Soxhlet

UAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.1.4 Αριστοποίηση της εκχύλισης των στερολών και του σκουαλενίου υποβοηθούμενης με υπέρηχους

Στην παρούσα ενότητα θα παρουσιαστεί η αριστοποίηση της ανάκτησης των στερολών και του σκουαλενίου που αποτελούν τα κύρια συστατικά του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαίου. Η επίδραση των παραμέτρων εκχύλισης, όπως η θερμοκρασία και η αναλογία στερεού/υγρού στην ανάκτηση των κυριότερων στερολών, όπως η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη και η στιγμαστερόλη, καθώς και του σκουαλενίου έχει μεγάλη σημασία. Ως εκ τούτου, εφαρμόστηκε ένας σχεδιασμός Box-Behnken δύο επιπέδων για την αριστοποίηση των συνθηκών της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους, προκειμένου να ληφθεί η μέγιστη ανάκτηση σε στερόλες και σκουαλένιο από τον ελαιοπυρήνα. Οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές που ορίστηκαν ήταν η θερμοκρασία εκχύλισης (X1, με εύρος 40-60 °C) και η αναλογία στερεού/υγρού (X2, με εύρος 1:4-1:12 g/mL) και κάθε μεταβλητή ρυθμίστηκε και στα δύο επίπεδα. Δημιουργήθηκαν συνολικά 10 πειράματα. Η ακρίβεια του πολυωνυμικού μοντέλου ελέγχεται από το συντελεστή προσδιορισμού, R².

Οι συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων αλλά και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 29. Παρατηρείται ότι η β-σιτοστερόλη του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου επηρεάζεται κυρίως από τους γραμμικούς όρους της θερμοκρασίας (X1) και της αναλογίας στερεού/υγρού (X2) και ακολούθως από τον τετραγωνικό όρο της θερμοκρασίας (X1²). Επιπλέον, οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στην καμπεστερόλη ήταν οι γραμμικοί όροι της θερμοκρασίας (X1) και της αναλογίας στερεού/υγρού (X2), και ακολούθως η αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας και της αναλογίας στερεού/υγρού (X1X2). Η κυρίαρχη επίδραση στο μοντέλο που αναπτύχθηκε για τη στιγμαστερόλη του εκχυλιζόμενου πυρηνέλαιου καθορίστηκε επίσης από τον τετραγωνικό όρο της θερμοκρασίας (X1²), το γραμμικό όρο της αναλογίας στερεού/υγρού (X2), και ακολούθως από το γραμμικό όρο της θερμοκρασίας (X1). Όσον αφορά το σκουαλένιο, επηρεάστηκε κυρίως από το γραμμικό όρο της θερμοκρασίας (X1), και ακολούθως από το γραμμικό όρο της αναλογίας στερεού/υγρού (X2). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θερμοκρασία εκχύλισης και η αναλογία στερεού/υγρού είχαν μεγάλη επίδραση στην ανάκτηση τόσο των στερολών όσο και του σκουαλενίου με τη χρήση υπερήχων. Οι υψηλές τιμές των F και οι χαμηλές τιμές σημαντικότητας (P<0,0001) υποδηλώνουν ότι τα μοντέλα είναι σημαντικά. Η συσχέτιση μεταξύ της ανάκτησης της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης, της στιγμαστερόλης, και του σκουαλενίου με τις δύο παραμέτρους επεξεργασίας (X1, X2) περιγράφηκε από τις ακόλουθες πολυωνυμικές εξίσωσεις:

$$\beta\text{-Σιτοστερόλη}=1,148+0,149X1+0,163X2-0,058X1^2$$

$$\text{Καμπεστερόλη}=0,211+0,023X1+0,019X2-0,022X1X2-0,015X1^2-0,010X2^2$$

$$\text{Στιγμαστερόλη}=0,093+0,009X1+0,018X2-0,022X1^2$$

$$\text{Σκουαλένιο}=4,161+0,366X1+0,169X2$$

Οι τιμές R² ήταν 0,992, 0,989, 0,986 και 0,987 για τη β-σιτοστερόλη, την καμπεστερόλη, τη στιγμαστερόλη, και το σκουαλένιο των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων, αντίστοιχα (Πίνακας 29), υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα αντιπροσωπεύουν επαρκώς τη σχέση μεταξύ των επιλεγμένων παραμέτρων.

Πίνακας 29. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών των μοντέλων για τη β-σιτοστερόλη, την καμπεστερόλη, τη στιγμαστερόλη, και το σκουαλένιο των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων

	β-Σιτοστερόλη		Καμπεστερόλη		Στιγμαστερόλη		Σκουαλένιο	
Συντελεστές παλινδρόμησης των μοντέλων								
	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a
Μοντέλο	1,148	0,016	0,211	0,006	0,093	0,004	4,161	0,034
X1	0,149	0,011	0,023	0,004	0,009	0,002	0,366	0,023
X2	0,163	0,011	0,019	0,004	0,018	0,004	0,169	0,037
X1 ²	-0,058	0,018	-0,015	0,006	-0,022	0,004	-0,089	0,023
X2 ²	-0,001	0,018	-0,010	0,006	-0,005	0,004	-0,043	0,037
X1X2	-0,004	0,014	-0,022	0,005	0,004	0,003	-0,015	0,029

^a COEFF: Συντελεστές, SE: Τυπικό σφάλμα

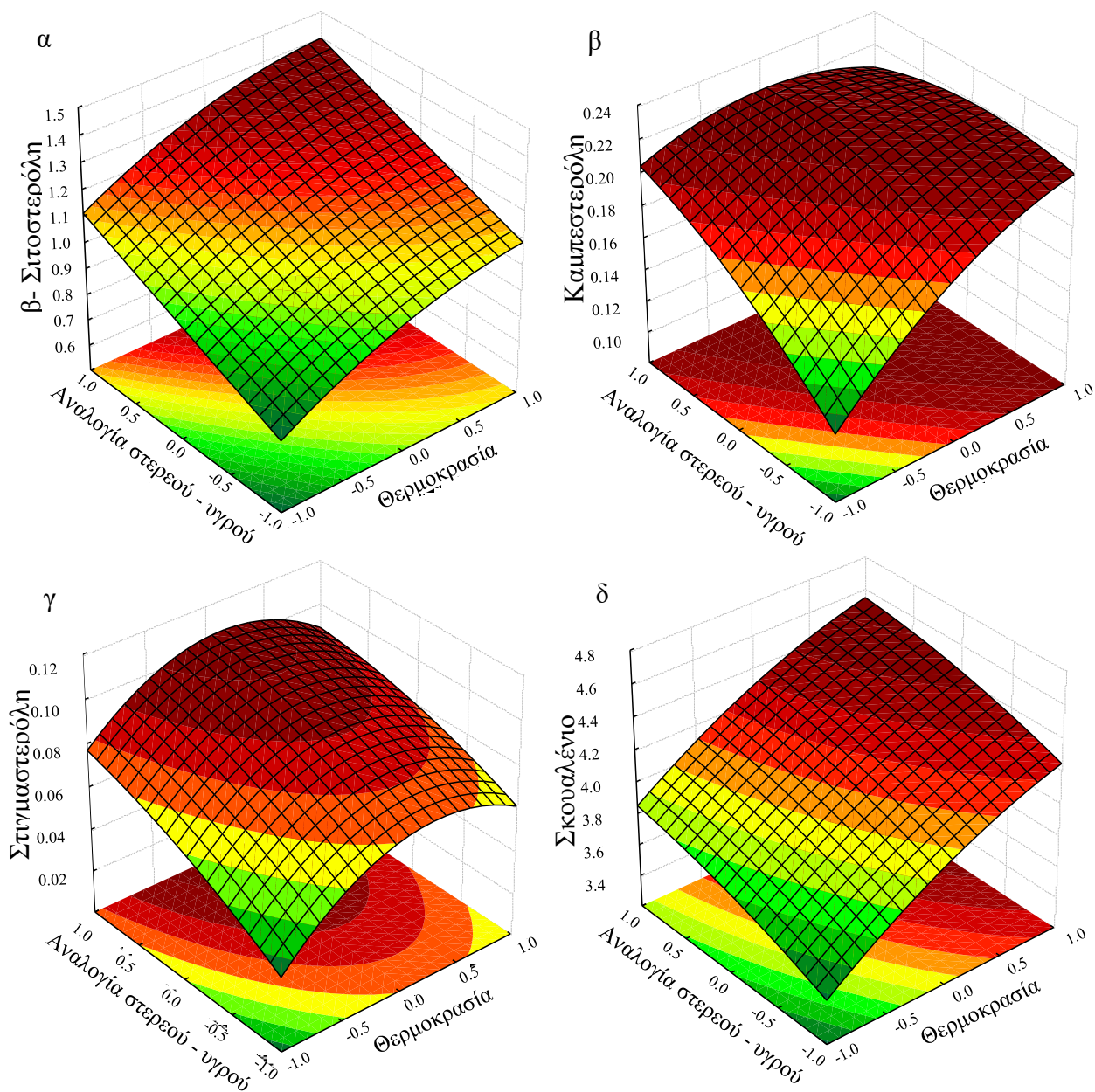
Πίνακας 30. Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για την επιφάνεια απόκρισης της β-σιτοστερόλης, της καμπεστερόλης, της στιγμαστερόλης και του σκουαλένιου των εκχυλιζόμενων πυρηνέλαιων

	β-Σιτοστερόλη		Καμπεστερόλη		Στιγμαστερόλη		Σκουαλένιο	
Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)								
	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value
Μοντέλο	0,302	81,29***	0,007	18,53***	0,004	19,42***	0,996	61,35***
X1	0,133	179,27***	0,003	36,25***	0,001	14,32*	0,802	246,84***
X2	0,008	215,86*	0,002	25,02***	0,002	48,58***	0,171	52,52***
X1 ²	0,160	10,67***	0,000	16,47*	0,001	31,63***	0,019	5,72 ^{NS}
X2 ²	0,000	0,00 ^{NS}	0,000	12,66*	0,000	1,33 ^{NS}	0,004	1,35 ^{NS}
X1X2	0,000	0,11 ^{NS}	0,002	22,25***	0,000	1,30 ^{NS}	0,000	0,30 ^{NS}
Υπόλοιπο	0,003		0,001		0,000		0,018	
Σύνολο	0,305		0,008		0,004		1,014	

^b SS: Άθροισμα τετραγώνων

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, NS – Μη σημαντικό

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα βέλτιστα επίπεδα των μεταβλητών για την ανάκτηση των στερολών και του σκουαλενίου από τον ελαιοπυρήνα με χρήση υπερήχων, δημιουργήθηκαν 3D γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας από το μοντέλο που αντιστοιχεί στις παραπάνω εξισώσεις (Σχήμα 55). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 55α, χρησιμοποιώντας αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL, η αύξηση της θερμοκρασίας από 40 σε 60 °C προκάλεσε αύξηση της περιεκτικότητας σε β-σιτοστερόλη από 1,080 έως 1,418 mg/g. Περαιτέρω, με την εφαρμογή θερμοκρασίας 40 °C, η μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού από 1:4 σε 1:12 g/mL, προάγει την περιεκτικότητα σε β-σιτοστερόλη από ~0,750 έως ~1,106 mg/g. Το Σχήμα 55β δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού/υγρού στην ανάκτηση της καμπεστερόλης. Η περιεκτικότητα σε καμπεστερόλη αυξήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας και της αναλογίας στερεού/υγρού και έφτασε σχεδόν σε ένα μέγιστο στη χαμηλότερη θερμοκρασία και αναλογία στερεού/υγρού, αντίστοιχα. Η μέγιστη περιεκτικότητα καμπεστερόλης (0,220 mg/g) προέκυψε όταν η αναλογία στερεού/υγρού κυμάνθηκε από 1:8 έως 1:10 g/mL και η θερμοκρασία εκχύλισης από 50 έως 60 °C. Το Σχήμα 55γ δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού/υγρού στην ανάκτηση της στιγμαστερόλης. Η θερμοκρασία εκχύλισης είχε τετραγωνική επίδραση στην περιεκτικότητα της στιγμαστερόλης που έφθασε στην υψηλότερη τιμή στους 50 °C, ενώ η στιγμαστερόλη αυξανόταν με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού. Η μέγιστη περιεκτικότητα στιγμαστερόλης (~0,100 mg/g) επιτεύχθηκε με αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL και θερμοκρασία εκχύλισης 55 °C. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 55δ, η αύξηση της θερμοκρασίας από 40 σε 60 °C προκάλεσε την αύξηση της περιεκτικότητας του σκουαλενίου από ~3,466 σε ~4,590 mg/g. Παρομοίως, με μείωση της αναλογίας στερεού/υγρού από 1:4 σε 1:12 και εφαρμόζοντας θερμοκρασία 40 °C, η περιεκτικότητα σε σκουαλένιο αυξήθηκε στα ~3,880 mg/g.



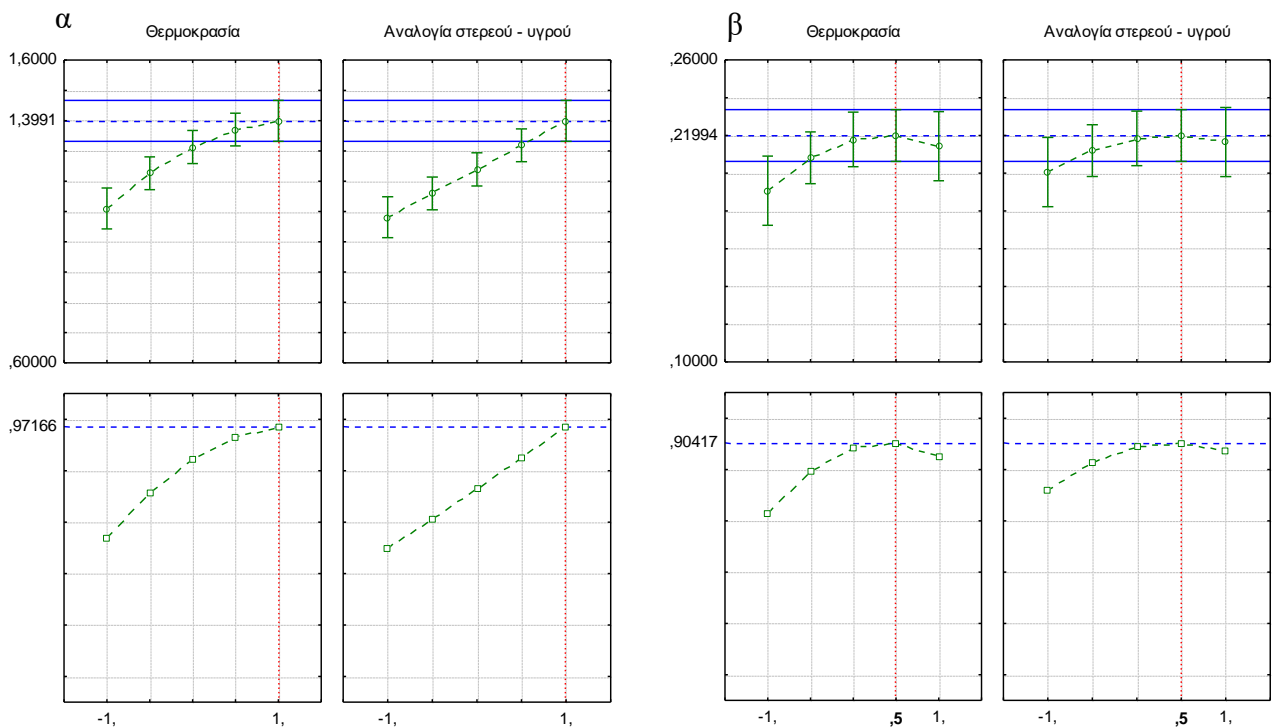
Μη κωδικοποιημένες και κωδικοποιημένες μεταβλητές του σχεδιασμού RSM:

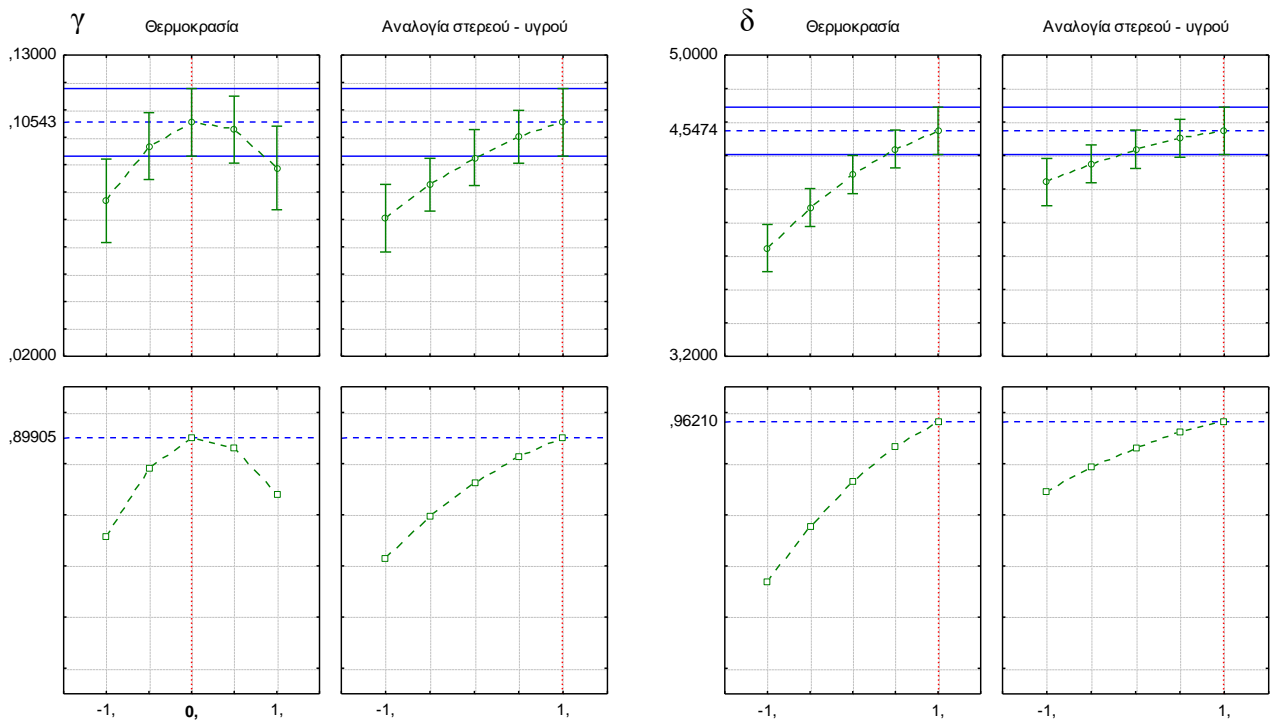
Θερμοκρασία (°C): 40 (-1), 50(0), 60 (1)

Αναλογία στερεού - υγρού (g/mL): 1:4 (-1), 1:8 (0), 1:12 (1)

Σχήμα 55. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας για την ανάκτηση της β-Σιτοστερόλης (α), της καμπεστερόλης (β), της στιγμαστερόλης (γ) και του σκουαλένιου (δ) που επηρεάζονται από τη θερμοκρασία της εκχύλισης και την αναλογία στερεού/υγρού

Στο Σχήμα 56 απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα επιθυμητά επίπεδα των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και σκουαλένιο στα εκχυλιζόμενα πυρηνέλαια. Η μέγιστη περιεκτικότητα β-σιτοστερόλης ήταν 1,399 mg/g και επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία 60 °C και αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL. Η μέγιστη περιεκτικότητα της καμπεστερόλης ήταν 0,220 mg/g που προέκυψε με εκχύλιση στους 55 °C με αναλογία στερεού/υγρού 1:10 g/mL. Η μέγιστη περιεκτικότητα στιγμαστερόλης ήταν 0,105 mg/g, η οποία προέκυψε σε θερμοκρασία εκχύλισης 50 °C και με αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL. Περαιτέρω, για το σκουαλένιο η μέγιστη περιεκτικότητα 4,575 mg/g επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία εκχύλισης 60 °C και με αναλογία στερεού/υγρού 1:12 g/mL.





Σχήμα 56. Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε β-σιτοστερόλη (α), καμπεστερόλη (β), στιγμαστερόλη (γ) και σκουαλένιο (δ) στα εκχυλιζόμενα πυρηνέλαια

Τέλος, για επικύρωση των προβλεπόμενων μεταβλητών, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας τις αριστοποιημένες παραμέτρους για κάθε μεμονωμένη απόκριση. Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται επίσης στα επίπεδα μεταβλητών που αριστοποιούνται για κάθε απόκριση, και οι τιμές για τις υπόλοιπες αποκρίσεις που προέκυψαν είτε από το μοντέλο είτε πειραματικά. Οι πειραματικές τιμές δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές από τις προβλεπόμενες, υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν ήταν επαρκή στις προβλέψεις τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αριστοποίηση της εκχύλισης με χρήση υπερήχων του πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου σε β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και σκουαλένιο, αντίστοιχα.

Πίνακας 31. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών

Μεταβλητές της διεργασίας		Προβλεπόμενες τιμές				Πειραματικές τιμές ^a			
X1 (°C)	X2 (g/mL)	β-Σιτοστερόλη	Καμπεστερόλη	Στιγμαστερόλη	Σκουαλένιο	β-Σιτοστερόλη	Καμπεστερόλη	Στιγμαστερόλη	Σκουαλένιο
60	1:12	1,402	0,201	0,098	4,696	1,349±0,040	0,199±0,010	0,090±0,006	4,476±0,116
55	1:12	1,289	0,221	0,101	4,428	1,274±0,022	0,222±0,040	0,098±0,010	4,376±0,047
50	1:12	1,311	0,215	0,111	4,330	1,315±0,015	0,214±0,005	0,112±0,004	4,283±0,084

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

4.1.2.3 Σύγκριση των UAE και της SE για την ανάκτηση των στερολών και του σκουαλένιου

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου σε στερόλες και σκουαλένιο, τα καλύτερα αποτελέσματα που παρελήφθησαν με την εκχύλιση με υπέρηχους συγκρίθηκαν με αυτά με εκχύλιση Soxhlet (SE) και με χρήση εξανίου, ισοπροπανόλης και του μίγματος H:I=3:2, που εμφάνισαν υψηλή απόδοση σχετικά με την ανάκτηση αυτών των βιοδραστικών μικρο-συστατικών των ελαίων. Επίσης, δοκιμάστηκε και ο συνδυασμός της χρήσης του μίγματος H:I=3:2 και της εφαρμογής των υπερήχων στις καλύτερες συνθήκες (T=50-60 °C, S:L=1/12 g/mL, t=1 h). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 32. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους εκχύλισης, βρέθηκε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση της β-σιτοστερόλης ελήφθη με τη μέθοδο SE και με ισοπροπανόλη ως διαλύτη. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκέντρωση της β-σιτοστερόλης που ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες της UAE είτε με εξάνιο είτε με το μίγμα H:I=3:2 ως διαλύτη, ήταν υψηλότερη από αυτή που λαμβάνεται με τη μέθοδο SE και χρήση εξανίου ή του μίγματος H:I=3:2 ως διαλύτη και μάλιστα έφθασε στο 89,8% και 90,4%, αντίστοιχα, της συγκέντρωσης που ελήφθη με τη μέθοδο SE χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη ως διαλύτη. Περαιτέρω, η υψηλότερη συγκέντρωση σε καμπεστερόλη βρέθηκε στο έλαιο που εκχυλίστηκε με τη μέθοδο SE με ισοπροπανόλη, ενώ με το μίγμα H:I=3:2 ως διαλύτη, το λαμβανόμενο έλαιο είχε συγκέντρωση καμπεστερόλης περίπου ίση με την αντίστοιχη από την εκχύλιση με υπέρηχους. Επιπλέον, η μέγιστη συγκέντρωση καμπεστερόλης βρέθηκε στα έλαια που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο SE και χρήση ισοπροπανόλης και μίγματος H:I=3:2. Η συγκέντρωση του ελαίου σε στιγμαστερόλη που λαμβάνεται με εκχύλιση με υπέρηχους ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με εκείνη στα έλαια που λαμβάνονται με τη μέθοδο SE χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη. Όσον αφορά το σκουαλένιο, η συγκέντρωσή του στα εκχυλιζόμενα έλαια μειώνεται

κατά την ακόλουθη σειρά: SE-ισοπροπανόλη>SE-H:I=3:2>UAE-εξάνιο≈UAE-H:I=3:2>SE-εξάνιο. Συνολικά, το πυρηνέλαιο που λαμβάνεται με τη μέθοδο SE και ισοπροπανόλη ως διαλύτη έδειξε την υψηλότερη συγκέντρωση σε β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και σκουαλένιο σε σχέση με το έλαιο που λαμβάνεται με τη μέθοδο SE και εξάνιο ως διαλύτη και σχεδόν την ίδια συγκέντρωση με αυτό με το μίγμα H:I=3:2. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα που παρουσιάζονται για τη μέθοδο της εκχύλισης με υπέρηχους έχουν παραληφθεί σε μειωμένο χρόνο εκχύλισης (1 h) και σε μικρότερη θερμοκρασία (50-60 °C), ενώ τα αντίστοιχα αποτελέσματα με τη μέθοδο SE ελήφθησαν σε 8 h, και σε θερμοκρασία περίπου 78 °C. Η μέθοδος Soxhlet λειτουργεί σε υψηλή θερμοκρασία και μεγάλους χρόνους εκχύλισης, συνθήκες που μπορεί να προκαλέσουν υποβάθμιση των βιοδραστικών ενώσεων, ενώ η μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους χρησιμοποιεί χαμηλότερη θερμοκρασία λειτουργίας και σύντομο χρονικό διάστημα εκχύλισης και συνεπώς αποδείχθηκε ως πιο αποτελεσματική για την ανάκτηση ευαίσθητων βιοδραστικών μικρο-συστατικών των ελαίων, οδηγώντας σε εμπλουτισμένα με βιοδραστικές ενώσεις πυρηνέλαια.

Πίνακας 32. Σύγκριση των περιεχόμενων στερολών και του σκουαλένιου που λαμβάνονται με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και συστήματα διαλυτών

Μέθοδος εκχύλισης	Σύστημα διαλυτών	Βιοδραστικά συστατικά (mg/g ελαίου)			
		β-Σιτοστερόλη	Καμπεστερόλη	Στιγμαστερόλη	Σκουαλένιο
SE	Εξάνιο	0,911±0,008 ^d	0,158±0,005 ^c	0,091±0,003 ^b	4,112±0,007 ^d
SE	Ισοπροπανόλη	1,501±0,010 ^a	0,284±0,012 ^a	0,106±0,006 ^{ab}	5,992±0,131 ^a
SE	H:I 3:2	1,121±0,028 ^c	0,228±0,002 ^b	0,101±0,004 ^{ab}	5,217±0,115 ^b
UAE	Εξάνιο	1,349±0,040 ^b	0,202±0,040 ^b	0,112±0,004 ^a	4,474±0,116 ^c
UAE	H:I 3:2	1,358 0,010 ^b	0,208±0,008 ^b	0,115±0,009 ^a	4,594±0,026 ^c

SE: Εκχύλιση με συσκευή Soxhlet

UAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους

Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c, d) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.2 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα

4.2.1 Συμβατική εκχύλιση (CE)

4.2.1.1 Επίδραση του είδους του οργανικού διαλύτη και της συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη σε νερό (% v/v)

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία των φαινολικών ενώσεων και τη χρήση τους ως υλικά υψηλής προστιθέμενης αξίας με δυνητικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα, ο οποίος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, περιέχει περίπου το 98% των φαινολικών ενώσεων του ελαιόκαρπου, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μέχρι στιγμής, οι συμβατικές διεργασίες εκχύλισης έχουν εφαρμοστεί για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από φυτικές πηγές απαιτώντας μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών και μεγάλους χρόνους εκχύλισης (Yao et al., 2015, Cvjetko Bubalo, Ćurko, Tomašević, Kovačević Ganić, & Radojčić Redonniković, 2016). Σε αυτή την πειραματική ενότητα εξετάστηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη και η ακετόνη σε διάφορες συγκεντρώσεις τους σε νερό (50, 70 και 90 % v/v) και πραγματοποιήθηκε αριστοποίηση της διεργασίας ως προς το είδος του διαλύτη και τη συγκέντρωσή του σε νερό. Η επίδραση αυτών των παραμέτρων εκχύλισης στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, στην αντιοξειδωτική δράση και στα κυριότερα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων με HPLC–DAD, αξιολογήθηκε. Ως εκ τούτου, εφαρμόστηκε ένας σχεδιασμός Box-Behnken δύο επιπέδων για την αριστοποίηση των συνθηκών της συμβατικής εκχύλισης και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές που ορίστηκαν ήταν η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη σε νερό (X1, με εύρος 50-90% v/v) και ο διαλύτης (X2, με εύρος ακετόνη < αιθανόλη < μεθανόλη με βάση την πολικότητα) και κάθε μεταβλητή ρυθμίστηκε και σε δύο επίπεδα. Δημιουργήθηκαν συνολικά 10 πειράματα. Η ακρίβεια του πολυωνυμικού μοντέλου ελέγχεται από το συντελεστή προσδιορισμού, R^2 .

Οι συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών του μοντέλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 33. Παρατηρείται ότι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται κυρίως από τους γραμμικούς όρους της συγκέντρωσης (X1) και του είδους του διαλύτη (X2), ακολούθως από τους αντίστοιχους τετραγωνικούς όρους (X1² και X2²). Επιπλέον, οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στη συγκέντρωση σε ελευρωπαΐνη των εκχυλισμάτων ήταν οι τετραγωνικοί όροι της συγκέντρωσης (X1²) και του είδους του διαλύτη (X2²). Η κυρίαρχη επίδραση στο μοντέλο που αναπτύχθηκε για τη συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων

φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων καθορίστηκε επίσης από το γραμμικό όρο του είδους του διαλύτη (X2) και τους τετραγωνικούς όρους της συγκέντρωσης (X1²) και του είδους του διαλύτη (X2²). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση και το είδος του διαλύτη είχαν μεγάλη επίδραση στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και στην ανάκτηση των επιμέρους φαινολικών συστατικών. Οι υψηλές τιμές των F και οι χαμηλές τιμές σημαντικότητας (P<0,0001) υποδηλώνουν ότι τα μοντέλα είναι σημαντικά. Η συσχέτιση μεταξύ της ανάκτησης του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC), της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και της ανάκτησης των επιμέρους κύριων φαινολικών συστατικών με τις δύο παραμέτρους επεξεργασίας (X1, X2) περιγράφεται από τις ακόλουθες πολυωνυμικές εξισώσεις:

$$\text{TPC}=23,06-5,893X1+3,650X2-12,85X1^2-12,06X2^2$$

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση (DPPH)}=18,953+3,186X1-9,916X2+5,595X1^2+33,001X2^2$$

$$\text{Ελευρωπαΐνη (OL)}=0,837-0,697X1^2-0,050X2^2$$

$$\text{Υδροξυτυροσόλη (HY)}=1,044+0,250X2-0,108 X1^2-0,527X2^2$$

$$\text{Ρουτίνη (RU)}=0,493+0,188X2-0,239X1^2-0,456X2^2$$

$$\text{Σύνολο φαινολικών συστατικών (SUM)}=2,408+0,812X2-1,114X1^2-2,072X2^2$$

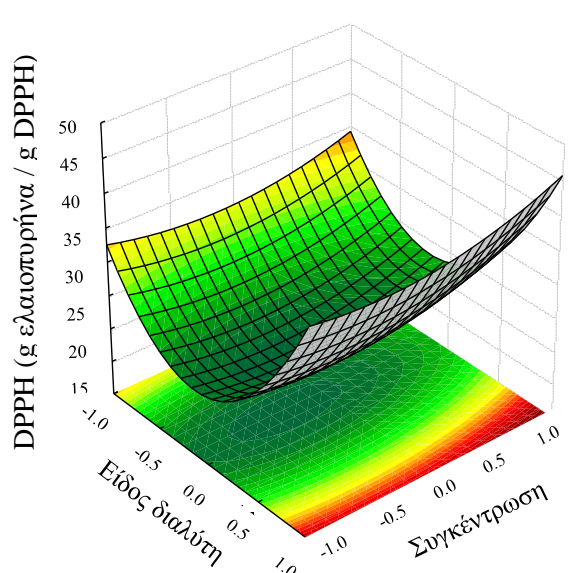
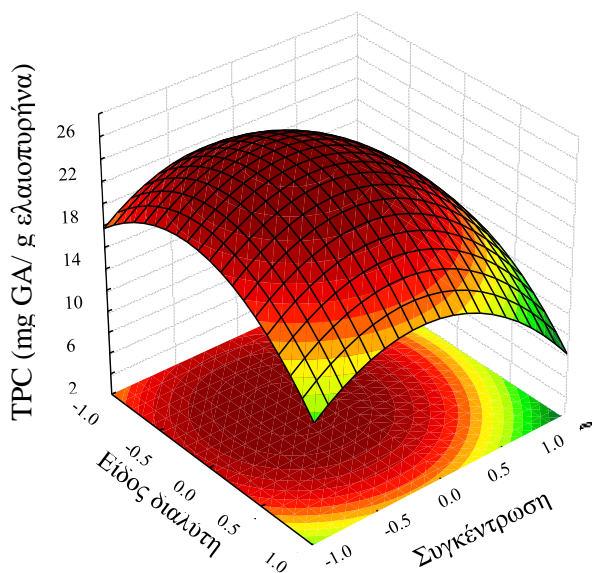
Οι τιμές R² για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και την ανάκτηση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ήταν: 0,986, 0,999, 0,982, 0,995, 0,981 και 0,987 αντίστοιχα (Πίνακας 33), υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα αντιπροσωπεύουν επαρκώς τη σχέση μεταξύ των επιλεγμένων παραμέτρων.

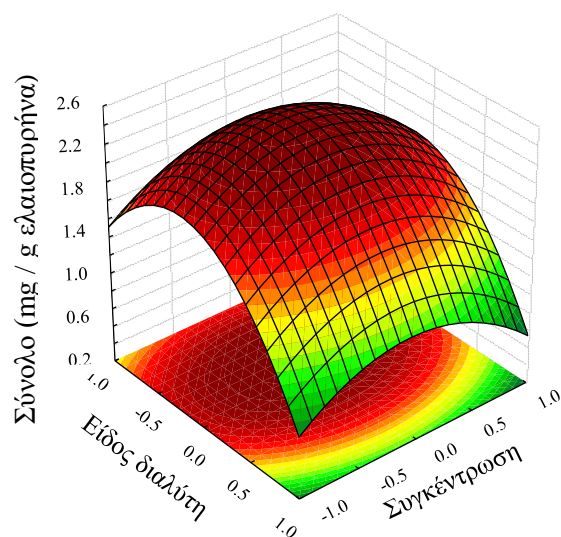
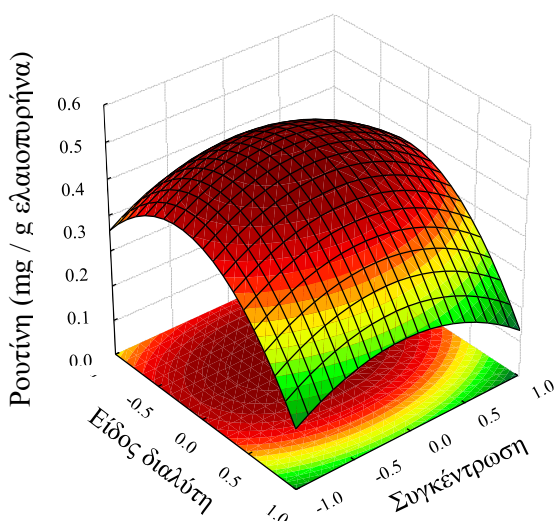
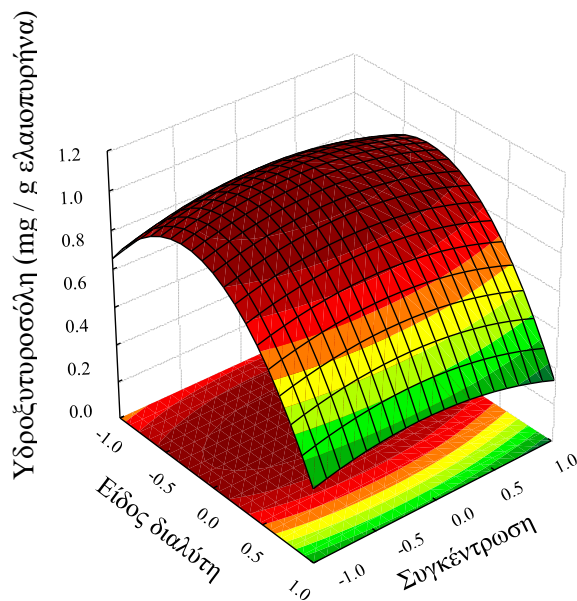
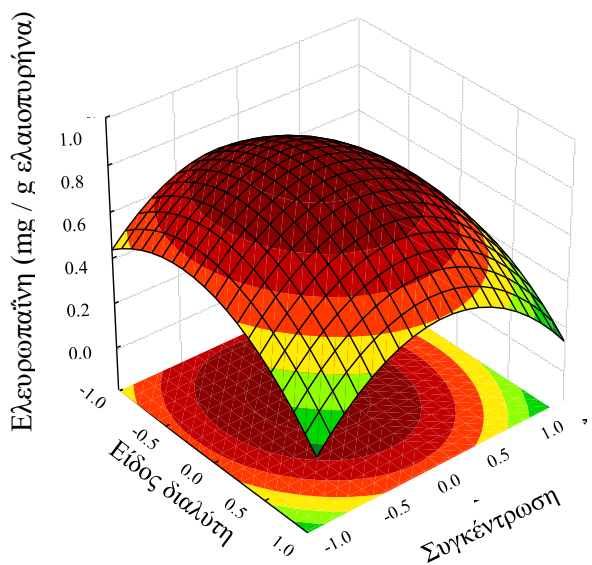
Πίνακας 33. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών (A) και ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (B) των μοντέλων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και την ανάκτηση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα

	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο		Αντιοξειδωτική ικανότητα		Ελευρωπαΐνη		Υδροξυτυροσόλη		Ρουτίνη		Σύνολο φαινολικών συστατικών	
A	Συντελεστές παλινδρόμησης των μοντέλων											
	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a
Μοντέλο	23,06	0,861	18,953	0,388	0,834	0,058	1,044	0,021	0,493	0,028	2,408	0,075
X1	-5,893	1,177	3,186	0,530	-0,129	0,079	-0,012	0,014	-0,037	0,037	-0,164	0,102
X2	3,650	1,888	-9,916	0,850	0,174	0,127	0,250	0,024	0,188	0,037	0,812	0,102
X1 ²	-12,85	1,177	5,595	0,530	-0,697	0,079	-0,108	0,014	-0,239	0,060	-1,114	0,165
X2 ²	-12,06	1,888	33,001	0,850	-0,500	0,127	-0,527	0,024	-0,456	0,061	-2,072	0,165
X1X2	-0,685	1,442	-1,645	0,649	-0,099	0,097	0,018	0,018	0,003	0,046	-0,014	0,126
B	Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)											
	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value
Μοντέλο	253,8	122,01***	819,17	1950,4**	0,508	56,44 ^{NS}	1,052	809,23***	0,211	105,5***	4,257	283,8**
X1	52,09	25,04***	15,23	36,06***	0,025	2,651 ^{NS}	0,001	0,714	0,002	0,954	0,040	2,54
X2	19,98	9,608**	147,51	349,23**	0,283	30,012 ^{NS}	0,375	278,13**	0,053	24,808**	0,989	45,50***
X1 ²	96,36	46,32***	18,26	43,24***	0,045	4,818**	0,027	20,21***	0,034	15,574**	0,723	62,21***
X2 ²	84,88	40,80***	635,47	1504,51*	0,146	15,452**	0,648	480,76**	0,122	56,535**	2,505	157,51**
X1X2	0,469	0,225 ^{NS}	2,706	6,407 ^{NS}	0,009	1,046 ^{NS}	0,001	0,934	0,000	0,003	0,0002	0,0132
Υπόλοιπο	44,50		57,31		0,122		0,071		0,034		0,610	
Σύνολο	298,3		876,48		0,630		1,121		0,245		4,87	

^a COEFF: Συντελεστές, SE: Τυπικό σφάλμα ^b SS: Αθροισμα τετραγώνων * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, NS – Μη Σημαντικό

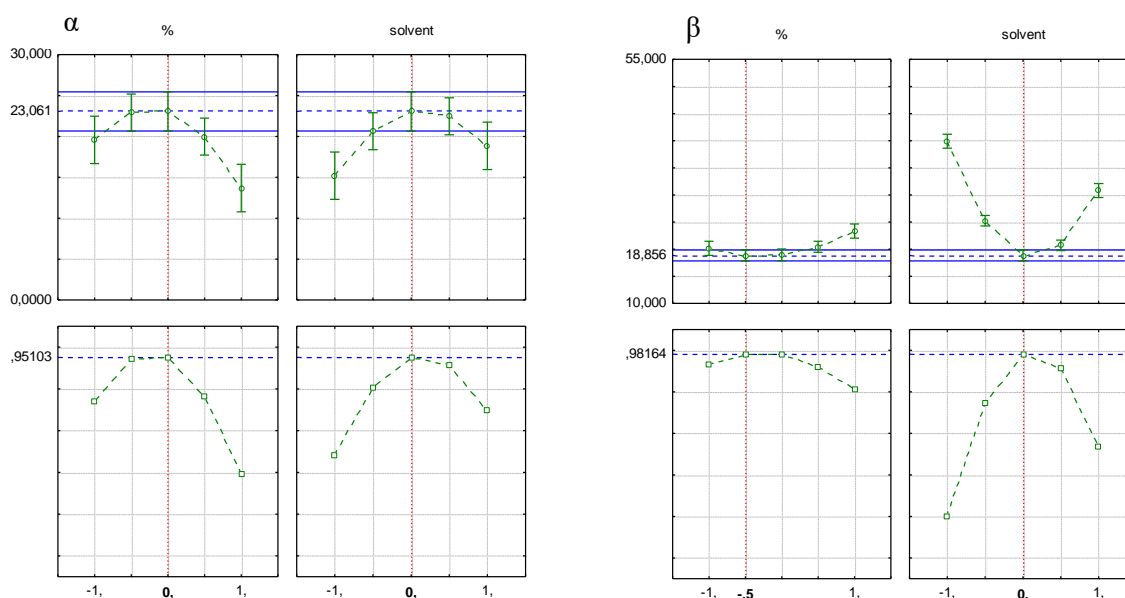
Προκειμένου να προσδιοριστούν τα βέλτιστα επίπεδα των μεταβλητών για την ανάκτηση του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC), της αντιοξειδωτικής δράσης, και της συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα με συμβατική εκχύλιση, δημιουργήθηκαν 3D γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας από το μοντέλο που αντιστοιχεί στις παραπάνω εξισώσεις (Σχήμα 57). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 57, χρησιμοποιώντας διαλύτη αιθανόλη, η μείωση της συγκέντρωσης του διαλύτη από 90% σε 70% προκάλεσε αύξηση του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών από 11,77 σε 23,88 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από 23,33 σε 18,36 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH και η περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης σε 50% οδήγησε πάλι σε μείωση (19,86 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. και 20,74 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH, αντίστοιχα). Περαιτέρω, με εφαρμογή της συγκέντρωσης διαλύτη 70%, φαίνεται ότι η χρήση αιθανόλης προάγει την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, ρουτίνη και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών σε 0,868, 1,059, 0,527 και 2,504 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β., αντίστοιχα σε σχέση με τις αντίστοιχες περιεκτικότητες που προκύπτουν με χρήση μεθανόλης (0,606, 0,747, 0,372 και 1,657 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) και ακετόνης (0,442, 0,294, 0,131 και 0,919 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.).

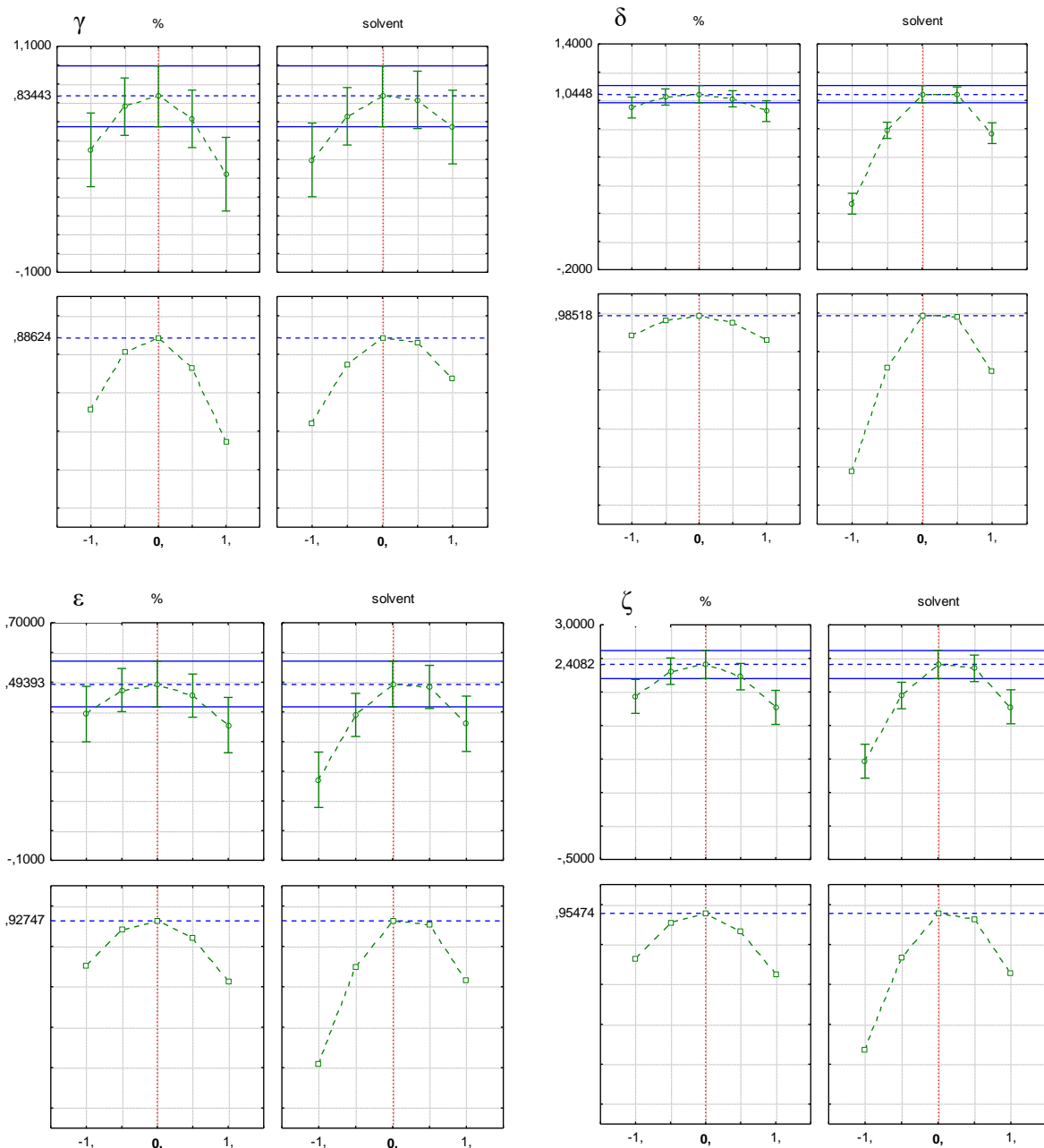




Σχήμα 57. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας για το ολικό περιεχόμενο φαιολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση, τη συγκέντρωση ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαιολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα που επηρεάζονται από το είδος και τη συγκέντρωση του διαλύτη

Στο Σχήμα 58 απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα επιθυμητά επίπεδα των παραμέτρων της εκχύλισης, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε ολικό περιεχόμενο φαιολικών συστατικών (TPC), αντιοξειδωτική δράση, και συγκέντρωση ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαιολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα. Το μέγιστο ολικό περιεχόμενο φαιολικών συστατικών στα 23,061 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. βρέθηκε με διαλύτη αιθανόλη και σε αναλογία 70%. Η μέγιστη τιμή της αντιοξειδωτικής δράσης ήταν 18,156 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH που προκύπτει με εκχύλιση του ελαιοπυρήνα με διαλύτη αιθανόλη σε αναλογία 60%. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαιολικών συστατικών των εκχυλισμάτων βρέθηκαν στα 0,834, 1,04, 0,493 και 2,41 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β., αντίστοιχα, και επιτεύχθηκαν με εφαρμογή διαλύτη αιθανόλης και σε αναλογία 70%.





Σχήμα 58. Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (α), αντιοξειδωτική δράση (β), και συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (γ), υδροξυτυροσόλης (δ), ρουτίνης (ε) και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (ζ) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα

Τέλος, για επικύρωση των προβλεπόμενων μεταβλητών, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας τις αριστοποιημένες παραμέτρους για κάθε μεμονωμένη απόκριση. Στον Πίνακα 34 παρουσιάζονται επίσης στα επίπεδα μεταβλητών που αριστοποιούνται για κάθε απόκριση, και οι τιμές για τις υπόλοιπες αποκρίσεις που προέκυψαν είτε από το μοντέλο είτε

πειραματικά. Οι πειραματικές τιμές δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές από τις προβλεπόμενες, υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν ήταν επαρκή στις προβλέψεις τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της συμβατικής εκχύλισης του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση εκχυλισμάτων πλούσιων σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, ρουτίνη και σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών, και με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, αντίστοιχα.

Πίνακας 34. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών

Μεταβλητές διεργασίας		Προβλεπόμενες τιμές				Πειραματικές τιμές ^a							
X1 (%)	X2 (διαλύτης)	TPC	DPPH	OL	HY	RU	SUM	TPC	DPPH	OL	HY	RU	SUM
70	αιθανόλη	23,061	18,953	0,834	1,044	0,493	2,408	23,087±0.010	18,778±0.048	0,829±0.021	1,021±0.047	0,498±0.014	2,387±0.021
60	αιθανόλη	22,794	18,156	0,662	1,017	0,433	2,129	21,489±0.014	18,054±0.044	0,601±0.042	0,998±0.074	0,439±0.029	2,051±0.025

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

DPPH: Αντιοξειδωτική δράση (g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH)

OL: Ελευρωπαΐνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

HY: Υδροξυτυροσόλη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

RU: Ρουτίνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

SUM-Σύνολο: Σύνολο προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιλέχθηκε η αιθανόλη σε αναλογία 70% v/v ως ο καλύτερος οργανικός διαλύτης εκχύλισης για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα και χρησιμοποιείται ως αναφορά για την αξιολόγηση των νέων μεθόδων εκχύλισης που θα παρουσιαστούν παρακάτω.

4.2.1.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζυμικού διαλύματος

Το μίγμα ενζύμων (μίγμα πηκτινάσης και πολυγαλακτουρονάσης) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε καθώς παρόμοια ενζυμικά μίγματα χρησιμοποιούνται συνήθως στη μηχανική εκχύλιση του ελαιόλαδου στη βιομηχανία. Επιπλέον, αυτά τα ένζυμα έχουν συμβάλει στην αποτελεσματική εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από το ελαιόλαδο (Hadj-Taieb, Grati, Ayadi, Attia, & Bensalem, 2012). Η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα διερευνήθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1 και 1% v/v με συμβατική εκχύλιση (CE) στους 40 °C για 1 h. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν αυξήθηκε σημαντικά από 6,75 έως 8,42 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου από 0,1 σε 1% v/v (Πίνακας 35). Συνεπώς, επιλέχθηκε το 1% v/v ως συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος.

Πίνακας 35. Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα

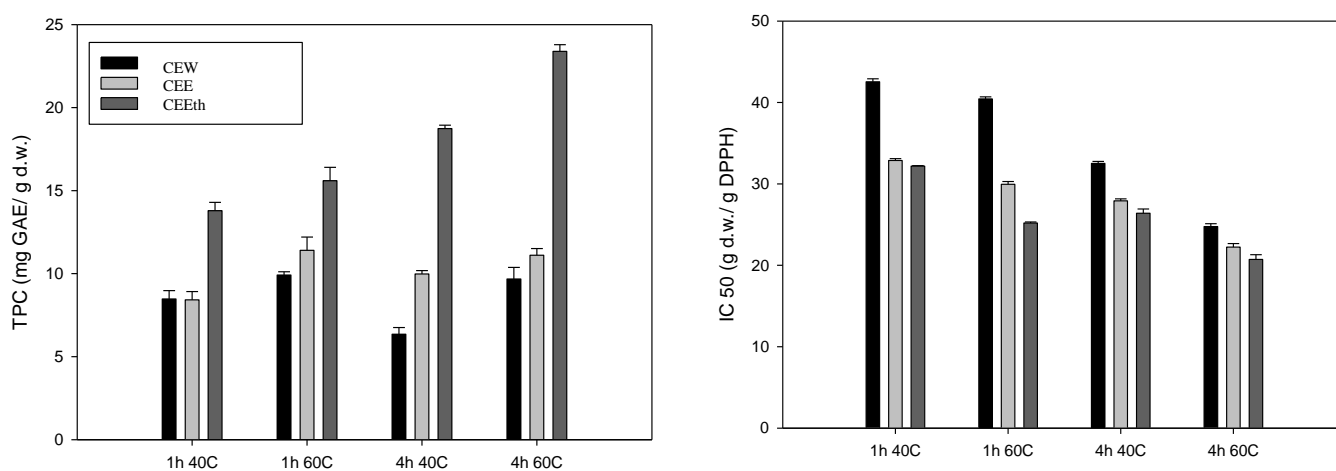
	Συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος (% v/v)	TPC (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)
Ελαιοπυρήνας	0,1	6,75 ± 0,75
	1	8,42 ± 0,81

4.2.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης με εφαρμογή της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου στη συμβατική υδατική (CEW) και υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και στην εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων φαίνεται στο Σχήμα 59. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έδειξε σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) με τη θερμοκρασία. Υψηλότερη θερμοκρασία (60 °C) ευνοεί την αύξηση της διαλυτότητας των φαινολικών ενώσεων και την αύξηση του ρυθμού διάχυσής τους στο διαλύτη, αυξάνοντας το ρυθμό μεταφοράς μάζας (Aludatt et al., 2010, Takeuchi et al., 2009). Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 6,35 έως 9,92 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική εκχύλιση (CEW), από 8,41 έως 11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και από 13,79 έως 23,88 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης (CEEth), αντίστοιχα. Η χρήση αιθανόλης 70% οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε

φαινολικά συστατικά. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση στους 60 °C, ελήφθησαν εκχυλίσματα περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση (11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEE και 9,92 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEW, αντίστοιχα).

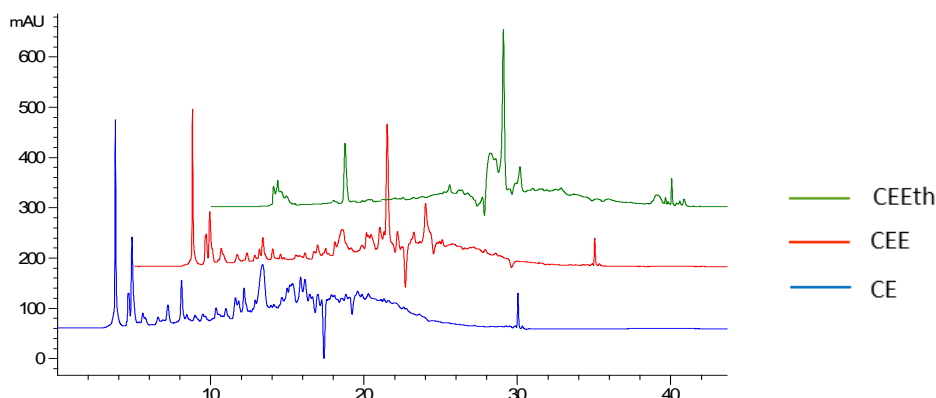
Το Σχήμα 59 δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με συμβατική υδατική (CEW) και υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και χρόνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης επηρεάζονται σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμοκρασία εκχύλισης καθώς και από τη χρήση ενζύμου σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση (CEW). Η χρήση ενζύμου οδήγησε σε εκχυλίσματα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τη συμβατική υδατική εκχύλιση (CEW), εξαιτίας της υδρόλυσης και αποδόμησης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος που λαμβάνει χώρα, διευκολύνοντας έτσι την απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων (Y. Fu et al., 2008). Τα εκχυλίσματα με μέγιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης προέκυψαν με εφαρμογή CEEth στους 60 °C (18,36 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH). Ωστόσο, εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση στους 60 °C, προέκυψαν εκχυλίσματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση εκείνα που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση (22,23 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για τη CEE και 24,74 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για τη CEW, αντίστοιχα).

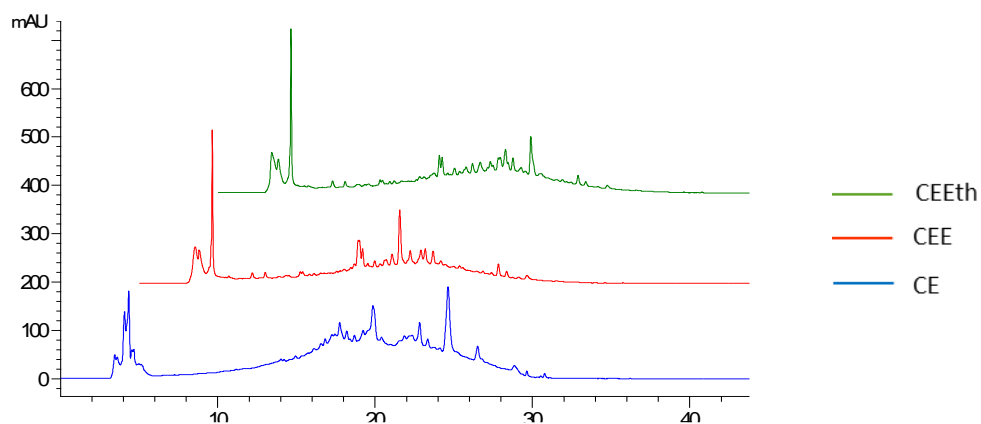


Σχήμα 59. Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από τη συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth)

4.2.1.4 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 36. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με τη χρήση αιθανόλης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με την υδατική ενζυμική εκχύλιση. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου σε όλες τις περιπτώσεις εκχυλίσεων ($P < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση ενζύμου συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση. Οι κυρίαρχες φαινολικές ενώσεις ήταν η υδροξυτυροσώλη, η ελευρωπαΐνη και η ρουτίνη, ενώ επίσης ανιχνεύθηκε η λουτεολίνη και μικρές ποσότητες καφεϊκού οξέος και βανιλίνης (Σχήμα 60). Οι υψηλότερες ποσότητες της OL εκχυλίστηκαν με αιθανόλη (0,868 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως με την υδατική ενζυμική εκχύλιση (0,549 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) για 4 h στους 60 °C. Η αιθανόλη 70% ήταν ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση της ΗΥ, ωστόσο η χρήση ενζύμων έδωσε εκχυλίσματα με περιεκτικότητα σε ΗΥ που έφθασε το 88% εκείνης με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη εκχύλισης. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων αιθανόλης 70% σε RU ήταν περίπου 2 και 6 φορές υψηλότερη από τις αντίστοιχες με χρήση ενζύμων και με υδατική εκχύλιση, αντίστοιχα, για 4 h στους 60 °C. Τα επίπεδα λουτεολίνης (LU) στα εκχυλίσματα με χρήση υδατικής ενζυμικής εκχύλισης ήταν επίσης υψηλότερα (κατά μέσο όρο περίπου 3 φορές) από τα αιθανολικά εκχυλίσματα.





Σχήμα 60. Χρωματογραφήματα των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEeth)

Πίνακας 36. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με συμβατική (CEW) υδατική ενζυμική εκχύλιση (CEE) και εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (CEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης.

Φαινολικό Συστατικό ^a	Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5) - CEW				Υδατική ενζυμική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5 + ένζυμο 1% v/v) - CEE				Αιθανόλη 70% - CEEth			
	1h 40°C ^b	1h 60°C ^b	4h 40°C ^b	4h 60°C ^b	1h 40°C ^b	1h 60°C ^b	4h 40°C ^b	4h 60°C ^b	1h 40°C ^b	1h 60°C ^b	4h 40°C ^b	4h 60°C ^b
OL ^b	0,241±0,035	0,347±0,021	0,357±0,014	0,416±0,013	0,3116±26,8	0,349±0,021	0,446±0,018	0,549±0,022	0,358±0,045	0,445±0,054	0,420±0,034	0,868±0,023
HY ^b	0,739±0,150	0,765±0,049	0,805±0,012	0,820±0,046	0,573±6,9	0,625±0,012	0,777±0,038	0,933±0,029	0,589±0,025	0,658±0,069	0,778±0,056	1,059±0,056
CA ^b	0,002±0,001	0,006±0,001	0,002±0,001	0,012±0,001	0,007±0,1	0,008±0,001	0,010±0,001	0,014±0,001	0,006±0,001	0,008±0,001	0,010±0,001	0,014±0,001
VA ^b	0,012±0,002	0,018±0,002	0,012±0,007	0,013±0,005	0,014±0,8	0,016±0,005	0,013±0,003	0,018±0,003	0,011±0,012	0,014±0,008	0,015±0,007	0,020±0,008
RU ^b	0,048±0,003	0,056±0,010	0,090±0,009	0,091±0,009	0,140±20,9	0,141±0,003	0,176±0,007	0,216±0,008	0,185±0,003	0,258±0,010	0,385±0,014	0,497±0,010
LU ^b	0,051±0,030	0,053±0,011	0,056±0,003	0,073±0,007	0,080±40,4	0,052±0,006	0,067±0,002	0,066±0,004	0,012±0,003	0,014±0,003	0,017±0,003	0,020±0,007
Σύνολο ^{bc}	1,093±0,154	1,245±0,055	1,322±0,022	1,425±0,023	1,125±0,049	1,191±0,074	1,489±0,024	1,796±0,038	1,161±0,055	1,397±0,089	1,625±0,067	2,478±0,062

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

^c σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών

4.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση υπερήχων (UAE)

4.2.2.1 Επίδραση του είδους του διαλύτη και της συγκέντρωσής του σε νερό (% v/v) και της θερμοκρασίας εκχύλισης

Η μέθοδος UAE έχει προταθεί μεταξύ άλλων εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους και η απόδοσή της έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού, το μέγεθος σωματιδίων, ο χρόνος, ο διαλύτης και η αναλογία του διαλύτη. Όπως έχει αναφερθεί, η βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης με εφαρμογή υπερήχων οφείλεται κυρίως στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης και στις δημιουργούμενες φυσαλίδες που προκαλούν αύξηση της πίεσης και της θερμοκρασίας οδηγώντας στην κατάρρευσή τους. Όταν η κατάρρευση λαμβάνει χώρα κοντά σε στερεή επιφάνεια, το προκύπτον κύμα διαταράσσει τα κυτταρικά τοιχώματα, διευκολύνοντας το διαλύτη να διεισδύσει στο στερεό υλικό και επιτρέποντας την απελευθέρωση των ενώσεων-στόχων (Chanioti & Tzia, 2017). Σκοπός αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν η αριστοποίηση της UAE των φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα από την άποψη της απόδοσης σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, αντιοξειδωτική δράση και επιμέρους φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων που προέκυψαν, εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία αποκριτικών επιφανειών (RSM). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία, ο διαλύτης και η αναλογία του διαλύτη ήταν κάποιες από τις κυριότερες παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης από διαφορετικές πηγές (Irakli, Chatzopoulou, & Ekateriniadou, 2018, Cığeroğlu et al., 2018, Čujić et al., 2016, Brahmi et al., 2012). Παρόλο που από τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης επιλέχθηκε η αιθανόλη σε συγκέντρωση 70% v/v ως οργανικός διαλύτης εκχύλισης για την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα με τη συμβατική εκχύλιση, αυτή η πειραματική σειρά σχεδιάστηκε για να επαληθεύσει την επιλογή αυτών των παραμέτρων με τη χρήση της νέας μεθόδου εκχύλισης με χρήση υπερήχων. Επομένως, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύτη σε νερό (X1, με εύρος 50-90% v/v), της θερμοκρασίας εκχύλισης (X2, με εύρος 40-80°C) και του είδους του διαλύτη (X3, με εύρος ακετόνη < αιθανόλη < μεθανόλη με βάση την πολικότητα) στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), στην αντιοξειδωτική δράση και στα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα. Τα αποτελέσματα των 17 πειραμάτων με βάση το σχεδιασμό Box-Behnken πραγματοποιήθηκαν με τυχαία σειρά και δίνονται στον Πίνακα 37.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών κυμάνθηκε από 3,29 έως 23,90%. Η μέγιστη απόδοση βρέθηκε εφαρμόζοντας τις εξής πειραματικές συνθήκες: X1=70%, X2=60 °C και X3=αιθανόλη. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων

ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 21,00 έως 48,98 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH και το μέγιστο σημείο βρέθηκε επίσης στις συνθήκες X1=70%, X2=60 °C και X3=αιθανόλη. Περαιτέρω, τα εκχυλίσματα με την υψηλότερη συγκέντρωση ελευρωπαϊνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών προέκυψαν υπό τις συνθήκες εκχύλισης X1 = 70%, X2 = 60 °C και X3 = αιθανόλη.

Πίνακας 37. Σχεδιασμός Box-Behnken με τις αποκρίσεις για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και τις συγκεντρώσεις στα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα.

A/A	Επίπεδα μεταβλητών			Αποκρίσεις					
	X ₁ (Συγκέντρωση δ/τη, % v/v)	X ₂ (Θερμοκρασία, °C)	X ₃ (διαλύτης)	TPC (mg GA/g d.w.)	DPPH (g d.w./g DPPH)	OL	HY	RU	Σύνολο
1	0 (70)	0 (60)	0 (αιθανόλη)	23,30	20,10	0,74	1,25	0,44	2,42
2	-1 (50)	-1 (40)	-1 (ακετόνη)	3,29	48,98	0,19	0,13	0,13	0,54
3	-1 (50)	-1 (40)	1 (μεθανόλη)	11,79	34,31	0,32	0,39	0,21	0,88
4	1 (90)	-1(40)	-1 (ακετόνη)	9,09	48,00	0,16	0,12	0,10	0,49
5	-1 (50)	1 (80)	-1 (ακετόνη)	10,04	47,26	0,21	0,18	0,19	0,80
6	1 (90)	1 (80)	1 (μεθανόλη)	11,26	37,50	0,26	0,43	0,28	0,99
7	0 (70)	-1 (40)	0 (αιθανόλη)	16,02	23,88	0,27	0,86	0,38	1,39
8	0 (70)	0 (60)	0 (αιθανόλη)	23,05	20,01	0,75	1,18	0,43	2,42
9	0 (70)	0 (60)	-1 (ακετόνη)	10,04	40,44	0,46	0,34	0,17	1,53
10	-1 (50)	0 (60)	0 (αιθανόλη)	15,26	23,12	0,60	0,85	0,35	1,66
11	0 (70)	1 (80)	0 (αιθανόλη)	18,70	25,09	0,56	1,19	0,39	2,24
12	0 (70)	0 (60)	0 (αιθανόλη)	23,90	20,00	0,75	1,18	0,43	2,42
13	1 (90)	1 (80)	-1 (ακετόνη)	6,79	48,15	0,07	0,10	0,03	0,26
14	1 (90)	0 (60)	0 (αιθανόλη)	20,98	24,29	0,40	0,95	0,36	1,56
15	-1 (50)	1 (80)	1 (μεθανόλη)	12,77	36,91	0,40	0,33	0,27	1,03
16	1 (90)	-1 (40)	1 (μεθανόλη)	4,42	38,47	0,20	0,43	0,20	0,79
17	0 (70)	0 (60)	1 (μεθανόλη)	15,37	31,41	0,53	0,76	0,31	1,83

Ελευρωπαϊνή (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Ρουτίνη (RU), - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

Σύνολο: σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

Ο Πίνακας 38 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των μοντέλων προσαρμογής στα πειραματικά δεδομένα. Η ακρίβεια κάθε μοντέλου που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε με βάση την τιμή του συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Οι τιμές R^2 ήταν 0,984, 0,982, 0,996, 0,989, 0,987 και 0,986 για το TPC, την αντιοξειδωτική δράση, τη συγκέντρωση της ελευρωπαϊνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα, αντίστοιχα (Πίνακας 38B), υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα αντιπροσωπεύουν επαρκώς τη σχέση μεταξύ των επιλεγμένων παραμέτρων.

Παρατηρείται ότι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) επηρεάζεται κυρίως από τους γραμμικούς όρους της συγκέντρωσης του διαλύτη (X1) και του είδους του διαλύτη (X3), και ακολούθως από τους αντίστοιχους τετραγωνικούς όρους ($X1^2$ και $X3^2$) και από τον

τετραγωνικό όρο της θερμοκρασίας (X_2^2). Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται κυρίως από το γραμμικό όρο του είδους του διαλύτη (X_3) και ακολούθως από τους τετραγωνικούς όρους της συγκέντρωσης του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του είδους του διαλύτη (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2). Επιπλέον, οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στη συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης των εκχυλισμάτων ήταν οι τετραγωνικοί όροι της αναλογίας (X_1^2), της θερμοκρασίας (X_2^2) και του είδους του διαλύτη (X_3^2). Η κυρίαρχη επίδραση στο μοντέλο που αναπτύχθηκε για τη συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης και της ρουτίνης καθορίζεται επίσης από το γραμμικό όρο του είδους του διαλύτη (X_3) και τους τετραγωνικούς όρους της συγκέντρωσης (X_1^2) και του είδους του διαλύτη (X_2^2), και τέλος για τη συγκέντρωση του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από το γραμμικό όρο του είδους του διαλύτη (X_3) και τους τετραγωνικούς όρους της συγκέντρωσης (X_1^2), της θερμοκρασίας (X_2^2) και του είδους του διαλύτη (X_3^2). Οι υψηλές τιμές των F και οι χαμηλές τιμές σημαντικότητας ($P < 0,0001$) υποδηλώνουν ότι τα μοντέλα είναι σημαντικά. Η συσχέτιση μεταξύ της ανάκτησης του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC), της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και της ανάκτησης των επιμέρους κύριων φαινολικών συστατικών με τις τρεις παραμέτρους επεξεργασίας (X_1 , X_2 , X_3) περιγράφεται από τις ακόλουθες πολυωνυμικές εξισώσεις (Πίνακας 38Α):

$$\text{TPC} = 19,66 - 5,12X_1 + 4,51X_3 + 1,71X_1^2 + 3,87X_2^2 - 12,13 X_3^2$$

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση (DPPH)} = 20,94 - 5,42X_3 + 2,82X_1^2 + 3,60X_2^2 + 15,04X_3^2$$

$$\text{Ελευρωπαΐνη (OL)} = 0,676 - 0,129X_1^2 - 0,207X_2^2 - 0,126X_3^2$$

$$\text{Υδροξυτυροσόλη (HY)} = 1,161 + 0,147X_3 - 0,225X_1^2 - 0,578X_3^2$$

$$\text{Ρουτίνη (RU)} = 0,420 + 0,065X_3 - 0,055X_1^2 - 0,170X_3^2$$

$$\text{Σύνολο φαινολικών συστατικών (SUM)} = 2,316 + 0,191X_3 - 0,629X_1^2 - 0,425X_2^2 - 0,559X_3^2$$

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα βέλτιστα επίπεδα των μεταβλητών για την ανάκτηση του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC), της αντιοξειδωτικής δράσης, και της συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα με εκχύλιση με χρήση υπερήχων, δημιουργήθηκαν 3D γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας από το μοντέλο που αντιστοιχεί στις παραπάνω εξισώσεις (Σχήμα 61).

Τα 3D διαγράμματα που αντιστοιχούν στις επιδράσεις της συγκέντρωσης του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του είδους του διαλύτη στο TPC και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα εμφανίζονται στα Σχήματα 61-66. Η επίδραση της

συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στο TPC και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε σταθερή θερμοκρασία εκχύλισης (60 °C) φαίνεται στα Σχήματα 61γ και 62γ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το TPC και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων είχε ένα μέγιστο σημείο (~21,00 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. και ~20,00 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) που προέκυψε εντός του εύρους της συγκέντρωσης του διαλύτη από 60 έως 80% και για είδος διαλύτη ακετόνη/αιθανόλη (50/50) έως αιθανόλη/μεθανόλη (50/50). Ομοίως, οι Brahmi et al. (2012) ανέφεραν σημαντική αύξηση του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών (TPC) και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από το φυτό *Mentha spicata L.*, όταν η εκχύλιση γινόταν με οργανικό διαλύτη (ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη) με αυξημένη προσθήκη νερού σε αυτόν. Διαπιστώθηκε ότι η υψηλότερη απόδοση μπορεί να επιτευχθεί σε συγκέντρωση 70% διαλύτη. Αυτές οι αποδόσεις ήταν υψηλότερες από εκείνες που παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας καθαρούς διαλύτες και ελαφρώς υψηλότερες από εκείνες που προέκυψαν με τη χρήση διαλύτη με συγκέντρωση 50%. Επιπλέον, η απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά αυξήθηκε με την αύξηση της πολικότητας του διαλύτη. Αυτό αποδεικνύει ότι τα περισσότερα από τα φαινολικά συστατικά του ελαιοπυρήνα είναι υδρόφιλα ή υδατοδιαλυτά και η χρήση της αιθανόλης οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χρήση ακετόνης και μεθανόλης (Σχήματα 61β και 62β). Το Σχήμα 62α δείχνει την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της συγκέντρωσης του διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη. Η θερμοκρασία εκχύλισης είχε τετραγωνική καθαρή επίδραση στο TPC και στην αντιοξειδωτική δράση που έφθασε στην υψηλότερη τιμή στους 60 °C.

Περαιτέρω, τα Σχήματα 63-66 δείχνουν ότι υπάρχει ένα σημείο με την εφαρμογή αναλογίας 70% και χρήση αιθανόλης, στο οποίο η περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, ρουτίνη και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών εμφάνισε τη μέγιστη τιμή ~0,670, ~1,150, ~0,410 και ~2,300 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β., αντίστοιχα. Το τετραγωνικό αποτέλεσμα της θερμοκρασίας ήταν καθαρό και η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων συστατικών έφτασε επίσης στην υψηλότερη τιμή στους 60 °C, ενώ η συγκέντρωση της ρουτίνης στους 70 °C.

Στα Σχήματα 61δ-66δ απεικονίζονται τα διαγράμματα με τα επιθυμητά επίπεδα των παραμέτρων της εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση (οριζόμενη με την τιμή 1, σε κλίμακα από 0-1) σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), αντιοξειδωτική δράση, και συγκέντρωση ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα. Το μέγιστο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών βρέθηκε 21,77 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. σε θερμοκρασία 60 °C, με διαλύτη αιθανόλη και σε συγκέντρωση 70%. Η μέγιστη τιμή της αντιοξειδωτικής δράσης ήταν 20,95 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH που μπορεί να επιτευχθεί με εκχύλιση του ελαιοπυρήνα σε θερμοκρασία 60 °C, με διαλύτη αιθανόλη σε

συγκέντρωση 70%. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ήταν 0,674, 1,161 και 2,32 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β., αντίστοιχα, οι οποίες μπορεί να επιτευχθούν με εφαρμογή θερμοκρασίας 60 °C, διαλύτη αιθανόλης και σε συγκέντρωση 70%, ενώ της ρουτίνης ήταν 0,421 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β. και επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία 70 °C, με διαλύτη αιθανόλη και σε συγκέντρωση 70%.

Πίνακας 38. Συντελεστές παλινδρόμησης των γραμμικών και τετραγωνικών όρων και των όρων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών (Α) και η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) (Β) των μοντέλων για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση και τη συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα

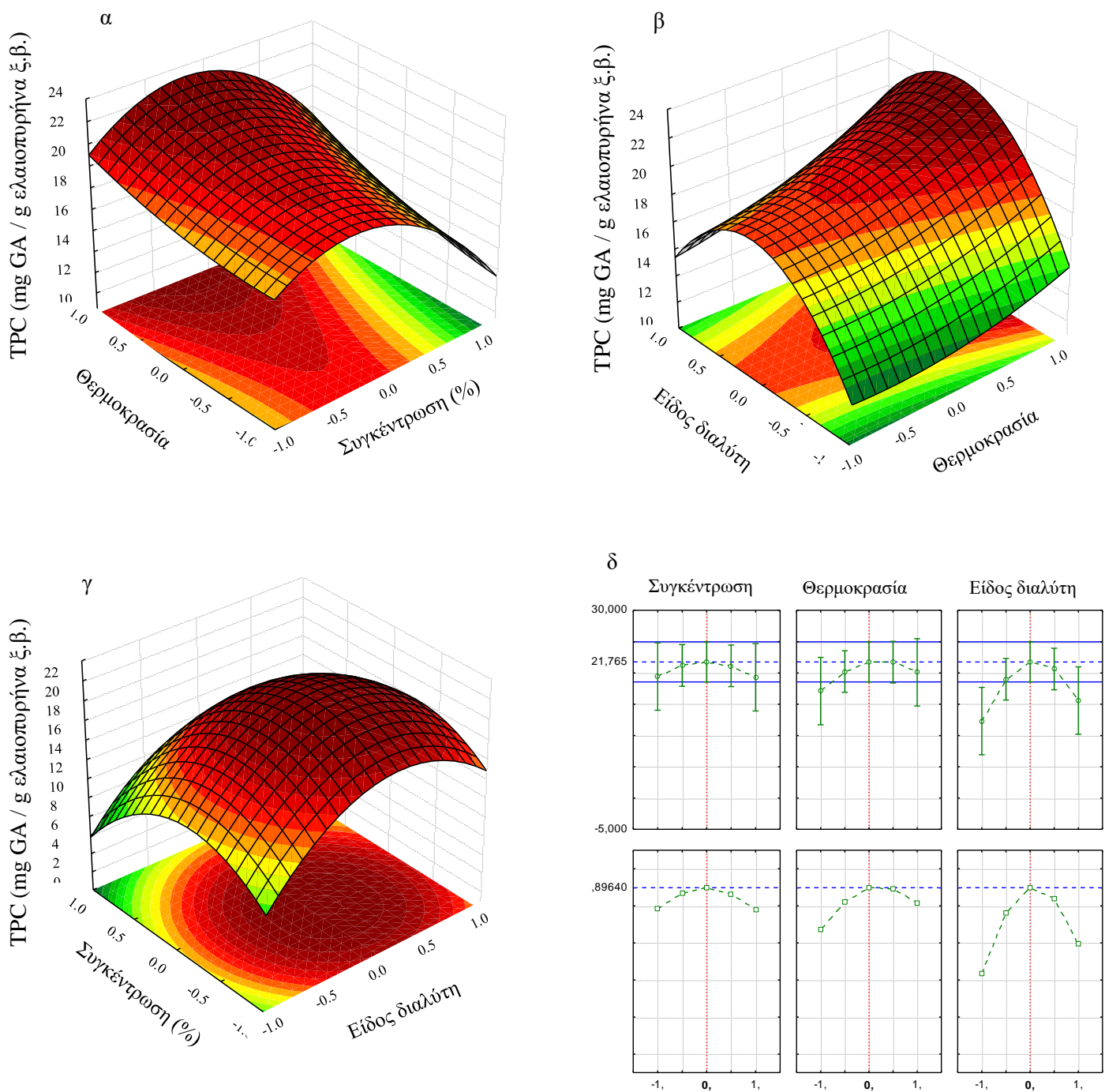
A	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο		Αντιοξειδωτική ικανότητα		Ελευρωπαΐνη		Υδροξυτυροσόλη		Ρουτίνη		Σύνολο	
	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a	COEFF ^a	SE ^a
Μοντέλο	19,66	0,64	20,94	0,40	0,676	0,042	1,161	0,043	0,420	0,012	2,316	0,095
X1	-5,12	0,95	0,58	0,30	-0,061	0,031	0,015	0,032	-0,018	0,009	-0,082	0,070
X2	-11,30	1,85	0,12	0,58	0,035	0,031	0,031	0,032	0,013	0,009	0,122	0,070
X3	4,51	0,95	-5,42	0,30	0,060	0,031	0,147	0,032	0,065	0,009	0,191	0,070
X1 ²	1,77	1,85	2,82	0,58	-0,129	0,060	-0,225	0,062	-0,055	0,018	-0,629	0,136
X2 ²	3,87	0,95	3,60	0,30	-0,207	0,060	-0,101	0,062	-0,022	0,018	-0,425	0,136
X3 ²	-12,13	1,85	15,04	0,58	-0,126	0,060	-0,578	0,062	-0,170	0,018	-0,559	0,136
X1X2	1,45	1,07	-0,21	0,33	-0,015	0,034	0,000	0,036	-0,014	0,010	-0,054	0,079
X1X3	-0,60	1,07	0,61	0,33	-0,011	0,034	0,027	0,036	0,024	0,010	0,059	0,079
X2X3	1,59	1,07	0,40	0,33	0,026102	0,034	-0,011	0,036	0,020	0,010	0,041	0,079

^a COEFF: Συντελεστές, SE: Τυπικό σφάλμα ^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Ρουτίνη (RU), - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

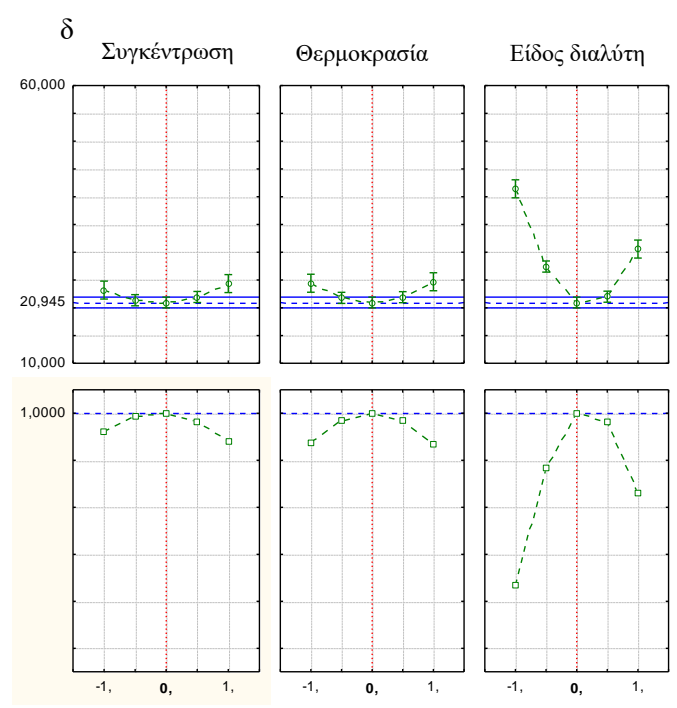
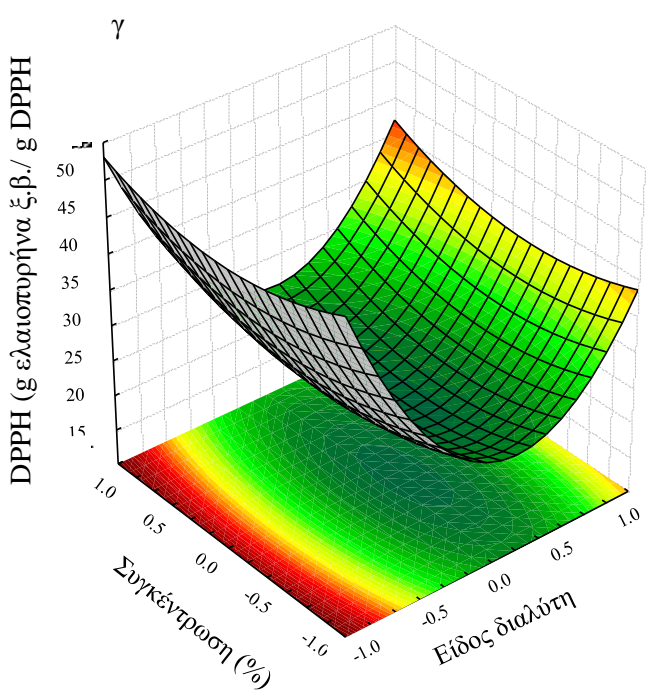
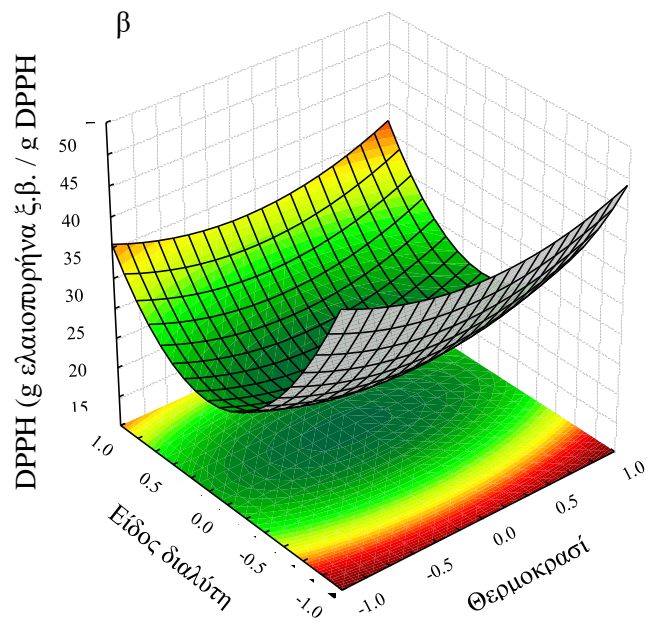
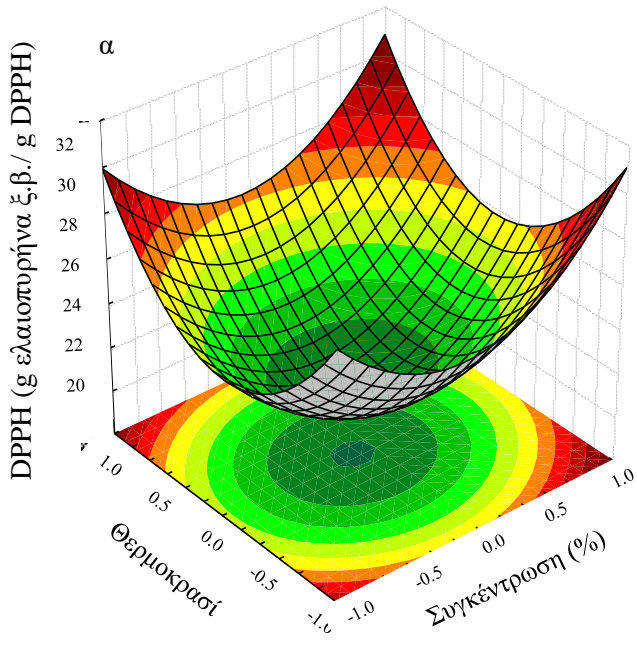
Σύνολο: σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

B	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο		Αντιοξειδωτική ικανότητα		Ελευρωπαΐνη		Υδροξυτυροσόλη		Ρουτίνη		Σύνολο	
	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value	SS ^b	F-value
Μοντέλο	350,27	94,26***	965,23	356,26**	0,299	52,33**	1,294	154,4**	0,143	141,06**	3,020	131,26**
X1	65,5872	28,54***	3,399	3,72	0,038	3,936	0,002	0,002	0,003	3,87	0,068	1,375
X2	50,8503	22,13	0,161	0,17	0,012	1,307	0,010	0,010	0,001	2,08	0,150	3,042
X3	37,4848	16,31**	294,08	321,99**	0,036	3,803	0,217	0,217**	0,042	51,27***	0,364	7,38***
X1 ²	85,5798	37,24***	21,43	23,46***	0,044	4,654**	0,136	0,136**	0,008	9,67***	1,059	21,47***
X2 ²	2,1141	0,92***	34,88	38,19***	0,114	11,895**	0,027	0,027	0,001	1,565	0,484	9,816***
X3 ²	98,6256	42,92***	606,72	664,29**	0,043	4,473**	0,895	0,895**	0,077	92,25***	0,838	16,99***
X1X2	4,2195	1,83	0,361	0,3955	0,001	0,206	0,000	0,000	0,001	1,985	0,023	0,468
X1X3	0,7381	0,32	2,928	3,2061	0,001	0,114	0,006	0,006	0,004	5,46	0,028	0,567
X2X3	5,0721	2,20	1,280	1,4015	0,005	0,564	0,001	0,001	0,003	3,765	0,014	0,27
Υπόλοιπο	217,24		815,85		0,471		1,544	0,010	0,112		5,250	
Σύνολο	567,52		1781,09		0,770		2,838		0,256		8,278	

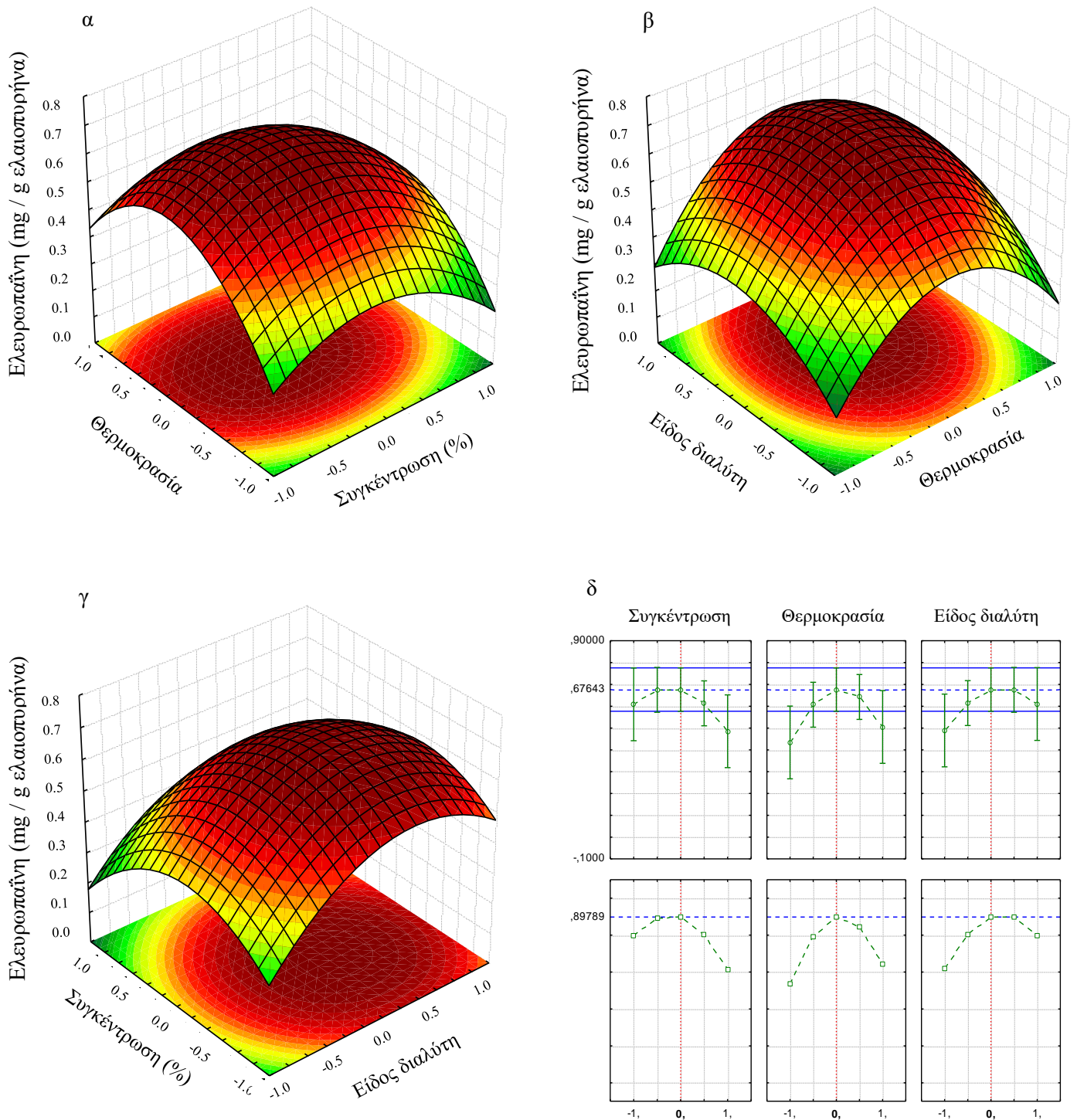
SS: Άθροισμα τετραγώνων * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, NS – Μη σημαντικό
Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Ρουτίνη (RU), - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.
Σύνολο: σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.



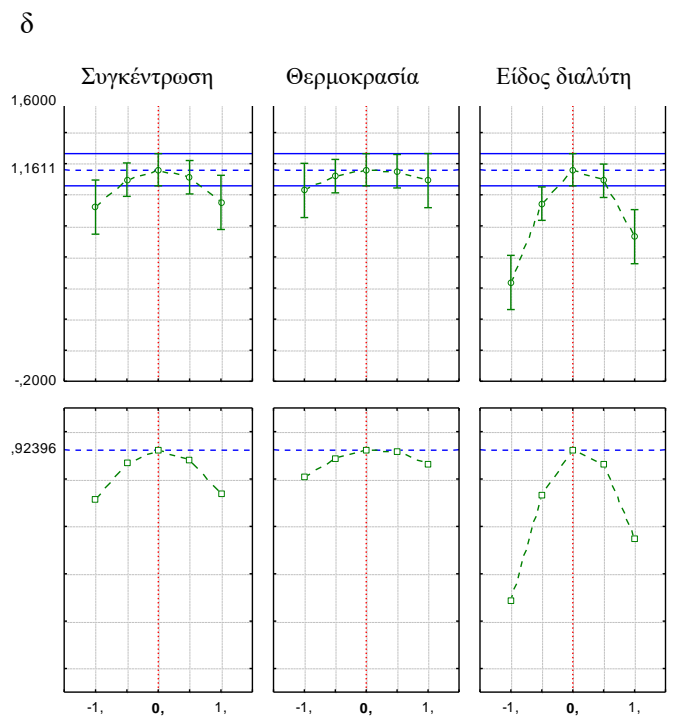
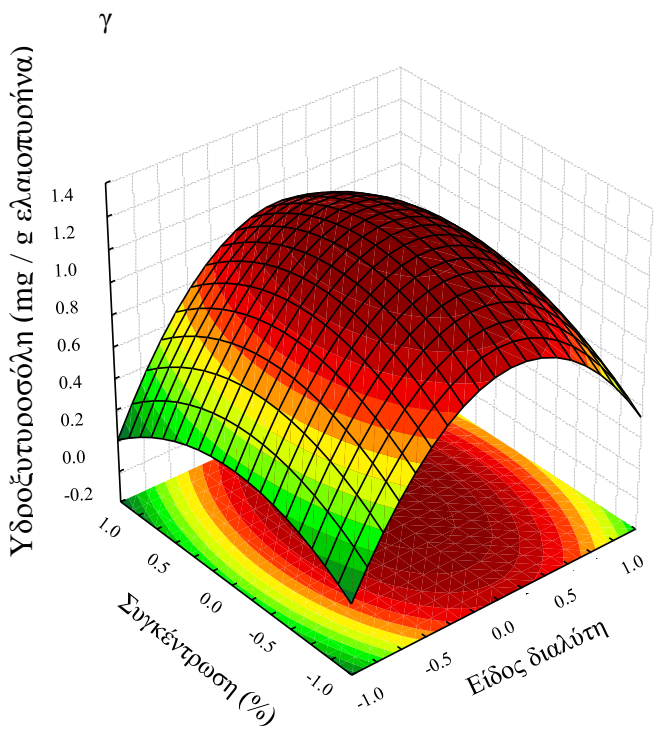
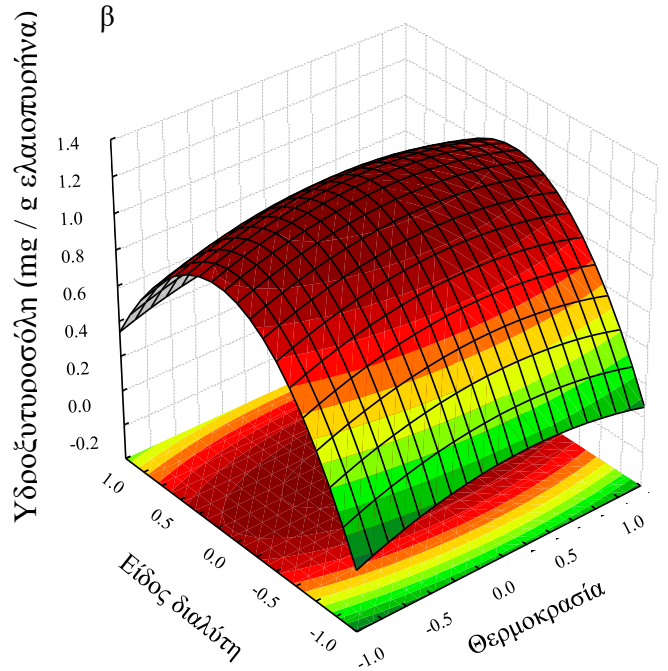
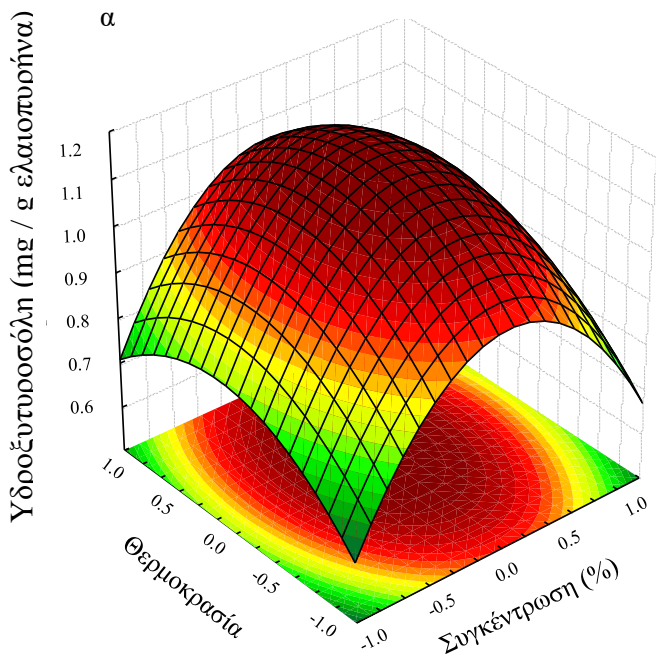
Σχήμα 61. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη απόδοση εκχύλισης



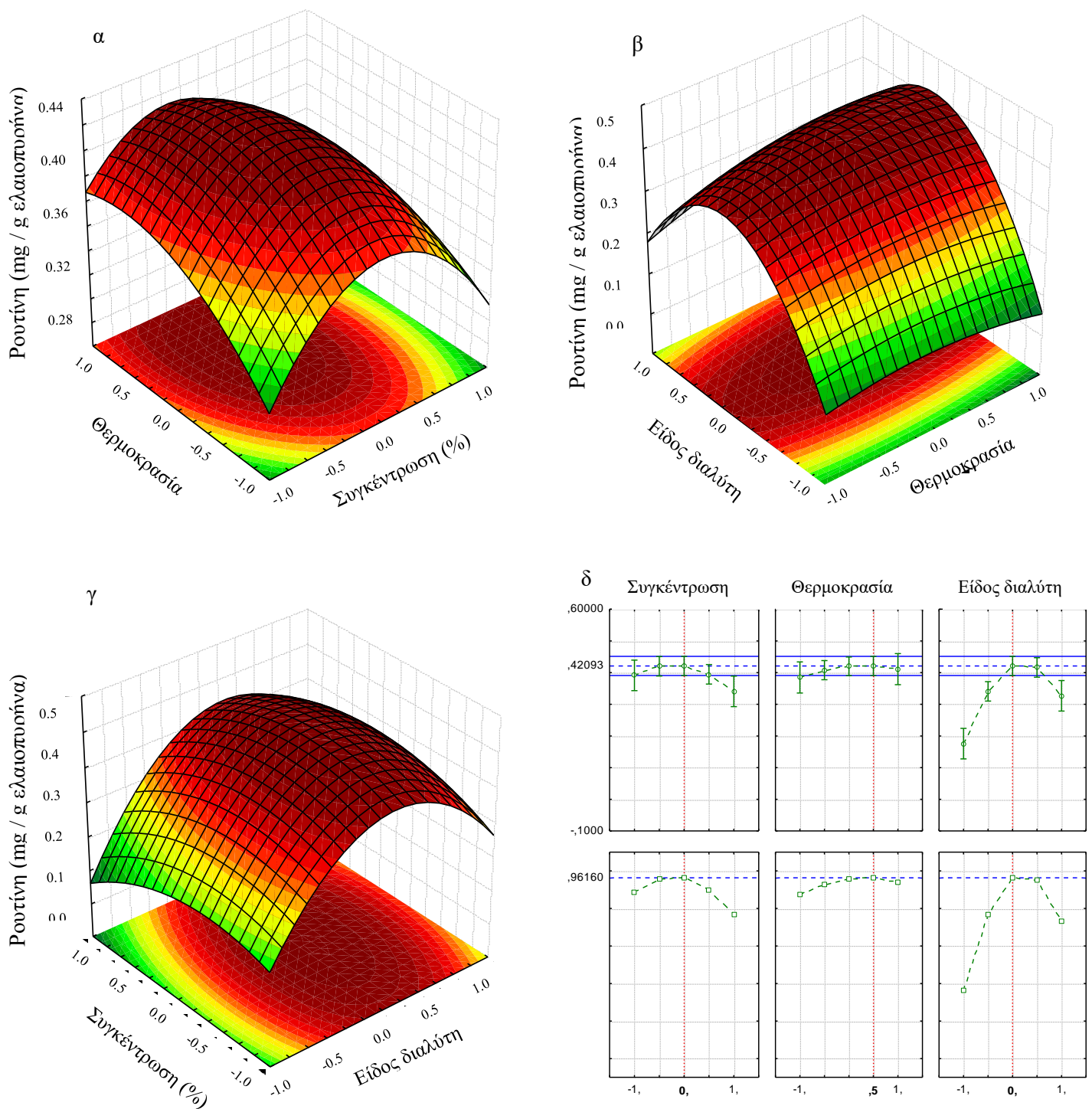
Σχήμα 62. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιουπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη αντιοξειδωτική δράση



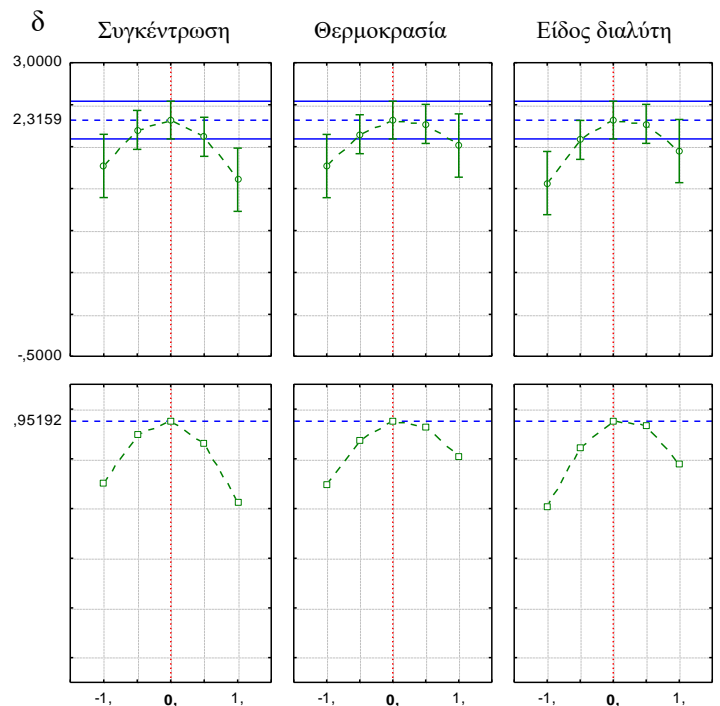
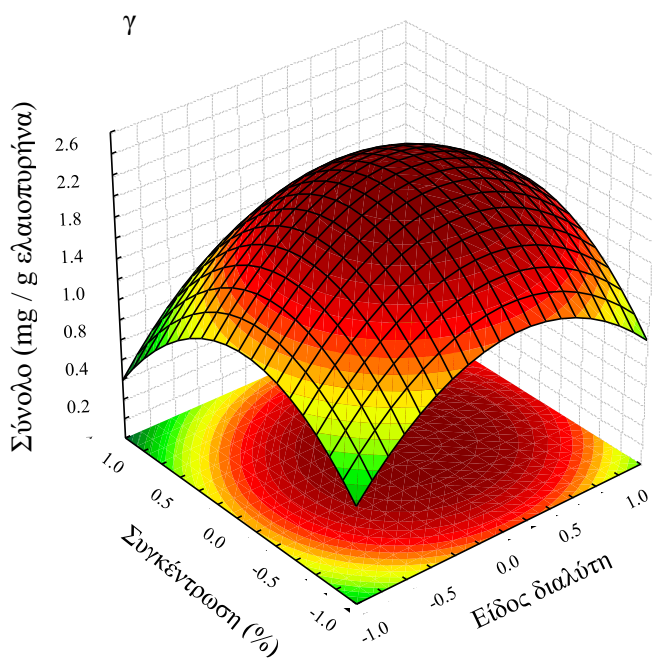
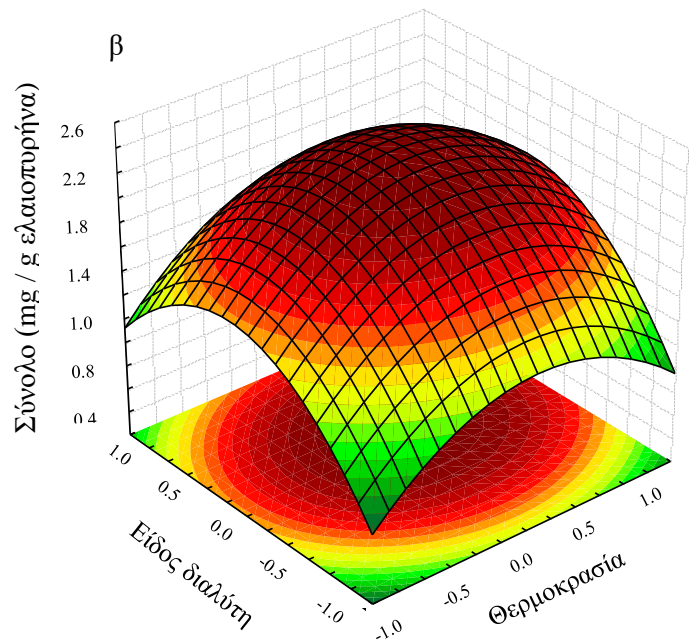
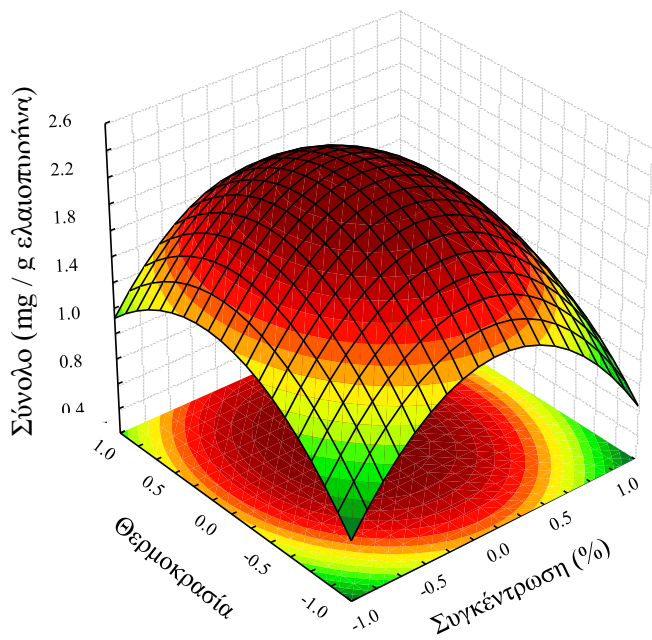
Σχήμα 63. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην ελευρωπαΐνη των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη ελευρωπαΐνη



Σχήμα 64. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στην υδροξυτυροσόλη των εκχυλισμάτων ελαιουπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη υδροξυτυροσόλη



Σχήμα 65. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στη ρουτίνη των εκχυλισμάτων ελαιουπόνηνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για τους διάφορους παράγοντες για μέγιστη ρουτίνη



Σχήμα 66. Γραφήματα αποκριτικής επιφάνειας που δείχνουν την επίδραση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης και του είδους του διαλύτη στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιουπυρήνα με UAE. (α) θερμοκρασία έναντι συγκέντρωσης διαλύτη (είδος διαλύτη=αιθανόλη) (β) είδος διαλύτη έναντι θερμοκρασίας (συγκέντρωση=70%) (γ) συγκέντρωση έναντι είδους διαλύτη (θερμοκρασία=60 °C) (δ) Προφίλ για τις προβλεπόμενες τιμές της εκχύλισης και το επίπεδο ικανοποίησης του μοντέλου για διάφορους παράγοντες για μέγιστο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών

Τέλος, για επικύρωση των προβλεπόμενων μεταβλητών, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας τις αριστοποιημένες παραμέτρους για κάθε μεμονωμένη απόκριση. Στον Πίνακα 39 παρουσιάζονται επίσης τα επίπεδα μεταβλητών που αριστοποιείται κάθε απόκριση, οι τιμές για τις υπόλοιπες αποκρίσεις που προέκυψαν είτε από το μοντέλο είτε πειραματικά. Οι πειραματικές τιμές δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές από τις προβλεπόμενες, υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν ήταν έγκυρα και επαρκή στις προβλέψεις τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη αριστοποίηση της εκχύλισης με χρήση υπερήχων του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση εκχυλισμάτων πλούσιων σε ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), αντιοξειδωτική δράση, και συγκέντρωση ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης, ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών, αντίστοιχα.

4.2.2.2 Σύγκριση των UAE και της CE για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπέρηχους, οι βέλτιστες συνθήκες της UAE συγκρίθηκαν με τις βέλτιστες συνθήκες της συμβατικής εκχύλισης (CE) όσον αφορά το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC), την αντιοξειδωτική δράση, και τη συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης, της υδροξυτυροσόλης, της ρουτίνης και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 40. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις δύο διαφορετικές μεθόδους, βρέθηκε ότι το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος που προέκυψε υπό τις βέλτιστες συνθήκες με χρήση υπερήχων έφθασε το 93% του αντίστοιχου που προέκυψε με τη μέθοδο CE και ότι το εκχύλισμα από τους υπέρηχους εμφάνισε 13% μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με εκείνο από τη CE. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το μέγιστο αποτέλεσμα από την εκχύλιση με υπέρηχους προέκυψε σε μειωμένο χρόνο εκχύλισης (30 min), ενώ το αντίστοιχο αποτέλεσμα με τη μέθοδο CE προέκυψε για χρόνο 4 h. Επιπλέον, το εκχύλισμα που προέκυψε υπό τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με υπέρηχους εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση σε υδροξυτυροσόλη κατά 11% ενώ η συγκέντρωση του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών ήταν παρόμοια (98%) της αντίστοιχης με τη συμβατική μέθοδο (CE). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τη θερμική ευαισθησία των βιοδραστικών ενώσεων, είναι προφανές ότι κάποιες από αυτές τις ενώσεις μπορεί να έχουν υποβαθμιστεί με τη συμβατική μέθοδο λόγω του μεγάλου χρόνου εκχύλισης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος των εκχύλισης με υπέρηχους παρέχει μικρότερο χρόνο εκχύλισης που οδηγεί στην εξοικονόμηση ενέργειας και την επίτευξη εκχυλισμάτων τόσο με υψηλή αντιοξειδωτική δράση όσο και πλούσιων σε βιοδραστικές ενώσεις.

Πίνακας 39. Προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές για τις αποκρίσεις που προέκυψαν στα διάφορα επίπεδα των μεταβλητών

Μεταβλητές διεργασίας			Προβλεπόμενες τιμές						Πειραματικές τιμές ^a					
X1 (%)	X2 (°C)	X3 (δ/της)	TPC	DPPH	OL	HY	RU	SUM	TPC	DPPH	OL	HY	RU	SUM
70	60	αιθανόλη	21,77	20,95	0,674	1,161	0,420	2,316	21,45± 0,12	20,78± 0,05	0,681± 0,009	1,149± 0,015	0,409±0,002	2,387± 0,015
70	70	αιθανόλη	20,62	21,84	0,624	1,109	0,421	2,209	19,84± 0,11	20,98± 0,09	0,597± 0,007	0,999± 0,015	0,425± 0,007	2,288± 0,018

TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

DPPH: Αντιοξειδωτική δράση (g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH)

OL: Ελευρωπαΐνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

HY: Υδροξυτυροσόλη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

RU: Ρουτίνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

SUM-Σύνολο: Σύνολο προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

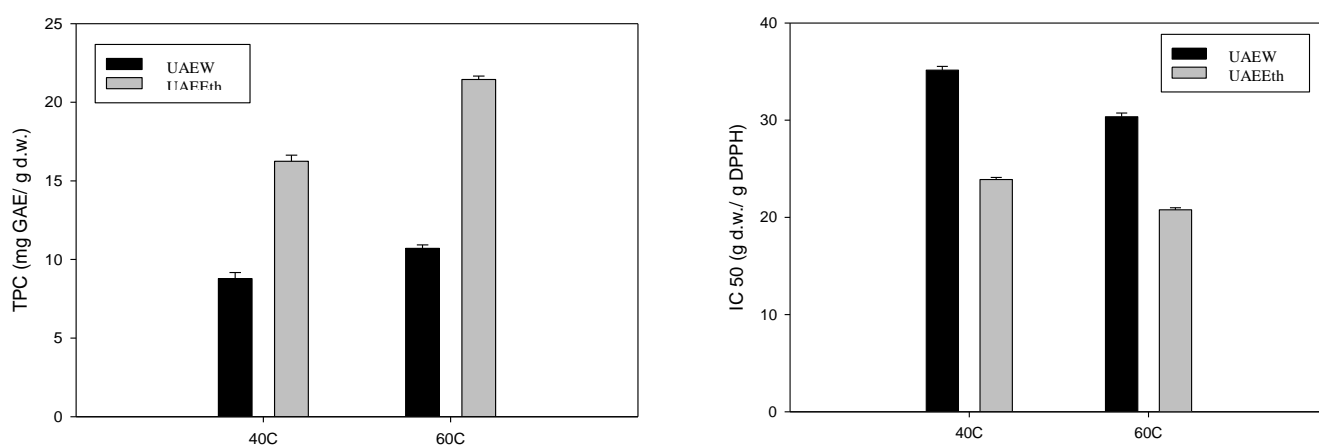
Πίνακας 40. Σύγκριση των UAE και CE

Μέθοδος εκχύλισης	TPC	DPPH	OL	HY	RU	SUM
CE	23,09±0,010	18,05±0,04	0,829±0,021	1,021±0,047	0,498±0,014	2,387±0,021
UAE	21,45± 0,12	20,78± 0,05	0,681± 0,009	1,149± 0,015	0,421±0,002	2,347± 0,015

4.2.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης

Η επίδραση της θερμοκρασίας για την εκχύλιση με υπέρηχους με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης (UAEW) και της εκχύλισης με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων φαίνεται στο Σχήμα 67. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έδειξε σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) με τη θερμοκρασία. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 8,78 έως 10,71 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική εκχύλιση (UAEW) και από 16,25 έως 21,45 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης (UAEEth), αντίστοιχα. Η χρήση αιθανόλης 70% οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά.

Το Σχήμα 67 δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με χρήση υπέρηχων και εφαρμογή υδατικής (UAEW) εκχύλισης και εκχύλισης με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) για διάφορες τιμές θερμοκρασίας. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης επηρεάζονται σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμοκρασία εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα με μέγιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης προέκυψαν με εφαρμογή UAEEth στους 60 °C (20,78 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), ενώ εφαρμόζοντας υδατική εκχύλιση στους 60 °C, προέκυψαν εκχυλίσματα με μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (30,35 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH).



Σχήμα 67. Επίδραση της θερμοκρασίας στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από την υδατική εκχύλιση (UAEW) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) με εφαρμογή υπέρηχων

4.2.2.4 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την εκχύλιση με υπέρηχους με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης (UAEW) και την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 41. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με χρήση της αιθανόλης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με αύξηση της θερμοκρασίας σε όλες τις περιπτώσεις εκχυλίσεων ($P < 0,05$). Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις ήταν η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και η ρουτίνη, ενώ επίσης ανιχνεύθηκε η λουτεολίνη και μικρές ποσότητες καφεϊκού οξέος και βανιλίνης. Υψηλότερες ποσότητες της OL εκχυλίστηκαν με αιθανόλη (0,680 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως με την υδατική εκχύλιση (0,110 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) για 30 min στους 60 °C. Η αιθανόλη 70% ήταν ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση της HY, της RU και γενικότερα του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στα εκχυλίσματα με χρήση υδατικής εκχύλισης.

Πίνακας 41. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εκχύλιση με υπέρηχους και με εφαρμογή της υδατικής εκχύλισης (UAEW) και της εκχύλισης με χρήση αιθανόλης 70% (UAEEth) σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης.

Φαινολικό συστατικό ^a	Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5) - UAEW		Αιθανόλη 70% - UAEEth	
	40°C	60°C	40°C	60°C
OL ^b	0,092±0,012	0,11 ± 0,00	0,320±0,024	0,680±0,010
HY ^b	0,105±0,011	0,23 ± 0,01	0,478±0,016	1,140±0,010
CA ^b	0,002±0,003	0,002±0,001	0,010±0,001	0,012±0,001
VA ^b	0,002±0,007	0,004±0,005	0,012±0,007	0,023±0,008
RU ^b	0,015±0,008	0,021±0,009	0,105±0,014	0,420±0,010
LU ^b	0,006±0,000	0,013±0,007	0,027±0,003	0,045±0,007
Σύνολο ^{bc}	0,222±0,020	0,497±0,013	0,992±0,033	2,320±0,020

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση. ^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β. ^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

4.2.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση μικροκυμάτων (MAE)

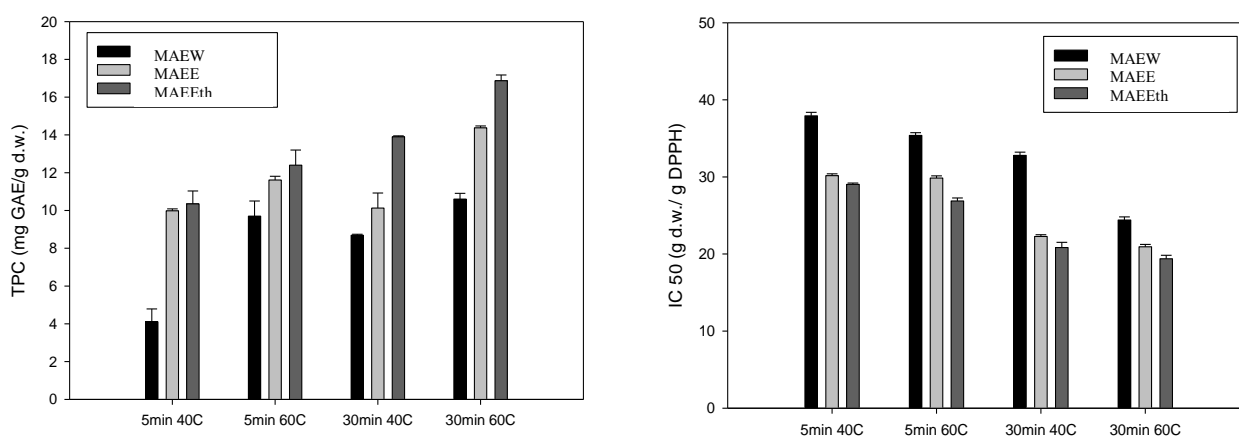
4.2.3.1 *Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης με εφαρμογή της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήση αιθανόλης*

Η μέθοδος MAE είναι μία ακόμη εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόζεται για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους και η απόδοσή της έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η αναλογία στερεού/υγρού, το μέγεθος σωματιδίων, ο χρόνος, ο διαλύτης και η συγκέντρωση του διαλύτη. Η ακτινοβολία μικροκυμάτων 'χαλαρώνει' τη μήτρα των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων και ανοίγει ταχέως και εκτεταμένα τους φυτικούς ιστούς, οδηγώντας σε αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύτη και του στερεού υλικού κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Κατά συνέπεια, η διείσδυση του διαλύτη εκχύλισης αυξάνεται, επιτυγχάνοντας αποτελεσματικά αυξημένη απόδοση εκχύλισης (Ruesgas-Ramon, Figueroa-Espinoza, & Durand, 2017, Bagherian, Ashtiani, Fouladitajar, & Mohtashamy, 2011).

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70 % (MAEEth) και με χρήση μικροκυμάτων του ελαιοπυρήνα για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων φαίνεται στο Σχήμα 68. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έδειξε σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) με τη θερμοκρασία και το χρόνο. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 4,10 έως 10,61 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική εκχύλιση (MAEW), από 9,98 έως 14,37 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και από 10,35 έως 16,87 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης (MAEEth) αντίστοιχα. Η χρήση αιθανόλης 70% και μικροκυμάτων οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, η οποία αποτελεί το ~73% της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων με συμβατική μέθοδο εκχύλισης και έχει προκύψει σε μικρότερο χρόνο (30 min). Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων στους 60 °C για 30 min, προέκυψαν εκχυλίσματα κατά ~21% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη συμβατική μέθοδο στους 60 °C για 4 h (11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEE).

Το Σχήμα 68 δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) και με χρήση μικροκυμάτων για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και χρόνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να παρατηρηθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση επηρεάστηκε σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμοκρασία εκχύλισης, το

χρόνο καθώς και από τη χρήση ενζύμου σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση (MAEW). Η χρήση ενζύμου οδήγησε και σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων σε εκχυλίσματα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τη υδατική εκχύλιση (MAEW). Τα εκχυλίσματα με μέγιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης προέκυψαν με εφαρμογή MAEEth στους 60 °C για 30 min (19,38 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και ήταν 5% λιγότερο δραστικά από εκείνα που προέκυψαν από την εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης στους 60 °C για 4 h. Ωστόσο, εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση στους 60 °C, προέκυψαν εκχυλίσματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνα που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση (20,23 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την MAEE και 24,41 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την MAEW, αντίστοιχα). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμων και μικροκυμάτων παρείχε εκχυλίσματα με καλύτερη αντιοξειδωτική δράση κατά ~9% σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με συμβατική εκχύλιση και χρήση ενζύμων.

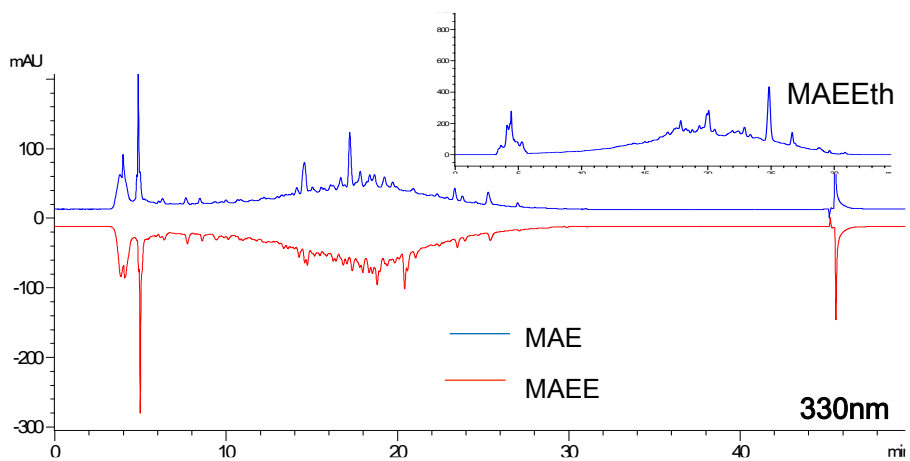
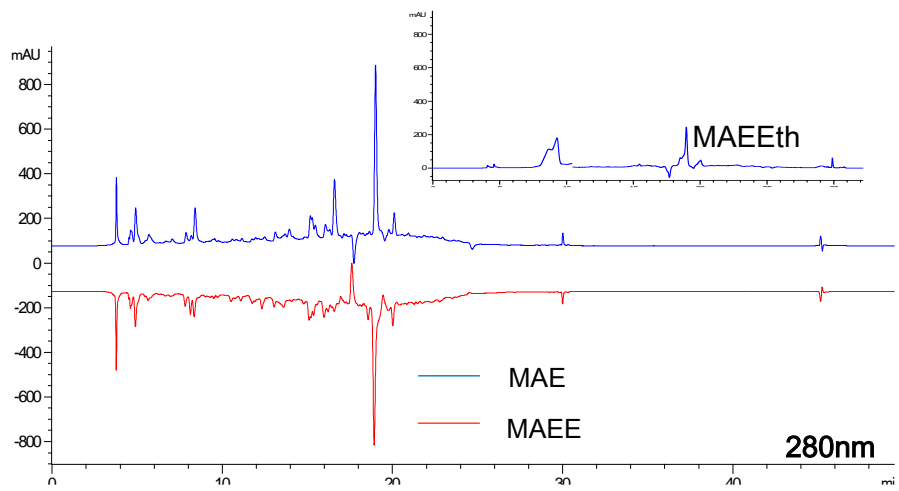


Σχήμα 68. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) και με χρήση μικροκυμάτων για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και χρόνου

4.2.3.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) με χρήση μικροκυμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 42. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με τη χρήση αιθανόλης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με την υδατική ενζυμική

εκχύλιση. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου σε όλες τις περιπτώσεις εκχυλίσεων ($P < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμου και μικροκυμάτων συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση και μικροκύματα. Οι κυρίαρχες φαινολικές ενώσεις ήταν η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και η ρουτίνη, ενώ επίσης ανιχνεύθηκε η λουτεολίνη και μικρές ποσότητες καφεϊκού οξέος και βανιλίνης (Σχήμα 69). Οι υψηλότερες ποσότητες της OL ελήφθησαν με αιθανόλη (1,358-5,328 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως με την υδατική ενζυμική εκχύλιση (0,321-0,549 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) για 5-30 min από 40- 60 °C, αντίστοιχα. Η αιθανόλη 70% με τη χρήση μικροκυμάτων ήταν αποτελεσματική εκχυλίζοντας κατά ~83% περισσότερο την OL σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο. Η χρήση μικροκυμάτων και ενζύμου για 30 min στους 60 °C έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση OL σε σχέση με εκείνα που προέκυψαν με χρήση ενζύμου και συμβατική εκχύλιση στους 60 °C για 4 h. Η αιθανόλη 70% και η χρήση μικροκυμάτων ήταν ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση της ΗΥ (17% μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά μέσο όρο σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο), ωστόσο ο συνδυασμός με τα ένζυμα έδωσε εκχυλίσματα με περιεκτικότητα σε ΗΥ που έφθασε το 86% αυτής με χρήση αιθανόλης ως διαλύτη εκχύλισης για 30 min στους 60 °C και 12% μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά μέσο όρο σε σύγκριση με εκείνα που προέκυψαν με τη συμβατική μέθοδο και τη χρήση ενζύμων στους 60 °C για 4 h. Τα επίπεδα καφεϊκού οξέος και ρουτίνης στα εκχυλίσματα με χρήση υδατικής ενζυμικής εκχύλισης ήταν παρόμοια με εκείνα των αιθανολικών εκχυλισμάτων. Η συγκέντρωση για το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με χρήση μικροκυμάτων εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερη και συγκεκριμένα για 30 min στους 60 °C ήταν κατά 64%, 27% και 28% μεγαλύτερη με χρήση αιθανόλης 70%, υδατικής ενζυμικής και υδατικής εκχύλισης αντίστοιχα, σε σχέση με την αντίστοιχη των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης.



Σχήμα 69. Χρωματογραφήματα των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με υδατική εκχύλιση (MAEW), υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και με χρήση αιθανόλης 70% (MAEEth) και εφαρμογή μικροκυμάτων

Πίνακας 42. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (MAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (MAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (MAEEth) με χρήση μικροκυμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης

Φαινολικό Συστατικό ^a	Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5) - MAEW				Υδατική ενζυμική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5 + ένζυμο 1% v/v) - MAEE				Αιθανόλη 70% - MAEEth			
	5min 40°C	5min 60°C	30min 40°C	30min 60°C	5min 40°C	5min 60°C	30min 40°C	30min 60°C	5min 40°C	5min 60°C	30min 40°C	30min 60°C
OL^b	0,206±0,013 ^b	0,247±0,021 ^b	0,257±0,014 ^b	0,316±0,01 ^b	0,321±0,012 ^b	0,434±0,014 ^b	0,469±0,014 ^b	0,549±0,023 ^b	1,358±0,045 ^a	3,445±0,054 ^a	4,420±0,034 ^a	5,328±0,023 ^a
HY^b	0,733±0,012 ^b	0,745±0,049 ^b	0,805±0,012 ^b	0,820±0,076 ^b	0,773±0,025 ^{ab}	0,825±0,012 ^{ab}	0,877±0,018 ^{ab}	1,020±0,029 ^{ab}	0,789±0,015 ^a	0,858±0,029 ^a	0,878±0,056 ^a	1,175±0,026 ^a
CA^b	0,002±0,001 ^b	0,003±0,001 ^b	0,003±0,001 ^b	0,004±0,001 ^b	0,006±0,001 ^a	0,007±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,011±0,001 ^a	0,006±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,010±0,001 ^a	0,014±0,001 ^a
VA^b	0,014±0,002	0,018±0,002	0,012±0,007	0,014±0,005	0,014±0,008	0,016±0,005	0,017±0,003	0,018±0,003	0,011±0,012	0,014±0,008	0,015±0,007	0,020±0,008
RU^b	0,080±0,003 ^b	0,085±0,010 ^b	0,086±0,009 ^b	0,091±0,009 ^b	0,116±0,009 ^a	0,135±0,003 ^a	0,174±0,007 ^a	0,226±0,008 ^a	0,175±0,003 ^a	0,188±0,010 ^a	0,215±0,014 ^a	0,267±0,010 ^a
LU^b	0,54±0,030	0,63±0,011	0,66±0,003	0,73±0,007	0,60±0,004	0,62±0,006	0,87±0,002	0,86±0,004	0,124±0,003	0,141±0,003	0,172±0,003	0,210±0,007
Σύνολο^{bc}	1,575±0,035 ^b	1,728±0,056 ^b	1,823±0,022 ^b	1,975±0,078 ^b	1,830±0,031 ^{ab}	2,037±0,020 ^{ab}	2,415±0,024 ^{ab}	2,463±0,038 ^{ab}	4,654±0,049 ^a	5,710±0,063 ^a	5,740±0,067 ^a	7,040±0,038 ^a

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

4.2.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE)

4.2.4.1 *Επίδραση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ανάδευσης με εφαρμογή της υδατικής, υδατικής ενζυμικής εκχύλισης, χρήσης αιθανόλης και ενζυμικής προκατεργασίας*

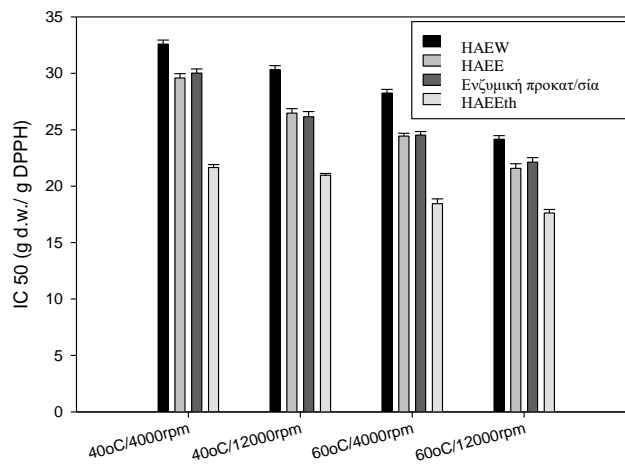
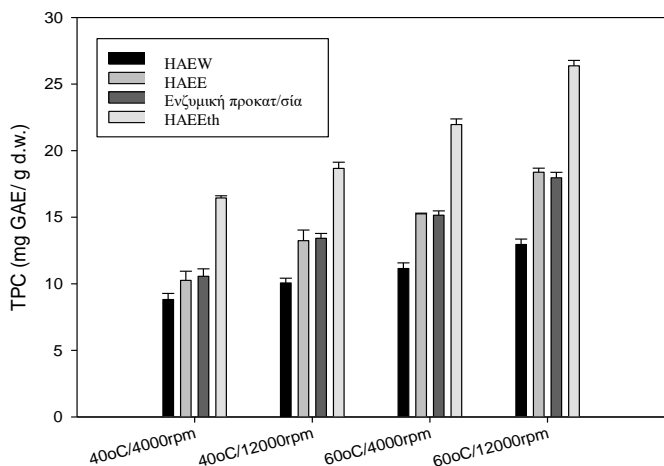
Η μέθοδος HAE εφαρμόζεται ως μία καινοτόμος μέθοδος εκχύλισης με πολλές εφαρμογές στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους. Η HAE βασίζεται σε έναν περιστρεφόμενο εσωτερικό κόπτη κινούμενο από κινητήρα υψηλής ταχύτητας, ο οποίος παράγει μία ισχυρή δύναμη διάτμησης μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών κοπτικών, λύνει τα κυτταρικά τοιχώματα και αναμιγνύει το στερεό υλικό με το διαλύτη. Η μεταφορά μάζας μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη συμβαίνει λόγω της διαφοράς πίεσης μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών κοιλοτήτων που προκαλούνται από την υψηλή ταχύτητα περιστροφής (Guo et al., 2017).

Η θερμοκρασία και η ταχύτητα ανάδευσης είναι οι σημαντικότερες παράμετροι που επηρεάζουν την HAE, για αυτό το λόγο αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα. Στο Σχήμα 70 παρουσιάζεται η επίδραση των παραμέτρων αυτών στην υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) και με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα. Επιπλέον, εξετάστηκε η ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα, όπου ο σπόρος παρέμεινε εμποτισμένος με το ενζυμικό διάλυμα (1% v/v) για επώαση στους 40 °C για 1 h και στη συνέχεια ακολούθησε η εκχύλιση με τον ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE) στις συνθήκες που είχαν επιλεγεί. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 70.

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έδειξε σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) με τη θερμοκρασία και την ταχύτητα ανάδευσης. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 8,82 έως 12,95 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική εκχύλιση (HAEW), από 10,26 έως 18,38 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE), από 10,56 έως 17,96 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την ενζυμική προκατεργασία και από 16,45 έως 26,37 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης (HAEEth), αντίστοιχα. Η χρήση αιθανόλης 70% και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, η οποία είναι κατά 12% μεγαλύτερη της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων με συμβατική μέθοδο εκχύλισης και έχει

προκύψει σε μικρότερο χρόνο (30 min). Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας στους 60 °C στις 12000 rpm για 30 min, ελήφθησαν εκχυλίσματα κατά ~37% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την υδατική και ενζυμική εκχύλιση με τη συμβατική μέθοδο στους 60 °C για 4 h (11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την CEE) και 20% περισσότερο από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την υδατική και ενζυμική εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων στους 60 °C για 30 min (14,37 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για τη MAEE). Τα αποτελέσματα για την ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα δεν διαφοροποιήθηκαν από εκείνα της υδατικής και ενζυμικής εκχύλισης χωρίς προκατεργασία, συμπεραίνοντας ότι η δράση του μίγματος των ενζύμων είναι επαρκής κατά τη διάρκεια της HAE.

Το Σχήμα 70 δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται για την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) και με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και ταχύτητας ανάδευσης. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης επηρεάστηκαν σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμοκρασία εκχύλισης, την ταχύτητα ανάδευσης καθώς και από τη χρήση ενζύμου σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση (HAEW). Η χρήση ενζύμου οδήγησε και σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε εκχυλίσματα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τη υδατική εκχύλιση (MAEW), ενώ η ενζυμική προκατεργασία δεν επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε σχέση με την υδατική και ενζυμική εκχύλιση χωρίς προκατεργασία. Τα εκχυλίσματα με τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση προέκυψαν με εφαρμογή HAEEth στους 60 °C στις 12000 rpm για 30 min (17,62 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και ήταν περίπου 5% πιο δραστικά από εκείνα που προέκυψαν από την εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης στους 60 °C για 4 h. Ωστόσο, εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση στους 60 °C και 12000 rpm, προέκυψαν εκχυλίσματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνα που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση (21,58 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HAEE και 24,16 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HAEW, αντίστοιχα). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμων και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας έδωσε εκχυλίσματα με καλύτερη αντιοξειδωτική δράση κατά ~4% σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με συμβατική εκχύλιση και χρήση ενζύμων.



Σχήμα 70. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) και με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για διάφορες τιμές θερμοκρασίας και ταχύτητας ανάδευσης

4.2.4.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEE), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες θερμοκρασίες και ταχύτητες ανάδευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 43. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με τη χρήση αιθανόλης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με την υδατική και ενζυμική εκχύλιση. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με αύξηση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ανάδευσης σε όλες τις περιπτώσεις εκχυλίσεων ($P < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμου και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση και τη χρήση μικροκυμάτων. Η ενζυμική προκατεργασία έδωσε εκχυλίσματα με συγκεντρώσεις παρόμοιες με εκείνες των εκχυλισμάτων της υδατικής και ενζυμικής εκχύλισης χωρίς προκατεργασία. Οι κυρίαρχες φαινολικές ενώσεις ήταν η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και η ρουτίνη, ενώ επίσης

ανιχνεύθηκε η λουτεολίνη και μικρές ποσότητες καφεϊκού οξέος και βανιλίνης. Η υψηλότερη συγκέντρωση της OL ελήφθη με αιθανόλη (4,11-6,34 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως με την υδατική ενζυμική εκχύλιση (0,45-0,59 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) για 4000-12000 rpm από 40-60 °C, αντίστοιχα. Η αιθανόλη 70% με τη χρήση ομογενοποιητή ταχύτητας ήταν αποτελεσματική εκχυλίζοντας κατά ~86% περισσότερο την OL σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο. Η χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας και ενζύμου έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση ΗΥ με αυτά που προέκυψαν με χρήση αιθανόλης 70%. Τα επίπεδα ρουτίνης στα αιθανολικά εκχυλίσματα ήταν μεγαλύτερα σε σύγκριση με αυτά της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης. Το επίπεδο για το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με τη χρήση αιθανόλης 70%, εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερο και συγκεκριμένα για 30 min στους 60 °C και στις 12000 rpm ήταν κατά 67% μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των αντίστοιχων εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο εκχύλισης.

Πίνακας 43. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (HAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HAEΕ), την ενζυμική προκατεργασία και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HAEEth) με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας σε διάφορες θερμοκρασίες και ταχύτητες ανάδευσης

Διαλύτης	Συνθήκες HAE T (°C)/ HS (rpm)	Φαινολικά συστατικά (mg / g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ^a						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5)	40 / 4000	0,31 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,02 ^b	0,004 ± 0,000	0,007 ± 0,001 ^a	0,03 ± 0,07 ^c	0,001 ± 0,00 ^c	0,56 ± 0,07 ^b
	40 / 12000	0,40 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,02 ^b	0,007 ± 0,000	0,009 ± 0,001 ^a	0,05 ± 0,05 ^c	0,001 ± 0,00 ^c	0,69 ± 0,06 ^b
	60 / 4000	0,44 ± 0,03 ^b	0,23 ± 0,05 ^b	0,009 ± 0,000,	0,014 ± 0,001 ^a	0,09 ± 0,05 ^c	0,002 ± 0,00 ^c	0,79 ± 0,06 ^b
	60 / 12000	0,46 ± 0,09 ^b	0,24 ± 0,05 ^b	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,001 ^a	0,10 ± 0,02 ^c	0,01 ± 0,00 ^c	0,84 ± 0,10 ^b
Υδατική ενζυμική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5 + ένζυμο 1% v/v)	40 / 4000	0,45 ± 0,01 ^b	0,22 ± 0,04 ^a	0,007 ± 0,000	0,007 ± 0,001 ^a	0,11 ± 0,07 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	0,81 ± 0,08 ^b
	40 / 12000	0,46 ± 0,07 ^b	0,28 ± 0,02 ^a	0,008 ± 0,000	0,011 ± 0,001 ^a	0,19 ± 0,05 ^b	0,02 ± 0,00 ^b	0,97 ± 0,09 ^b
	60 / 4000	0,51 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,07 ^a	0,009 ± 0,000,	0,015 ± 0,001 ^a	0,26 ± 0,05 ^b	0,02 ± 0,00 ^b	1,11 ± 0,09 ^b
	60 / 12000	0,59 ± 0,09 ^b	0,31 ± 0,03 ^a	0,01 ± 0,00	0,022 ± 0,001 ^a	0,33 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,00 ^b	1,31 ± 0,09 ^b
Προ- κατεργασία με ένζυμο	40 / 4000	0,44 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,02 ^a	0,007 ± 0,000	0,007 ± 0,001 ^a	0,10 ± 0,04 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	0,79 ± 0,05 ^b
	40 / 12000	0,45 ± 0,03 ^b	0,29 ± 0,04 ^a	0,008 ± 0,000	0,011 ± 0,001 ^a	0,19 ± 0,06 ^b	0,03 ± 0,01 ^b	0,98 ± 0,07 ^b
	60 / 4000	0,49 ± 0,06 ^b	0,30 ± 0,05 ^a	0,009 ± 0,000,	0,015 ± 0,001 ^a	0,25 ± 0,05 ^b	0,04 ± 0,00 ^b	1,10 ± 0,09 ^b
	60 / 12000	0,57 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,03 ^a	0,011 ± 0,00	0,020 ± 0,001 ^a	0,33 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,00 ^b	1,29 ± 0,04 ^b
Αιθανόλη 70%	40 / 4000	4,11 ± 0,55 ^a	0,24 ± 0,06 ^a	0,009 ± 0,000	0,005 ± 0,05 ^b	0,30 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	4,69 ± 0,55 ^a
	40 / 12000	5,18 ± 0,45 ^a	0,30 ± 0,04 ^a	0,009 ± 0,000,	0,008 ± 0,06 ^b	0,34 ± 0,05 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	5,89 ± 0,46 ^a
	60 / 4000	5,84 ± 0,16 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	0,010 ± 0,00	0,008 ± 0,03 ^b	0,47 ± 0,04 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	6,70 ± 0,16 ^a
	60 / 12000	6,34 ± 0,15 ^a	0,32 ± 0,01 ^a	0,010 ± 0,00	0,010 ± 0,08 ^b	0,66 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	7,42 ± 0,18 ^a

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

4.2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με χρήση υδροστατικής υπερυψηλής πίεσης (ΗΗΡΑΕ)

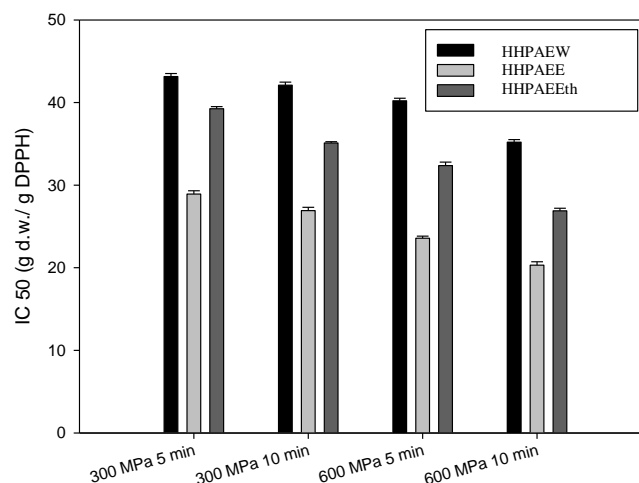
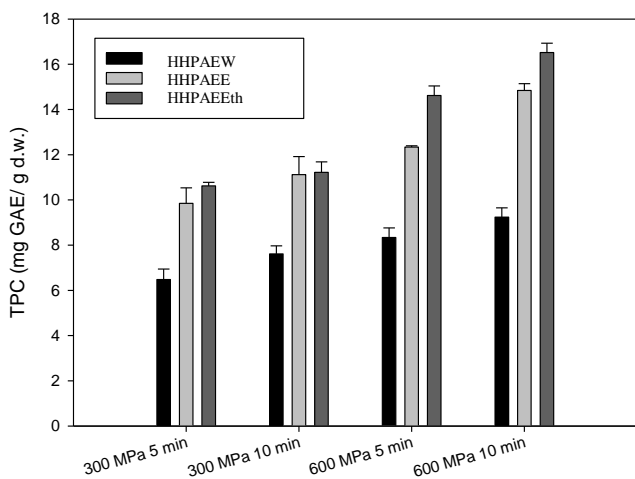
4.2.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης με εφαρμογή της υδατικής, υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήσης αιθανόλης

Η μέθοδος ΗΗΡΑΕ εφαρμόζεται ως μία νέα μέθοδος εκχύλισης με πολλές εφαρμογές τελευταία στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους. Η επεξεργασία με υψηλή πίεση αυξάνει το ρυθμό μεταφοράς μάζας και ενισχύει την είσοδο του διαλύτη στα κύτταρα της στερεής μήτρας, διαταράσσοντας τα κυτταρικά τοιχώματα και οδηγώντας σε υψηλότερη διαπερατότητα (Barbosa-Canovas, GV Pothakamury, Palou, & Swanson, 1998, Prasad, Yang, Yi, Zhao, & Jiang, 2009). Έχει επίσης την ικανότητα να αποπρωτονιώνει τις φορτισμένες ομάδες και να διαταράσσει τους υδρόφοβους δεσμούς στις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων (Briones-Labarca, Plaza-Morales, Giovagnoli-Vicuna, & Fabiola, 2015, Barbosa-Canovas, GV Pothakamury et al., 1998).

Η πίεση και ο χρόνος είναι κάποιοι από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την ΗΗΡΑΕ, για αυτό το λόγο αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα. Στο Σχήμα 71 παρουσιάζεται η επίδραση των παραμέτρων αυτών στην υδατική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕΕ) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (ΗΗΡΑΕEth) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα. Επιπλέον, εξετάστηκε η ενζυμική προκατεργασία του ελαιοπυρήνα, όπου ο σπόρος παρέμεινε εμποτισμένος με το ενζυμικό διάλυμα (1% v/v) για επώαση στους 40 °C για 1 h και στη συνέχεια ακολούθησε η εκχύλιση με ΗΗΡ για 10 min στα 600 MPa. Μετρήθηκε το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών καθώς και η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος που ελήφθη και προέκυψε ότι τα αποτελέσματα με την ενζυμική προκατεργασία ήταν παρόμοια με αυτά της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης χωρίς προκατεργασία, οπότε και δεν ακολούθησε περαιτέρω πειραματικός σχεδιασμός. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έδειξε σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) με την πίεση και το χρόνο της εκχύλισης. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 6,48 έως 9,25 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕW), από 9,85 έως 14,84 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική ενζυμική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕΕ), και από 10,62 έως 16,52 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την εκχύλιση με χρήση αιθανόλης (ΗΗΡΑΕEth), αντίστοιχα. Η χρήση αιθανόλης 70% και η υδατική ενζυμική εκχύλιση σε συνδυασμό με την υψηλή υδροστατική πίεση οδήγησε στην ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη

περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα αποτελούν το ~71% της αντίστοιχης περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων με συμβατική μέθοδο εκχύλισης και έχουν προκύψει σε μικρότερο χρόνο (10 min). Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι εφαρμόζοντας την υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης στα 600 MPa για 10 min, προέκυψαν εκχυλίσματα κατά ~23% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη συμβατική μέθοδο στους 60 °C για 4 h (11,41 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. για την υδατική ενζυμική εκχύλιση-CEE) και 36% περισσότερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση και τη χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης στα 600 MPa για 10 min (9,24 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.).

Το Σχήμα 71 δείχνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με την υδατική εκχύλιση (HHPAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης για διάφορες τιμές πίεσης και χρόνου. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται σημαντικά ($P < 0,05$) από την πίεση, το χρόνο καθώς και από τη χρήση ενζύμου σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση (HHPAEW). Η χρήση ενζύμου οδήγησε σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε εκχυλίσματα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τη υδατική εκχύλιση (MAEW) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70%. Τα εκχυλίσματα με τη μέγιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης προέκυψαν με εφαρμογή HHPAEEE στα 600 MPa για 10 min (20,32 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) και ήταν περίπου 90% εξίσου δραστικά με εκείνα που προέκυψαν από την εφαρμογή της συμβατικής εκχύλισης με ένζυμα στους 60 °C για 4 h, καθώς και 73% και 32%, αντίστοιχα πιο δραστικά σε σύγκριση αυτά που προέκυψαν με την υδατική εκχύλιση και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (35,21 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HHPAEW και 26,85 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH για την HHPAEEth, αντίστοιχα).



Σχήμα 71. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με την υδατική εκχύλιση (HHPAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE) και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) με εφαρμογή υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης για διάφορες τιμές πίεσης και χρόνου

4.2.5.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (HHPAEW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (HHPAEE), και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (HHPAEEth) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε διάφορες πιέσεις και χρόνους εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 44. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με χρήση της αιθανόλης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με την υδατική και ενζυμική εκχύλιση. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με την αύξηση της πίεσης και του χρόνου εκχύλισης σε όλες τις περιπτώσεις εκχυλίσεων ($P < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμου και υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση. Οι κυρίαρχες φαινολικές ενώσεις ήταν η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη και η ρουτίνη, ενώ επίσης ανιχνεύθηκε η λουτεολίνη και μικρές ποσότητες καφεϊκού οξέος και βανιλίνης. Η υψηλότερη συγκέντρωση της OL ελήφθη με αιθανόλη (2,11-4,42 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως από την υδατική ενζυμική εκχύλιση (0,45-0,79 mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) για 300-600 MPa από 5-10 min, αντίστοιχα. Η αιθανόλη 70% με τη χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης ήταν αποτελεσματική εκχυλίζοντας κατά ~84% περισσότερο την OL σε σύγκριση με

τη συμβατική μέθοδο. Η χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης και ενζύμου έδωσε εκχυλίσματα με παρόμοια συγκέντρωση ΗΥ και RU σε σχέση με εκείνα που προέκυψαν με χρήση αιθανόλης 70%. Η συγκέντρωση για το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με τη χρήση αιθανόλης 70%, εμφανίστηκε γενικότερα μεγαλύτερη και συγκεκριμένα στα 600 MPa για 10 min ήταν κατά 52% μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των αντίστοιχων εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο εκχύλισης (στους 60 °C για 4 h).

Πίνακας 44. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα για την υδατική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕW), την υδατική ενζυμική εκχύλιση (ΗΗΡΑΕΕ), και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% (ΗΗΡΑΕΕth) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε διάφορες πιέσεις και χρόνους.

Διαλύτης	Συνθήκες ΗΗΡΑΕ HP (MPa)/ t (min)	Φαινολικά συστατικά (mg / g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ^a						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5)	300 / 5	0,11 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,02 ^b	0,000 ± 0,000 ^b	0,001 ± 0,000 ^c	0,05 ± 0,07 ^b	0,010 ± 0,00	0,38 ± 0,07 ^b
	300 / 10	0,12 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,02 ^b	0,000 ± 0,000 ^b	0,001 ± 0,000 ^c	0,07 ± 0,05 ^b	0,014 ± 0,00	0,42 ± 0,06 ^b
	600 / 5	0,14 ± 0,03 ^b	0,23 ± 0,02 ^b	0,000 ± 0,000 ^b	0,004 ± 0,000 ^c	0,12 ± 0,05 ^b	0,022 ± 0,00	0,52 ± 0,06 ^b
	600 / 10	0,19 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,02 ^b	0,001 ± 0,000 ^b	0,005 ± 0,000 ^c	0,20 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01	0,68 ± 0,03 ^b
Υδατική ενζυμική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5 + ένζυμο 1% v/v)	300 / 5	0,45 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,04 ^a	0,005 ± 0,000 ^a	0,006 ± 0,001 ^a	0,15 ± 0,07 ^a	0,01 ± 0,00	0,87 ± 0,08 ^b
	300 / 10	0,56 ± 0,05 ^b	0,29 ± 0,02 ^a	0,008 ± 0,000 ^a	0,012 ± 0,001 ^a	0,19 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,00	1,08 ± 0,09 ^b
	600 / 5	0,61 ± 0,02 ^b	0,32 ± 0,07 ^a	0,009 ± 0,000 ^a	0,014 ± 0,001 ^a	0,21 ± 0,05 ^a	0,03 ± 0,00	1,19 ± 0,09 ^b
	600 / 10	0,79 ± 0,02 ^b	0,38 ± 0,03 ^a	0,012 ± 0,00 ^a	0,021 ± 0,001 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,00	1,46 ± 0,09 ^b
Αιθανόλη 70%	300 / 5	2,11 ± 0,45 ^a	0,20 ± 0,05 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,005 ± 0,05 ^b	0,10 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,00	2,43 ± 0,45 ^a
	300 / 10	3,18 ± 0,25 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,006 ± 0,04 ^b	0,14 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,01	3,65 ± 0,26 ^a
	600 / 5	3,84 ± 0,26 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	0,000 ± 0,00 ^b	0,008 ± 0,03 ^b	0,17 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,00	4,35 ± 0,26 ^a
	600 / 10	4,42 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,001 ± 0,000 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00	5,13 ± 0,02 ^a

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

4.2.6 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES)

Ο στόχος της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μία αποτελεσματική, ταχεία και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος εκχύλισης των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα χρησιμοποιώντας νέους πράσινους ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) σε συνδυασμό με τις εναλλακτικές καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης, όπως με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, μικροκυμάτων, υπερήχων και υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά συστήματα ευτηκτικών διαλυτών (NADES) που αποτελούνται από μίγμα χλωριούχου χολίνης με μαλτόζη, γλυκερόλη, κιτρικό οξύ και γαλακτικό οξύ και εφαρμόστηκαν διαφορετικές λειτουργικές παράμετροι, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών, την αντιοξειδωτική τους δράση και την ανάκτηση ορισμένων φαινολικών ενώσεων και παράλληλα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με υδατική εκχύλιση (ρυθμιστικό διάλυμα pH=4,5) και με αιθανόλη 70% για τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης.

4.2.6.1 Προετοιμασία και φυσικοχημικές ιδιότητες των ευτηκτικών διαλυτών

Οι ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανάκτησης φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα παρουσιάζονται στον Πίνακα 45 και στο Σχήμα 72.

Πίνακας 45. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης

Συστατικά		αναλογία moles	Κωδικός	Εμφάνιση
Συστατικό 1	Συστατικό 2			
Χλωριούχος χολίνη	Κιτρικό οξύ	1:2	DES-CA	Διαφανές άχρωμο υγρό
	Γαλακτικό οξύ		DES-LA	Διαφανές άχρωμο υγρό
	Μαλτόζη		DES-MA	Διαφανές ανοιχτό κίτρινο παχύρρευστο υγρό
	Γλυκερόλη		DES-GLy	Διαφανές άχρωμο υγρό

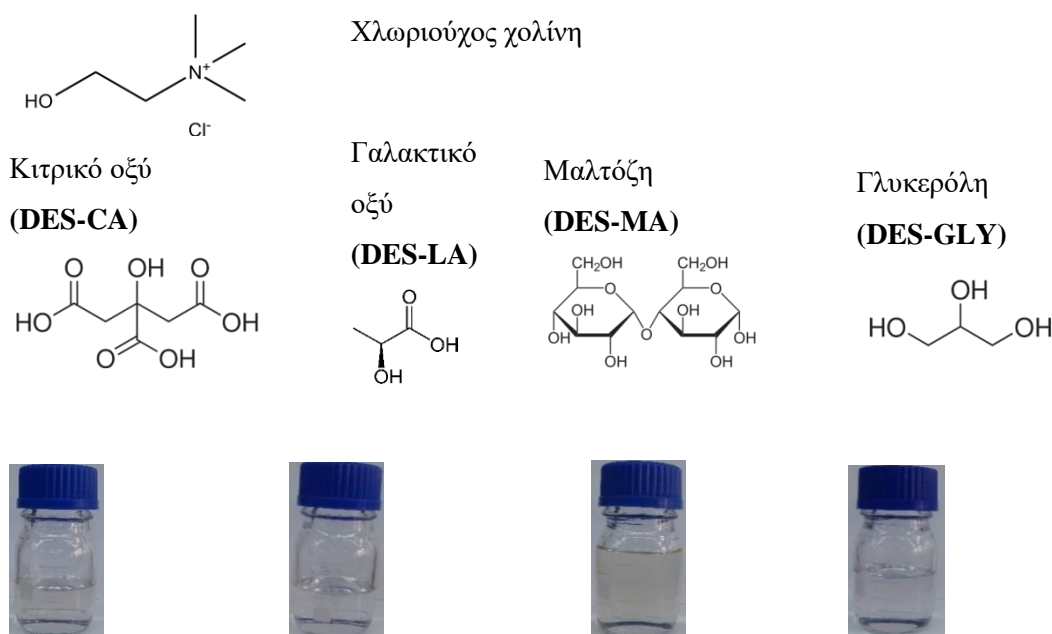
Δεδομένου ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη επηρεάζουν την ικανότητα εκχύλισης των επιθυμητών ενώσεων από μία στερεή μήτρα, μετρήθηκαν οι βασικές ιδιότητες των διαλυτών όπως η πυκνότητα, το ιξώδες, ο δείκτης διάθλασης και η επιφανειακή τάση (Πίνακας 46).

Η πυκνότητα όλων των ευτηκτικών διαλυτών ήταν υψηλότερη από εκείνη του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την υδατική εκχύλιση, και της αιθανόλης 70% v/v.

Το ιξώδες αποτελεί ένα σημαντικό περιορισμό της εφαρμογής των ευτηκτικών διαλυτών λόγω του χαμηλού ρυθμού μεταφοράς μάζας (Ruesgas-Ramon et al., 2017, Wei et al., 2015), ενώ επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το ποσοστό του νερού που προστίθεται στο μίγμα. Έτσι, προστέθηκε 20% (v/v) νερό στους ευτηκτικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Το ιξώδες όλων των ευτηκτικών διαλυτών, μετά την προσθήκη του νερού, εμφάνισε υψηλότερες τιμές από εκείνες του ρυθμιστικού διαλύματος και της αιθανόλης 70% v/v, ακολουθώντας την εξής σειρά: DES-MA>DES-CA>DES-Gly>DES-LA.

Η επιφανειακή τάση είναι σημαντική ιδιότητα αφού ένας διαλύτης χαμηλής επιφανειακής τάσης μπορεί να διαχυθεί εύκολα μέσα στη στερεή μήτρα. Η επιφανειακή τάση των διαλυτών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Bi, Tian, & Ho, 2013). Η επιφανειακή τάση των ευτηκτικών διαλυτών διέφερε από εκείνη του ρυθμιστικού διαλύματος και της αιθανόλης 70% v/v, ακολουθώντας την ίδια σειρά με τις τιμές του ιξώδους.

Το ιξώδες και η επιφανειακή τάση μετρήθηκαν στις θερμοκρασίες (40 και 60 °C) που εφαρμόστηκαν τα πειράματα εκχύλισης και παρατηρήθηκε ότι το ιξώδες και η επιφανειακή τάση των NADES μειώθηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία (60 °C) και ως εκ τούτου αναμένεται να βελτιωθεί αντίστοιχα η απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων στο διαλύτη (Huang et al., 2016).



Σχήμα 72. Ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εκχύλισης

Πίνακας 46. Φυσικοχημικές ιδιότητες των ευτηκτικών διαλυτών

Διαλύτης	Νερό (%)	Πυκνότητα (40°C) (Kg/m ³)	Ιξώδες (50 rpm) (cP)		Επιφανειακή τάση (mN/m)	
			40 °C	60 °C	40 °C	60 °C
			DES-CA	20	1,311 ± 0,015	448,1 ± 0,95
DES-LA	20	1,134 ± 0,010	29,5 ± 0,87	9,6 ± 0,48	42,42 ± 0,12	32,02 ± 0,11
DES-MA	20	1,431 ± 0,026	975,5 ± 1,02	331,2 ± 1,09	74,49 ± 0,90	37,36 ± 1,12
DES-GLY	20	1,164 ± 0,017	47,5 ± 0,59	23,4 ± 0,98	56,12 ± 0,14	42,55 ± 0,07
Νερό	100	0,992 ± 0,012	0,653 ± 0,010	0,466 ± 0,011	69,52 ± 0,12	66,20 ± 0,10
Αιθανόλη 70%	30	0,886 ± 0,010	1,31 ± 0,05	0,86 ± 0,05	23,76 ± 0,08	22,92 ± 0,06

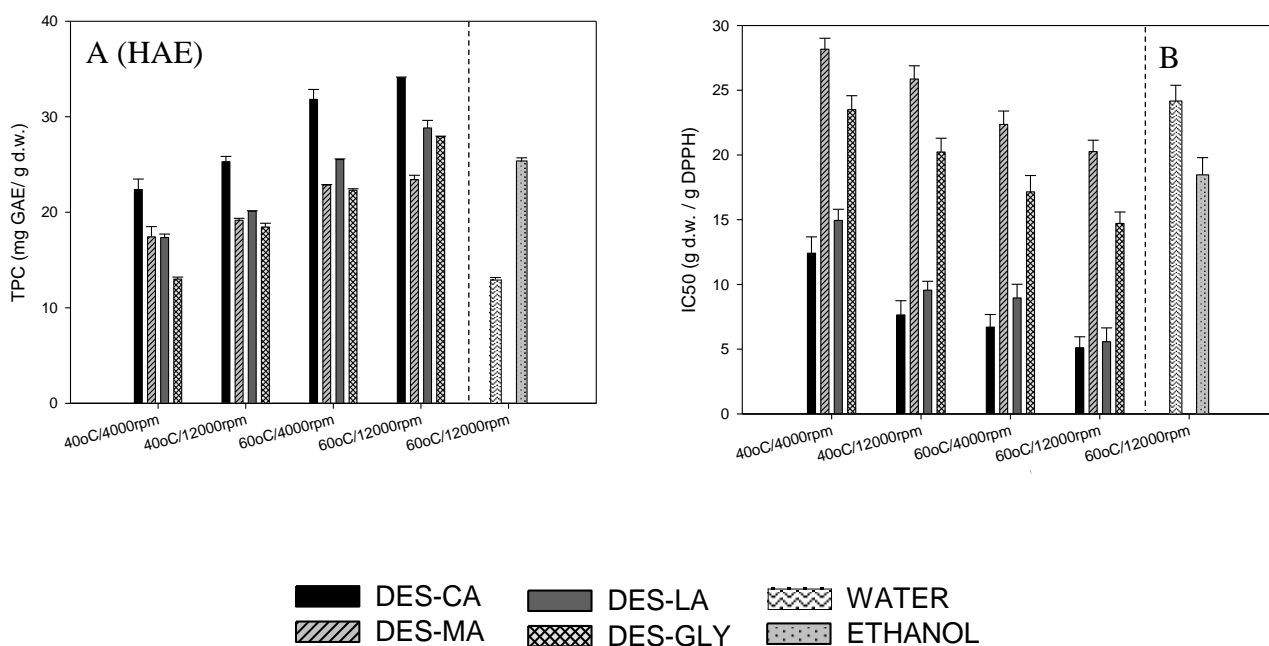
4.2.6.2 Εκχύλιση με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE)

4.2.6.2.1 Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)

Η επίδραση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ομογενοποίησης με εφαρμογή της HAE για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από το ελαιοπυρήνα φαίνεται στο Σχήμα 73A. Η εφαρμογή υψηλής ταχύτητας σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση είναι μία καλή επιλογή για να ενισχύσει την εκχύλιση με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES). Με βάση τα αποτελέσματα, ο τύπος του ευτηκτικού διαλύτη επηρέασε σημαντικά το TPC των εκχυλισμάτων ($P < 0,05$) (Σχήμα 73A). Από τους εξεταζόμενους ευτηκτικούς διαλύτες, ο DES-CA έδωσε εκχυλίσματα με το υψηλότερο TPC ($34,08 \pm 0,08$ mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ακολουθούμενος από τους DES-LA > DES-GLY > DES-MA με τιμές που κυμαίνονται από 13 έως 34 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. Ωστόσο, ο DES-GLY εμφάνισε υψηλότερο TPC από τον DES-MA εφαρμόζοντας 60 °C και 12000 rpm. Οι εφαρμοζόμενοι ευτηκτικοί διαλύτες έχουν ως βάση τη χλωριούχο χολίνη και περιέχουν οργανικά οξέα (κιτρικό και γαλακτικό οξύ), σάκχαρα (μαλτόζη) ή πολυαλκοόλες (γλυκερόλη) ως δότες δεσμού υδρογόνου. Τα φαινολικά συστατικά είναι πολικά μόρια, και αυτές οι διαφορές στην απόδοση της εκχύλισης με τους διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες μπορούν να εξηγηθούν καθώς η χημική τους μορφή καθορίζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα οι ευτηκτικοί διαλύτες με βάση το οργανικό οξύ (DES-CA, DES-LA) ως πιο πολικοί διαλύτες παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα, ενώ οι ευτηκτικοί διαλύτες με βάση τόσο τα σάκχαρα όσο και τις πολυαλκοόλες είναι λιγότερο πολικοί διαλύτες δίνοντας μικρότερες αποδόσεις εκχύλισης πολυφαινολικών συστατικών (Cvjetko Bubalo et al., 2016).

Το TPC των εκχυλισμάτων επηρεάστηκε σημαντικά ($P < 0,05$), από τη θερμοκρασία εκχύλισης

και συγκεκριμένα αυξήθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας από 40 σε 60 °C. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υψηλότερη θερμοκρασία μπορεί να προάγει τη διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων και να αυξάνει το ρυθμό διάχυσής τους στο διαλύτη, αυξάνοντας έτσι τη μεταφορά μάζας (Chanioti et al. 2016). Ειδικότερα, σε υψηλότερη θερμοκρασία, το ιξώδες των ευτηκτικών διαλυτών μειώνεται βελτιώνοντας την απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων, ενώ η μεταφορά της μάζας τους στο διαλύτη ενισχύεται και λόγω της μείωσης της επιφανειακής τάσης και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενώσεων-στόχων και της στερεής μήτρας (Huang et al., 2017, Bi et al., 2013). Το TPC των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα κυμάνθηκε από 22,38 έως 34,08, από 17,42 έως 23,42, από 17,35 έως 28,83 και από 13,00 έως 27,91 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. χρησιμοποιώντας τους DES-CA, DES-MA, DES-LA και DES-GLY στους 40 και 60 °C αντίστοιχα (Σχήμα 73A). Ένας άλλος τρόπος για να αυξηθεί η μεταφορά μάζας και να επιταχυνθεί η διάχυση των ενώσεων-στόχων στους ευτηκτικούς διαλύτες είναι η εφαρμογή εξωτερικής δύναμης, όπως η ανάδευση. Επομένως, συνδυάζοντας την HAE και τον DES-CA στους 60 °C και με ταχύτητες ομογενοποίησης από 4000 έως 12000 rpm, η απόδοση εκχύλισης αυξήθηκε κατά ~35% (Σχήμα 73A).



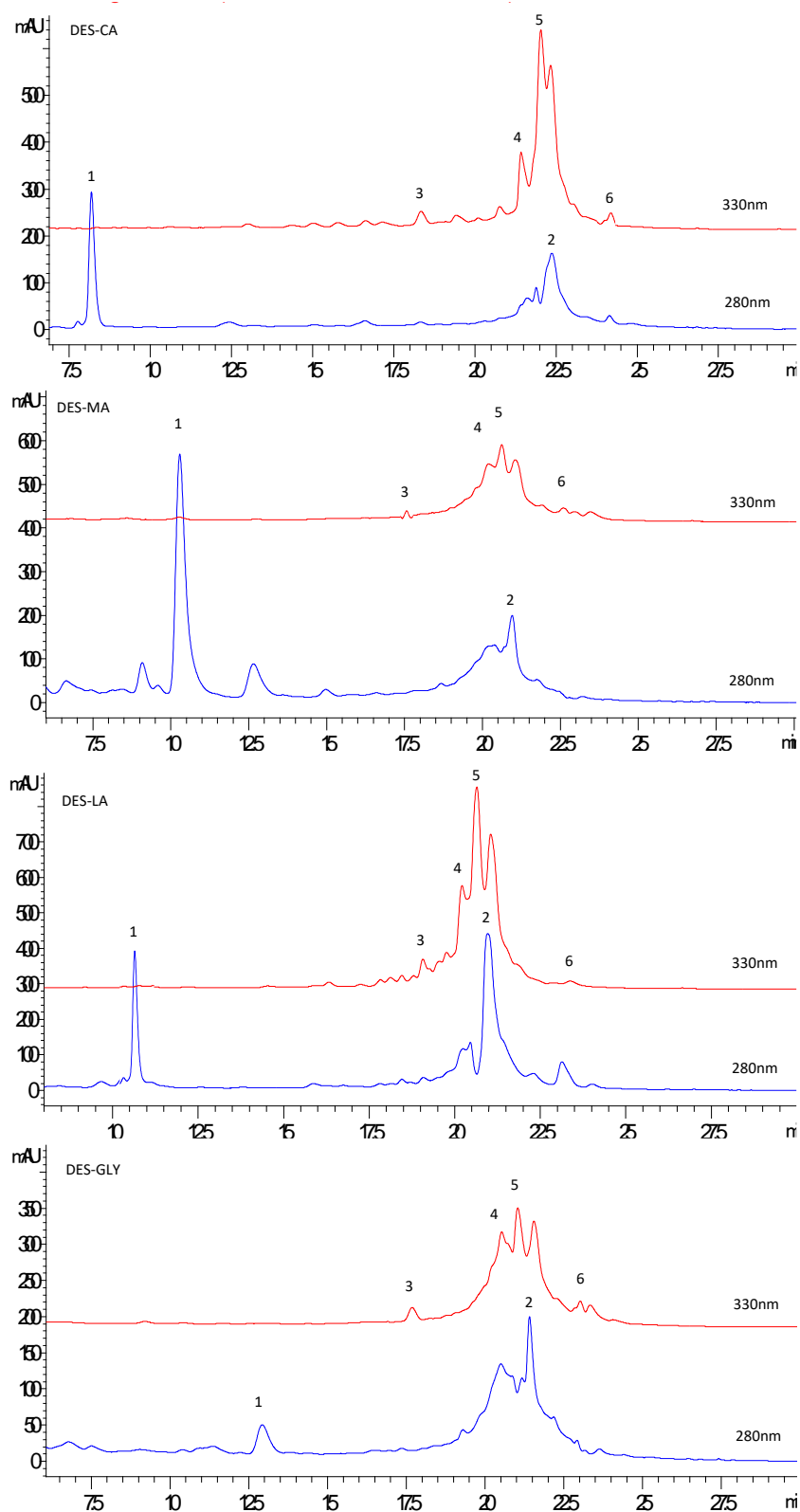
Σχήμα 73. Η επίδραση της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ομογενοποίησης με εφαρμογή της HAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα

Στο Σχήμα 73B παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από την HAE χρησιμοποιώντας τους τέσσερις ευτηκτικούς διαλύτες σε

διαφορετικές θερμοκρασίες και ταχύτητες ομογενοποίησης. Ο τύπος του ευτηκτικού διαλύτη φάνηκε ότι επηρεάζει σημαντικά ($P<0,05$) την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Η υψηλότερη συνολικά αντιοξειδωτική δράση λαμβάνεται για το εκχύλισμα DES-CA στους 60 °C και για 12000 rpm ($5,11\pm 0,85$ g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), ακολουθούμενη από τους DES-LA>DES-GLY>DES-MA. Περαιτέρω, με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης από τους 40 στους 60 °C και της ταχύτητας ομογενοποίησης από τις 4000 στις 12000 rpm, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυξήθηκε σημαντικά για όλους τους ευτηκτικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ($P<0,05$) (Σχήμα 73B). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα από τους ευτηκτικούς διαλύτες έδειξαν γενικά καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το νερό, εκτός από το εκχύλισμα με DES-MA στους 40 °C. Περαιτέρω, τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με τους DES-CA και DES-LA έδειξαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη του εκχυλίσματος της αιθανόλης (18,46 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH) για όλες τις συνθήκες της ΗΑΕ που εξετάστηκαν.

4.2.6.3 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της ΗΑΕ και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της ΗΑΕ και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών για τις διάφορες συνθήκες λειτουργίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 47. Στο Σχήμα 74 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας ευτηκτικούς διαλύτες.



Σχήμα 74. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών ελαιοπυρήνα χρησιμοποιώντας ευθηκτικούς διαλύτες και ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE). 1. Ελευρωπαΐνη (OL), 2. Υδροξυτυροσόλη (HY), 3. Καφεϊκό οξύ (CA), 4. Βανιλίνη (VA), 5. Ρουτίνη (RU), 6. Λουτεολίνη (LU)

Η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης για όλες σχεδόν τις φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν επιτεύχθηκε με το διαλύτη DES-CA. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε με αύξηση της ταχύτητας ομογενοποίησης και της θερμοκρασίας σε όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτικών διαλυτών ($P < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ελευρωπαΐνη (OL) και η υδροξυτυροσόλη (HY) αποτελούν τις κύριες φαινολικές ενώσεις που προσδιορίζονται στα εκχυλίσματα των NADES. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της OL προέκυψε με τον DES-CA, τον DES-LA και τον DES-GLY, και ακολούθως με τον DES-MA και την αιθανόλη 70% που εμφάνισαν σχεδόν παρόμοια επίπεδα. Ο διαλύτης DES-MA ήταν ο πλέον αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση της HY (περίπου 21 και 27 φορές υψηλότερη συγκέντρωση HY από την αντίστοιχη με αιθανόλη 70% και με νερό στους 60 °C στις 12000 rpm, αντίστοιχα), ενώ οι DES-CA και DES-MA ήταν οι πλέον αποτελεσματικοί διαλύτες για τη ρουτίνη (RU) (περίπου 5 και 17 φορές και 4 και 12 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις RU από εκείνες με αιθανόλη 70% και με νερό στους 60 °C στις 12000 rpm, αντίστοιχα). Τα επίπεδα λουτεολίνης (LU) στα εκχυλίσματα των DES-CA, DES-LA και DES-GLY ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του DES-MA, της αιθανόλης 70% και του νερού. Η εκχύλιση με τον DES-GLY έδωσε τις υψηλότερες ποσότητες βανιλίνης (VA) (28 φορές υψηλότερες από αυτές του νερού). Λαμβάνοντας υπόψη τη συγκέντρωση για το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα, η απόδοση της HAE ακολούθησε την παρακάτω σειρά: DES-CA>DES-LA>DES-GLY>DES-MA>αιθανόλη 70%>νερό.

Πίνακας 47. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της ΗΑΕ και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.

NADES	Συνθήκες ΗΑΕ T (°C)/ HS (rpm)	Φαινολικά συστατικά ^a (mg/ g ελαιοπυρήνα ξ.β.)						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
DES-CA	40 / 4000	10,50 ± 0,52 ^a	1,56 ± 0,02 ^b	n.d.	0,11 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,17 ^b	0,02 ± 0,00 ^b	12,67 ± 0,55 ^b
	40 / 12000	11,31 ± 1,02 ^a	2,95 ± 0,02 ^b	n.d.	0,13 ± 0,02 ^a	1,67 ± 0,05 ^b	0,11 ± 0,00 ^b	16,17 ± 1,02 ^b
	60 / 4000	11,72 ± 1,03 ^a	2,81 ± 1,25 ^b	n.d.	0,16 ± 0,04 ^a	1,69 ± 0,15 ^b	0,11 ± 0,00 ^b	16,49 ± 1,63 ^b
	60 / 12000	12,86 ± 0,09 ^a	3,37 ± 0,09 ^b	0,01 ± 0,00	0,24 ± 0,04 ^a	1,71 ± 0,12 ^b	0,12 ± 0,01 ^b	18,30 ± 0,18 ^b
DES-MA	40 / 4000	4,17 ± 0,51 ^b	4,22 ± 0,04 ^c	n.d.	0,03 ± 0,01 ^a	0,92 ± 0,05 ^b	0,01 ± 0,00 ^a	9,35 ± 0,51 ^a
	40 / 12000	6,80 ± 0,07 ^b	4,88 ± 0,02 ^c	n.d.	0,06 ± 0,00 ^a	1,24 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	13,00 ± 0,07 ^a
	60 / 4000	7,09 ± 0,02 ^b	6,00 ± 0,20 ^c	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,01 ^a	1,21 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	14,43 ± 0,20 ^a
	60 / 12000	7,16 ± 0,19 ^b	6,08 ± 0,33 ^c	0,06 ± 0,04	0,09 ± 0,18 ^a	1,23 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,00 ^a	14,66 ± 0,42 ^a
DES-LA	40 / 4000	9,85 ± 1,20 ^a	0,69 ± 0,12 ^a	n.d.	0,04 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,05 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	10,79 ± 1,21 ^a
	40 / 12000	11,33 ± 0,30 ^a	1,04 ± 0,04 ^a	n.d.	0,09 ± 0,00 ^a	0,34 ± 0,09 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	12,89 ± 0,32 ^a
	60 / 4000	11,47 ± 0,36 ^a	1,93 ± 0,05 ^a	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,03 ^a	0,91 ± 0,07 ^a	0,08 ± 0,00 ^b	14,45 ± 0,37 ^a
	60 / 12000	12,24 ± 0,11 ^a	2,07 ± 0,03 ^a	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,01 ^a	1,02 ± 0,20 ^a	0,11 ± 0,00 ^b	15,52 ± 0,23 ^a
DES-GLY	40 / 4000	7,48 ± 0,85 ^a	0,88 ± 0,06 ^a	n.d.	0,21 ± 0,05 ^b	0,30 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,00 ^b	8,89 ± 0,86 ^a
	40 / 12000	10,88 ± 0,45 ^a	0,96 ± 0,04 ^a	n.d.	0,48 ± 0,06 ^b	0,54 ± 0,05 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	12,95 ± 0,46 ^a
	60 / 4000	11,34 ± 0,86 ^a	0,98 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,00	0,55 ± 0,03 ^b	0,47 ± 0,04 ^a	0,04 ± 0,00 ^b	12,39 ± 0,86 ^a
	60 / 12000	12,05 ± 0,69 ^a	1,09 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,00	0,56 ± 0,08 ^b	0,88 ± 0,06 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	14,70 ± 0,70 ^a
Νερό	60 / 12000	0,46 ± 0,09	0,24 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,84 ± 0,11
70 % EtOH	60 / 12000	6,34 ± 0,15	0,32 ± 0,07	n.d.	n.d.-	0,36 ± 0,05	0,06 ± 0,00	7,08 ± 0,17

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

n.d. μη ανιχνεύσιμη

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

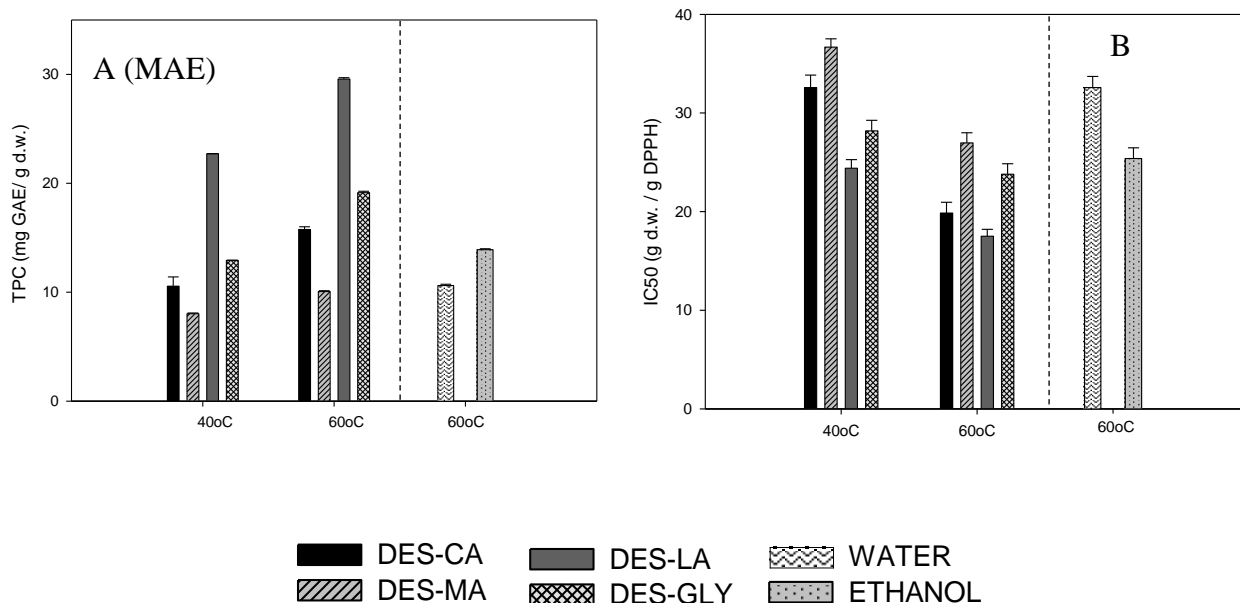
Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.2.6.3 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)

4.2.6.3.1 Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με μικροκύματα (MAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)

Η επίδραση της εκχύλισης με μικροκύματα (MAE) στην ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα για διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης με τη χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADESs) φαίνεται στο Σχήμα 75A. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ευτηκτικοί διαλύτες μπορούν να απορροφήσουν αποτελεσματικά την ενέργεια των μικροκυμάτων, η εφαρμογή αυτών των πράσινων διαλυτών στις διεργασίες της MAE αποτελεί μία αρκετά ενδιαφέρουσα προσέγγιση. Συνεπώς, στα πειράματα που διεξήχθησαν, ο DES-LA έδειξε τη μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα ($29,57 \pm 0,13$ mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολούθως κατά σειρά οι: DES-GLY > DES-CA > DES-MA. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της απόδοσης εκχύλισης συμφωνούν με τα προβλέψιμα από τα δεδομένα του ιξώδους. Οι DES-LA και DES-GLY ήταν οι πιο αποτελεσματικοί και είχαν το μικρότερο ιξώδες (29,5 και 47,5 cP αντίστοιχα), ενώ οι υπόλοιποι NADES είχαν πολύ υψηλότερο ιξώδες: DES-CA (448,1 cP), DES-MA (975,5 cP).

Η θερμοκρασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι επίσης ένας από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα της MAE. Η ισχύς του διαλύτη ενός ιξώδους ευτηκτικού διαλύτη αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της μείωσης του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερες αποδόσεις. Στα πειράματα της MAE εφαρμόστηκαν ήπιες θερμοκρασίες (40 και 60 °C) που ελέγχονταν με συνεχή ρύθμιση της ισχύος των μικροκυμάτων (ανώτερο όριο τα 100 W), προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή υπερθέρμανση του διαλύτη και συνεπώς αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 75A, η απόδοση εκχύλισης μεταβλήθηκε σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας από 40 σε 60 °C ($P < 0,05$). Εφαρμόζοντας τη MAE και με χρήση του DES-LA ως διαλύτη, η απόδοση εκχύλισης αυξήθηκε έως ~ 30%, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από 40 σε 60 °C.



Σχήμα 75. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της MAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα

Οι αποδόσεις των εκχυλίσεων με τους ευτηκτικούς διαλύτες έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες. Οι τιμές του TPC των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν με NADES ήταν γενικά υψηλότερες από αυτές του νερού (10,61 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), εξαιρουμένων των εκχυλισμάτων με τον DES-MA. Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με NADES με οργανικό οξύ- (DES-CA, DES-LA) και με αλκοόλη (DES-GLY) στους 60 °C είχαν υψηλότερο TPC από ότι το αντίστοιχο εκχύλισμα αιθανόλης (16,87 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.).

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με MAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES) σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης παρουσιάζεται στο Σχήμα 75B. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται σημαντικά ($P < 0,05$) από τον τύπο του ευτηκτικού διαλύτη (NADES), παρέχοντας τιμές που κυμαίνονται από 17,51 έως 36,67 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση που λαμβάνεται για το εκχύλισμα με DES-LA στους 60 °C, ακολουθούμενη από τα εκχυλίσματα των: DES-GLY > DES-CA > DES-MA. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και του TPC (-0,93). Επιπλέον, αυξάνοντας τη θερμοκρασία εκχύλισης από 40 σε 60 °C, οι τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων αυξήθηκαν σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτικών διαλυτών ($P < 0,05$) (Σχήμα 75B). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα εκχυλίσματα με ευτηκτικούς διαλύτες

έδειξαν γενικά καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη του εκχυλίσματος με νερό (30,35 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), εκτός από το εκχύλισμα DES-MA στους 40 °C. Επίσης, το εκχύλισμα αιθανόλης κατέγραψε χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη των εκχυλισμάτων με: DES-CA, DES-LA και DES-GLY στους 60 °C.

4.2.6.3.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της MAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων με εφαρμογή της MAE σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης και με διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 48. Στην περίπτωση των DES-LA και DES-GLY, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε όλες σχεδόν τις μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με αυτές στα υπόλοιπα εκχυλίσματα ($P < 0,05$). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση OL ελήφθησε με τον DES-LA και τον DES-GLY, και ακολούθως με τους DES-CA, DES-MA, αιθανόλη και νερό. Με αύξηση της θερμοκρασίας, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτικών διαλυτών ($P < 0,05$). Οι DES-LA και DES-GLY ήταν επίσης οι πλέον αποτελεσματικοί διαλύτες για την εξαγωγή της HY (περίπου 5 και 3 φορές και 4 και 3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση HY από εκείνη με αιθανόλη 70% και νερό στους 60 °C, αντίστοιχα), καθώς και της RU (περίπου 3 και 5 φορές και 2 και 4 φορές υψηλότερη συγκέντρωση RU από εκείνη με αιθανόλη 70% και το νερό στους 60 °C για τον DES-LA και τον DES-GLY, αντίστοιχα). Στην περίπτωση της LU, η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στο εκχύλισμα νερού, και ακολούθως στα εκχυλίσματα των υπόλοιπων διαλυτών: αιθανόλη 70% > DES-LA > DES-GLY > DES-CA > DES-MA. Γενικά, η συμπεριφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφόρων NADES σχετικά με το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων ήταν παρόμοια με αυτή του TPC.

Πίνακας 48. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της MAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας.

NADES	Συνθήκες MAE T (°C)	Φαινολικά συστατικά (mg/ g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ^a						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
DES-CA	40	3,33 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,02 ^b	0,001 ± 0,000	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	3,98 ± 0,05 ^a
	60	5,36 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,01 ^b	0,003 ± 0,000	0,13 ± 0,02	0,23 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	6,51 ± 0,04 ^a
DES-MA	40	2,94 ± 0,04 ^a	0,33 ± 0,02 ^a	0,005 ± 0,001	0,01 ± 0,01	0,09 ± 0,04 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	3,41 ± 0,06 ^a
	60	5,00 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,03 ^a	0,009 ± 0,002	0,09 ± 0,01	0,24 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	5,87 ± 0,04 ^a
DES-LA	40	4,94 ± 0,08 ^b	0,75 ± 0,02 ^c	0,006 ± 0,000	0,07 ± 0,00	0,42 ± 0,04 ^b	0,07 ± 0,00 ^b	6,21 ± 0,09 ^b
	60	7,56 ± 0,05 ^b	0,89 ± 0,03 ^c	0,010 ± 0,002	0,12 ± 0,01	0,74 ± 0,02 ^b	0,17 ± 0,01 ^b	9,49 ± 0,06 ^b
DES-GLY	40	4,75 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,01 ^c	0,004 ± 0,000	0,02 ± 0,01	0,31 ± 0,05 ^b	0,09 ± 0,00 ^b	5,88 ± 0,07 ^b
	60	7,52 ± 0,02 ^b	0,80 ± 0,01 ^c	0,011 ± 0,001	0,11 ± 0,00	0,62 ± 0,06 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	9,21 ± 0,06 ^b
Νερό	60	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,003 ± 0,000	0,01 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,73 ± 0,08	1,38 ± 0,08
70 % EtOH	60	5,23 ± 0,03	0,20 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01	5,90 ± 0,04

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

n.d. μη ανιχνεύσιμη

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

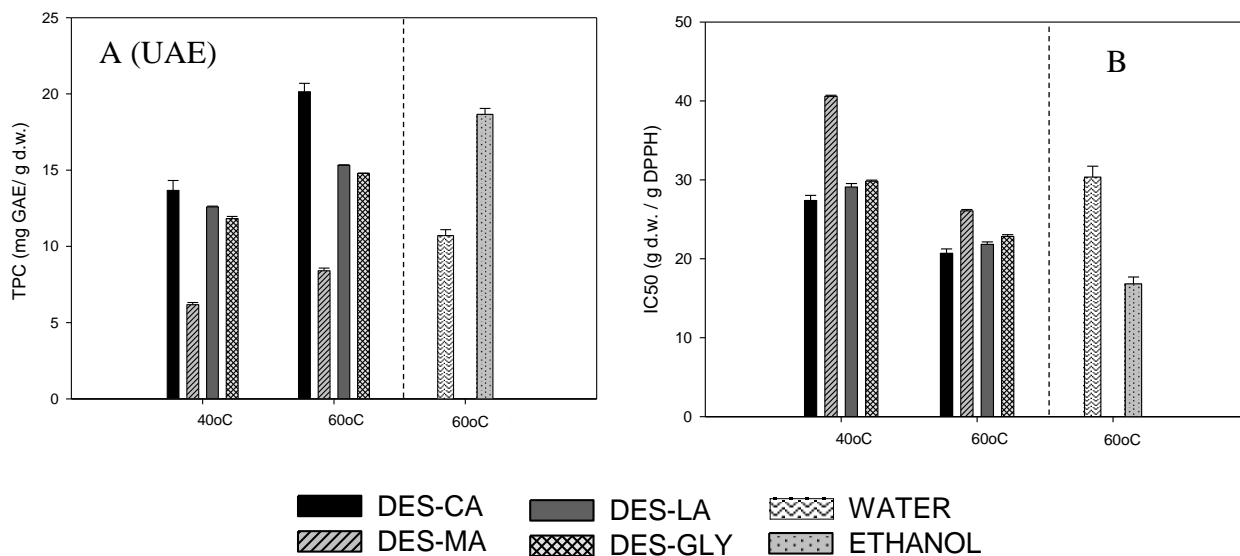
Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.2.6.4 Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE)

4.2.6.4.1 Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με υπέρηχους (UAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)

Η επίδραση της εκχύλισης με υπέρηχους (UAE) στην ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα σε διάφορες θερμοκρασίες εκχύλισης χρησιμοποιώντας διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες φαίνεται στο Σχήμα 76Α. Ο συνδυασμός της χρήσης υπέρηχων με ήπιες θερμοκρασίες εκχύλισης μπορεί επίσης να είναι μία καλή επιλογή για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων με ευτηκτικούς διαλύτες. Όσον αφορά τον τύπο του ευτηκτικού διαλύτη που χρησιμοποιείται, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτός επηρέασε σημαντικά το TPC ($P < 0,05$). Ο DES-CA έδωσε την υψηλότερη απόδοση φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα ($20,14 \pm 0,55$ mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ακολουθούμενος σε σειρά από τους: DES-LA > DES-GLY > DES-MA. Καθώς οι φαινολικές ενώσεις είναι πολικά μόρια και οι ευτηκτικοί διαλύτες με βάση τα οργανικά οξέα (DES-CA, DES-LA) αποδείχθηκαν ως οι καλύτεροι διαλύτες μεταξύ των NADES που εξετάστηκαν. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν γενικά με τις μελέτες των Radošević et al. (2016) και των Bosiljkov et al. (2017), οι οποίοι ανέφεραν ότι οι ευτηκτικοί διαλύτες με οργανικά οξέα είχαν ως αποτέλεσμα την ανάκτηση υψηλότερων συγκεντρώσεων σε ολικές ανθοκυανίνες.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία εκχύλισης αποτελεί κρίσιμη παράμετρο που επηρεάζει την αποδοτικότητα της UAE. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της UAE επελέγησαν τιμές θερμοκρασίας εκχύλισης 40 και 60 °C, Όπως φαίνεται στο Σχήμα 76Α, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του TPC στα εκχυλίσματα των ευτηκτικών διαλυτών με εφαρμογή μεγαλύτερης θερμοκρασίας εκχύλισης ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα για την επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης είναι παρόμοια όπως για τη MAE και την HAE. Με την εφαρμογή της UAE και του διαλύτη DES-CA, η απόδοση της εκχύλισης αυξήθηκε κατά ~47%, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από 40 σε 60 °C.



Σχήμα 76. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα

Επιπροσθέτως, η σύγκριση μεταξύ των ευτηκτικών διαλυτών και των συμβατικών διαλυτών κατά τη διάρκεια της UAE έδειξε ότι το TPC των εκχυλισμάτων που προέκυψε με τους ευτηκτικούς διαλύτες ήταν και πάλι γενικά υψηλότερο από εκείνο που ελήφθη με το νερό (10,71 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), εκτός από τα εκχυλίσματα του DES-MA. Το εκχύλισμα αιθανόλης παρουσίασε υψηλότερο TPC από αυτά που ελήφθησαν με τους ευτηκτικούς διαλύτες (NADES). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο το TPC του εκχυλίσματος του DES-CA στους 60 °C ήταν 8% υψηλότερο από το αντίστοιχο του εκχυλίσματος αιθανόλης.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνεται από την εφαρμογή της UAE, χρησιμοποιώντας διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες, παρουσιάζεται στο Σχήμα 76B. Όπως παρατηρείται η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται σημαντικά ($P < 0,05$) από τον τύπο του ευτηκτικού διαλύτη, δίνοντας τιμές που κυμάνθηκαν από 20,69 έως 40,57 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση προέκυψε για το εκχύλισμα του DES-CA στους 60 °C, και ακολούθως σε σειρά των: DES-LA > DES-GLY > DES-MA. Μία αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και του TPC (-0,99) υποδηλώνοντας έτσι ότι οι φαινολικές ενώσεις συνέβαλαν σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα. Περαιτέρω, αυξάνοντας τη θερμοκρασία εκχύλισης από 40 στους 60 °C, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυξήθηκε σημαντικά για όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν ($P < 0,05$) (Σχήμα 76B). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα εκχυλίσματα των NADESs έδειξαν όπως και προηγουμένως καλύτερη

αντιοξειδωτική δράση από εκείνη του εκχυλίσματος με νερό (30,35 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), εκτός από τα εκχυλίσματα του DES-MA στους 40 °C, Από την άλλη πλευρά, το εκχύλισμα αιθανόλης έδειξε την υψηλότερη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης (16,81 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH).

4.2.6.4.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της UAE και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Το προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της UAE σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες (NADESs) παρουσιάζονται στον Πίνακα 49. Η υψηλότερη συγκέντρωση της OL ελήφθη με τους DES-CA, DES-LA και DES-GLY, και ακολούθως με την αιθανόλη, το DES-MA και το νερό. Με αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτικών διαλυτών ($P < 0,05$). Συγκεκριμένα, με τον DES-MA, η συγκέντρωση της HY ήταν υψηλότερη από ότι σε εκχυλίσματα άλλων διαλυτών (σχεδόν 1,5 και 6 φορές υψηλότερη συγκέντρωση HY από εκείνη με αιθανόλη 70% και με νερό στους 60 °C, αντίστοιχα). Επιπλέον, η συγκέντρωση της RU και της LU στα εκχυλίσματα του DES-CA ήταν σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη στα υπόλοιπα εκχυλίσματα (περίπου 15 φορές υψηλότερη συγκέντρωση RU από εκείνη με νερό στους 60 °C και 2,5 φορές υψηλότερη συγκέντρωση LU από εκείνη με αιθανόλη 70%, αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας ότι ο διαλύτης DES-CA ήταν αποτελεσματικός για την UAE του ελαιοπυρήνα. Γενικά, η συμπεριφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφόρων ευτηκτικών διαλυτών (NADES) όσον αφορά το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων ήταν η ακόλουθη: υδατική αιθανόλη > νερό DES-CA > DES-LA > DES-GLY > DES-MA.

Πίνακας 49. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας

NADES	Συνθήκες UAE T (°C)	Φαινολικά συστατικά (mg/ g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ^a						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
DES-CA	40	0,61 ± 0,00 ^b	0,82 ± 0,01 ^a	0,002 ± 0,000	0,03 ± 0,01	0,29 ± 0,02 ^b	0,08 ± 0,01 ^c	1,83 ± 0,03 ^b
	60	0,85 ± 0,01 ^b	1,05 ± 0,01 ^a	0,010 ± 0,001	0,10 ± 0,00	0,40 ± 0,02 ^b	0,10 ± 0,00 ^c	2,51 ± 0,02 ^b
DES-MA	40	0,36 ± 0,00 ^a	1,08 ± 0,02 ^b	0,001 ± 0,001	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	1,64 ± 0,02 ^a
	60	0,49 ± 0,01 ^a	1,40 ± 0,04 ^b	0,001 ± 0,000	0,05 ± 0,00	0,19 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	2,17 ± 0,04 ^a
DES-LA	40	0,55 ± 0,03 ^b	0,81 ± 0,02 ^a	0,003 ± 0,000	0,03 ± 0,00	0,19 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	1,65 ± 0,05 ^a
	60	0,78 ± 0,01 ^b	1,07 ± 0,01 ^a	0,005 ± 0,000	0,05 ± 0,01	0,21 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	2,20 ± 0,03 ^a
DES-GLY	40	0,50 ± 0,00 ^b	0,78 ± 0,01 ^a	0,002 ± 0,000	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,00 ^b	1,52 ± 0,02 ^a
	60	0,77 ± 0,02 ^b	1,08 ± 0,01 ^a	0,004 ± 0,001	0,05 ± 0,00	0,20 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	2,18 ± 0,02 ^a
Νερό	60	0,11 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,002 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,02 ± 0,00	n.d	0,37 ± 0,01
70 % EtOH	60	0,64 ± 0,01	0,97 ± 0,01	n.d	0,02 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,04 ± 0,01	1,92 ± 0,02

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

n.d. μη ανιχνεύσιμη

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.2.6.5 *Εκχύλιση με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE)*

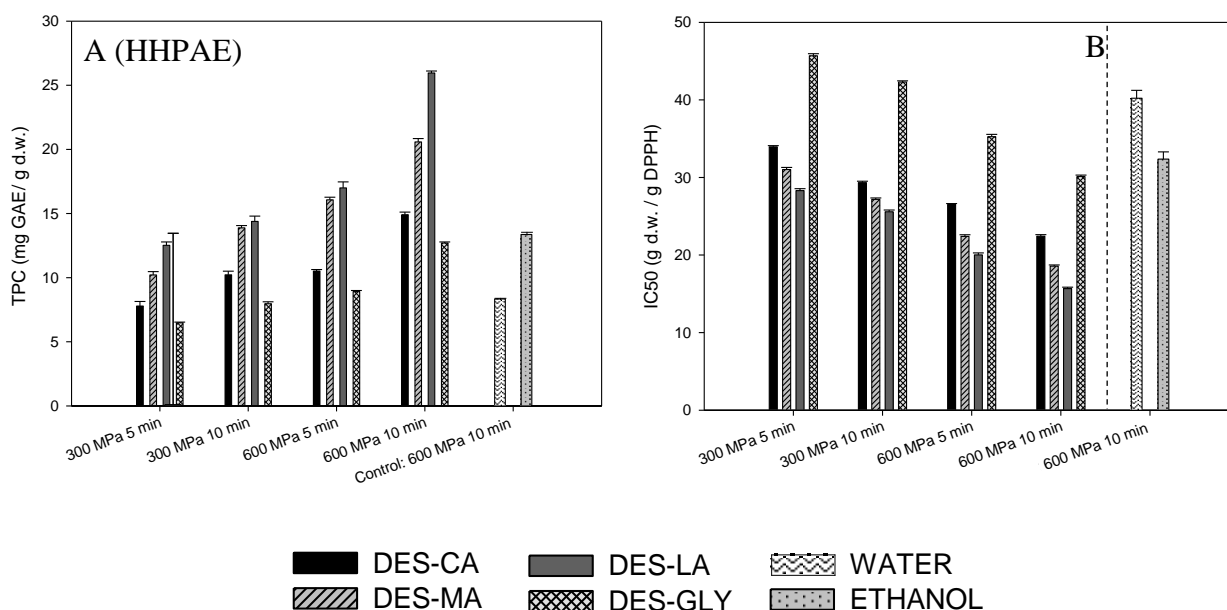
4.2.6.5.1 *Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με υψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE) και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών (NADES)*

Η επίδραση της εκχύλισης με υψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE) στην ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα σε διαφορετικούς χρόνους και πιέσεις εκχύλισης με διάφορους ευτηκτικούς διαλύτες (NADESs) φαίνεται στο Σχήμα 77Α. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υψηλότερη πίεση διευκολύνει τη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα του στερεού υλικού και την ανάκτηση περισσότερων ενώσεων-στόχων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το TPC των εκχυλισμάτων αυξήθηκε σημαντικά, όταν η πίεση αυξήθηκε από 300 σε 600 MPa. Ο DES-LA παρείχε την υψηλότερη απόδοση φαινολικών ενώσεων (25,96±0,15 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), και ακολουθούμενος από τους: DES-MA>DES-CA>DES-GLY. Συγκεκριμένα, με εφαρμογή 600 MPa και 10 min, η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος με DES-LA ήταν 81% υψηλότερη από εκείνη που προέκυψε στα 300 MPa και 10 min. Παρόμοια τάση έχει αναφερθεί και από άλλες εργασίες. Οι Akhmazillah, Farid, & Silva (2013) ανέφεραν ότι το TPC των δειγμάτων μελιού ήταν σημαντικά υψηλότερο με επεξεργασία σε πίεση 600 MPa (πάνω από 75 mg GA/100 g μελιού) σε σύγκριση με αυτό στα 200 MPa (περίπου 66 mg GA/100 g μελιού). Οι Prasad et al. (2009), παρατήρησαν επίσης ότι η μεγαλύτερη επίδραση στο TPC των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από το περικάρπιο φρούτων *longan* προωθήθηκε από την αύξηση της πίεσης από 200 σε 500 MPa.

Επιπλέον, το TPC φάνηκε ότι επηρεάζεται από την περίοδο της εφαρμογής της υψηλής πίεσης. Όταν ο χρόνος της HHP αυξήθηκε από 5 έως 10 min, η εκχυλισσιμότητα των NADESs επίσης αυξήθηκε. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα με DES-LA στα 600 MPa αυξήθηκε από 17,00 έως 25,96 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η απόδοση της εκχύλισης βελτιώθηκε με αύξηση του χρόνου εκχύλισης. Ενδεχομένως η ισορροπία της πίεσης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (Prasad, Yang, Zhao, Ruenroengklin, & Jiang, 2009, Shouqin, Jun, & Changzheng, 2005). Ομοίως, οι Briones-Labarca et al. (2015) ανέφεραν σημαντική αύξηση της απόδοσης εκχύλισης των σπόρων της χιλιακής παπάγιας (*Vasconcellea pubescens*) από 9,8% σε 20,4%, όταν ο χρόνος πίεσης αυξήθηκε από 5 σε 15 min.

Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ των NADES και των συμβατικών διαλυτών κατά τη διάρκεια της HHPAE έδειξε ότι το TPC των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν με τους NADESs ήταν και πάλι γενικά υψηλότερο από εκείνο με νερό (8,34 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) σε όλες τις συνθήκες της HHP που εφαρμόστηκαν. Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα των NADES με το εκχύλισμα της αιθανόλης, μπορεί να παρατηρηθεί ότι το TPC των εκχυλισμάτων με DES-LA, DES-MA και DES-CA που ελήφθησαν στα 600 MPa για 10 min ήταν 94%, 54% και 12%

υψηλότερο από εκείνο του εκχυλίσματος της αιθανόλης 70%, αντιστοίχως. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι κατά τη διαδικασία της HHP η πίεση μεταφέρεται στο σύνολο του υλικού ομοιόμορφα και άμεσα. Υπό αυτές τις συνθήκες, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση των NADESs μειώνεται, ενώ ταυτόχρονα η διαλυτότητα στο διαλύτη και η διάχυσή του στα διάσπαρτα κύτταρα είναι υψηλή, οδηγώντας πολύ γρήγορα σε υψηλότερη απόδοση της εκχύλισης.



Σχήμα 77. Η επίδραση της θερμοκρασίας με εφαρμογή της UAE και χρήση ευτηκτικών διαλυτών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) (A) και στην αντιοξειδωτική δράση (DPPH) (B) των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται από την εφαρμογή της HHPAE με χρήση διάφορων NADES σε διαφορετικές πιέσεις και χρόνους εκχύλισης παρουσιάζεται στο Σχήμα 77B. Αυτές οι τιμές κυμάνθηκαν από 45,69 έως 15,67 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση προέκυψε για το εκχύλισμα με DES-LA στα 600 MPa για 10 min, και ακολούθως από τα εκχυλίσματα με τους: DES-MA>DES-CA>DES-GLY. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και του TPC (-0,92) που έδειξε ότι οι φαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν να αποτελούν την κύρια συνεισφορά στην αντιοξειδωτική δράση του ελαιοπυρήνα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με αρκετές προηγούμενες μελέτες (Briones-Labarca et al., 2015, Jayaprakasha, Girenavar, & Patil, 2008, Klimeczak, Małeczka, Szlachta, & Gliszczyńska-Świątło, 2007). Περαιτέρω, αυξάνοντας σημαντικά το χρόνο εκχύλισης από 5 έως 10 min και την πίεση από 300 έως 600 MPa, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα αυξήθηκε

σημαντικά για όλους τους ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) που εξετάστηκαν ($P < 0,05$) (Σχήμα 77B). Αυτό συμβαίνει καθώς υπό υψηλή πίεση η διαφορά πίεσης μεταξύ των εσωτερικών και των εξωτερικών κυτταρικών μεμβρανών είναι τόσο μεγάλη που οδηγεί σε άμεση διείσδυση του διαλύτη, φτάνοντας γρήγορα η απόδοση στην υψηλότερη τιμή. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Briones-Labarca et al. (2015), Prasad et al. (2009) και Shouqin et al. 2005 για την εξαγωγή του συνόλου των πολυφαινόλων και φλαβονοειδών από σπόρους χιλιανής παπάγιας (*Vasconcellea pubescens*) και πρόπολη, αντίστοιχα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα των NADESs έδειξαν γενικά καλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα από εκείνο που λαμβάνεται με το νερό, εκτός από τα εκχυλίσματα του DES-GLY στα 300 MPa. Επιπλέον, όλα τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τους DES-LA, DES-MA και DES-CA είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνη της αιθανόλης. Με την εφαρμογή πίεσης 600MPa για 10 min, τα εκχυλίσματα των DES-LA, DES-MA, DES-CA και DES-GLY έδειξαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 107%, 74%, 44% και 7% υψηλότερη από εκείνη του εκχυλίσματος της αιθανόλης.

4.2.6.5.2 Ανάλυση των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της ΗΗΡΑΕ και με χρήση ευτηκτικών διαλυτών σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις με HPLC

Τα προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με ΗΗΡΑΕ σε διαφορετικές πιέσεις και χρόνους εκχύλισης χρησιμοποιώντας διάφορους NADESs παρουσιάζονται στον Πίνακα 50. Υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται αποτελεσματικά με τον DES-LA για σχεδόν όλες τις φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση με τους υπόλοιπους NADES που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων ενισχύθηκε σημαντικά με αύξηση της πίεσης και του χρόνου σε όλες τις περιπτώσεις των NADES ($P < 0,05$). Η υψηλότερη συγκέντρωση της OL ελήφθη με αιθανόλη, και ακολουθούμενη από εκείνη με τους: DES-LA, DES-MA, DES-CA και DES-GLY. Ο DES-LA ήταν ο αποτελεσματικότερος διαλύτης για την εξαγωγή της HY (περίπου 6 και 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση HY από εκείνη με την αιθανόλη 70% και το νερό στα 600 MPa για 10 min, αντίστοιχα), καθώς και της ρουτίνης (RU) (περίπου 3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση RU από εκείνη με την αιθανόλη 70% και το νερό στα 600 MPa για 10 min, αντίστοιχα). Η συγκέντρωση της λουτεολίνης (LU) στο εκχύλισμα του DES-LA ήταν επίσης υψηλότερη από εκείνη των υπόλοιπων εκχυλισμάτων με τους NADES και τους συμβατικούς διαλύτες (περίπου 3 και 4 φορές αυξημένη σε σχέση με εκείνη της αιθανόλης 70% και του νερού στα 600 MPa επί 10 min, αντίστοιχα). Γενικά, η σειρά της αποτελεσματικότητας του ΗΗΡΑΕ στην ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα (το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων) ήταν DES-LA > αιθανόλη 70% > DES-MA > DES-CA > DES-GLY > νερό.

Πίνακας 50. Προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα με εφαρμογή της HHP και χρήση των ευτηκτικών διαλυτών για διάφορες συνθήκες λειτουργίας

NADES	Συνθήκες HHPAE HP (MPa)/ t (min)	Φαινολικά συστατικά (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.) ^a						
		OL ^b	HY ^b	CA ^b	VA ^b	RU ^b	LU ^b	Σύνολο ^c
DES-CA	300 / 5	0,24 ± 0,02 ^a	0,51 ± 0,02 ^a	0,002 ± 0,000 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^b	0,89 ± 0,03 ^a
	300 / 10	0,31 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,02 ^a	0,002 ± 0,001 ^{ab}	0,02 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^b	1,05 ± 0,03 ^a
	600 / 5	0,32 ± 0,03 ^a	0,66 ± 0,02 ^a	0,003 ± 0,000 ^{ab}	0,03 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^b	1,16 ± 0,04 ^a
	600 / 10	0,62 ± 0,01 ^a	1,05 ± 0,00 ^a	0,003 ± 0,000 ^{ab}	0,04 ± 0,00 ^a	0,20 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	1,99 ± 0,01 ^a
DES-MA	300 / 5	0,17 ± 0,01 ^{ab}	0,54 ± 0,01 ^{ab}	0,003 ± 0,000 ^{bc}	0,04 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,02 ^{ab}
	300 / 10	0,30 ± 0,00 ^{ab}	0,80 ± 0,02 ^{ab}	0,003 ± 0,000 ^{bc}	0,04 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	1,32 ± 0,02 ^{ab}
	600 / 5	0,61 ± 0,02 ^{ab}	1,41 ± 0,00 ^{ab}	0,005 ± 0,000 ^{bc}	0,06 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	2,31 ± 0,02 ^{ab}
	600 / 10	0,94 ± 0,01 ^{ab}	2,22 ± 0,03 ^{ab}	0,006 ± 0,000 ^{bc}	0,07 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	3,63 ± 0,03 ^{ab}
DES-LA	300 / 5	0,42 ± 0,01 ^b	0,77 ± 0,02 ^b	0,004 ± 0,000 ^c	0,04 ± 0,00 ^b	0,23 ± 0,05 ^b	0,07 ± 0,00 ^c	1,53 ± 0,05 ^b
	300 / 10	0,59 ± 0,01 ^b	0,88 ± 0,04 ^b	0,004 ± 0,000 ^c	0,05 ± 0,00 ^b	0,25 ± 0,09 ^b	0,09 ± 0,01 ^c	1,86 ± 0,10 ^b
	600 / 5	0,81 ± 0,00 ^b	1,80 ± 0,05 ^b	0,006 ± 0,000 ^c	0,05 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,07 ^b	0,10 ± 0,00 ^c	3,06 ± 0,09 ^b
	600 / 10	1,94 ± 0,02 ^b	2,57 ± 0,03 ^b	0,010 ± 0,000 ^c	0,10 ± 0,01 ^b	0,66 ± 0,20 ^b	0,12 ± 0,00 ^c	5,31 ± 0,20 ^b
DES-GLY	300 / 5	0,28 ± 0,02 ^a	0,61 ± 0,01 ^a	0,002 ± 0,000 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	1,04 ± 0,02 ^a
	300 / 10	0,33 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,02 ^a	0,002 ± 0,001 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	1,18 ± 0,03 ^a
	600 / 5	0,35 ± 0,01 ^a	0,73 ± 0,01 ^a	0,002 ± 0,000 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	1,35 ± 0,02 ^a
	600 / 10	0,39 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,00 ^a	0,002 ± 0,000 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	1,60 ± 0,02 ^a
Νερό	600 / 10	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,20 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,68 ± 0,03
70 % EtOH	600 / 10	4,42 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,001 ± 0,000	0,01 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,04 ± 0,00	5,13 ± 0,02

^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

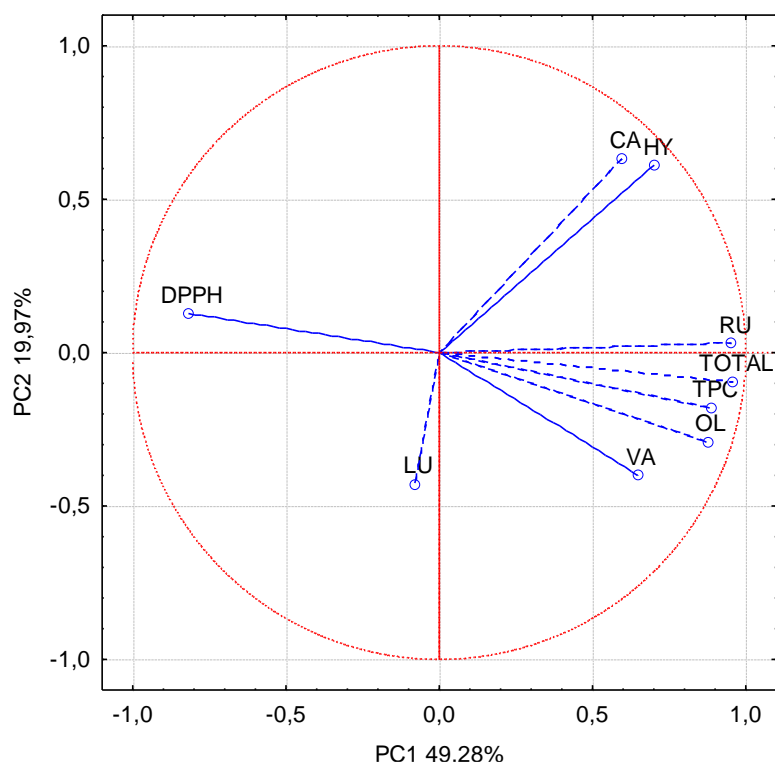
n.d. μη ανιχνεύσιμη

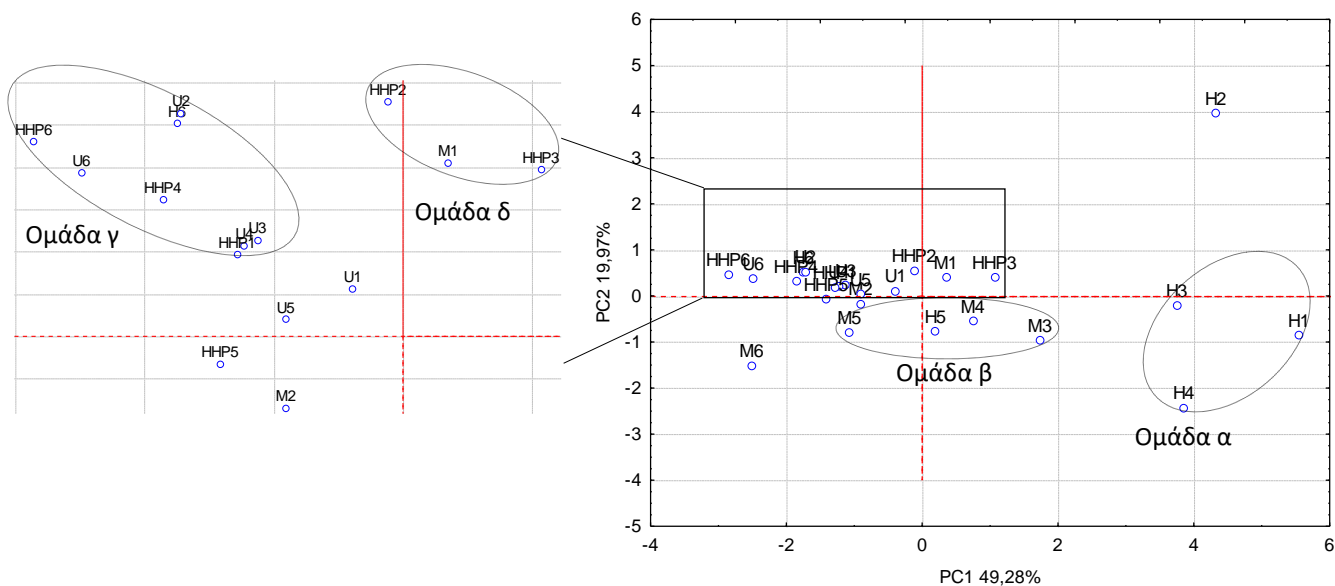
^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

4.2.6.6 Συσχέτιση και αξιολόγηση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που λαμβάνονται με εφαρμογή νέων μεθόδων εκχύλισης και με χρήση των NADES

Για να διερευνηθεί η συσχέτιση του TPC, της αντιοξειδωτικής δράσης και των επιμέρους φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων από τον ελαιοπυρήνα με τη χρήση νέων και πράσινων ευτηκτικών διαλυτών σε συνδυασμό με εναλλακτικές μεθόδους εκχύλισης που περιλαμβάνουν τις: HAE, MAE, UAE και HHPAE, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) (Σχήμα 78). Κάθε σημείο στο γράφημα κύριων συνιστωσών με βάση τα παραγοντικά φορτία των μεταβλητών (loading plot) αντιπροσωπεύει τη συμβολή μίας μεταβλητής (TPC, DPPH, φαινολικές ενώσεις) στο συνολικό σκορ (score), ενώ κάθε σημείο στο γράφημα κύριων συνιστωσών με βάση τις τιμές των δειγμάτων (score plot) αντιπροσωπεύει ένα δείγμα. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) περιγράφει το 49,28% της διακύμανσης του πειράματος εκχύλισης, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) εξηγεί το 19,97%, συνεισφέροντας στο 69,25% της ολικής διακύμανσης του πειράματος εκχύλισης.





Σχήμα 78. Ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA)

Σύμφωνα με το γράφημα των κύριων συνιστωσών με βάση τα παραγοντικά φορτία των μεταβλητών, μόνο το TPC, η ρουτίνη, η ελευρωπαΐνη και το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων είχαν θετική επίδραση στην PC1 ενώ η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) είχε αρνητική επίδραση στην PC1. Επιπλέον, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων και του TPC, του TPC και της ελευρωπαΐνης, καθώς και μεταξύ του καφεϊκού οξέος και της υδροξυτυροσόλης. Με βάση το γράφημα κύριων συνιστωσών με βάση τις τιμές των δειγμάτων, σημειώθηκαν 4 κύριες ομάδες δειγμάτων. Οι ομάδες είναι (α) H1, H3, H4 (β) M3, M4, M5, H5 (γ) HHP6, U6, H6, HP4, U2, U3, U4, HPP1 (δ) HHP2, HHP3, M1. Ο Πίνακας 51 παρουσιάζει τις ομάδες κωδικοποίησης αυτών των δειγμάτων.

Πίνακας 51. Ομάδες κωδικοποίησης των εκχυλισμάτων με NADES που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Κωδικός	Διαλύτης	Μέθοδος	Συνθήκες
H1	DESCA		
H2	DESMA		
H3	DESLA		
H4	DESGLY	HAE	60 °C/12000 rpm
H5	70 % EtOH		
H6	Νερό (Ρυθμιστικό δ/μα)		
M1	DESCA		
M2	DESMA		
M3	DESLA		
M4	DESGLY	MAE	60 °C
M5	70 % EtOH		
M6	Νερό (Ρυθμιστικό δ/μα)		
U1	DESCA		
U2	DESMA		
U3	DESLA		
U4	DESGLY	UAE	60 °C
U5	70 % EtOH		
U6	Νερό (Ρυθμιστικό δ/μα)		
HHP1	DESCA		
HHP2	DESMA		
HHP3	DESLA		
HHP4	DESGLY	HHPAE	600 MPa/10 min
HHP5	70 % EtOH		
HHP6	Νερό (Ρυθμιστικό δ/μα)		

Τα δείγματα της ομάδας (α) επιβεβαίωσαν ότι η HAE ήταν η πλέον αποτελεσματική μέθοδος που εφαρμόστηκε και ότι οι DES-LA, DES-CA και DES-GLY ήταν οι πλέον αποτελεσματικοί διαλύτες, παρέχοντας εκχυλίσματα με τις μέγιστες αποδόσεις, την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και την υψηλότερη συγκέντρωση σε ελευρωπαΐνη, ρουτίνη καθώς και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω ενότητα, η υψηλότερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά και η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση της HAE μπορεί να αποδοθεί και στους δύο μηχανισμούς: κονιοποίηση με μηχανική διατμητική δύναμη και ανάμιξη του στερεού με τον διαλύτη (Sun et al., 2017). Πολλές μελέτες κατέδειξαν ότι η HAE είναι μία πιο αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης σε σύγκριση με άλλες συμβατικές και καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης (Sun et al., 2017, Guo et al., 2017, Bilgin, Sahin, Dramur, & Sevgili, 2013, Liu et al., 2013, Zhu, Mang, Shen, & Xie, 2014, Zhu, Lin, Xie, Chen, & Wang, 2011, Shi, Zu, Zhao, & Yang, 2009).

Τα δείγματα της ομάδας (β) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με MAE και τους DES-LA και DES-GLY ως διαλύτες είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά ως προς το TPC, το DPPH, τη συγκέντρωση σε ελευρωπαΐνη και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων με τα εκχυλίσματα αιθανόλης που ελήφθησαν με HAE και MAE. Οι NADESs, με την εφαρμογή των μικροκυμάτων, θερμαίνονται γρήγορα σε συντομότερο χρόνο, με αποτέλεσμα να μειώνεται το ιξώδες και η επιφανειακή τάση τους, βοηθώντας έτσι την επιτάχυνση της διεργασίας της εκχύλισης και την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης (Yao et al., 2015, Ruesgas-Ramon et al., 2017, Pal & Jadeja, 2019).

Επιπλέον, τα δείγματα της ομάδας (γ) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με HHPAE και UAE παρουσίασαν τη χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης και τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά την UAE, η έλλειψη ανάδευσης κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των υπερήχων αποδείχθηκε λιγότερο αποτελεσματική για τους NADES λόγω του υψηλού ιξώδους τους. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με άλλες μελέτες: απαιτείται ανάδευση προκειμένου να αυξηθεί η μεταφορά της μάζας και να ενισχυθεί η διάχυση των ενώσεων-στόχων (Dai et al., 2013). Πρέπει να σημειωθεί ότι η οξείδωση και η αποικοδόμηση των δραστικών ενώσεων μπορεί να συμβεί με υπέρηχους λόγω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών (Ruesgas-Ramon et al., 2017, Dahmoune, Boulekbache, Moussi, Aoun, & Spigno, 2013).

Τα δείγματα της ομάδας (δ) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με HHPAE και τους DES-MA και DES-LA είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά ως προς την αντιοξειδωτική δράση (DPPH), τη συγκέντρωση σε ρουτίνη και λουτεολίνη και το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων με εκείνα του εκχυλίσματος που ελήφθη με τη MAE και τον DES-CA. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της HHPAE ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη της UAE. Η HHPAE που είναι μία μη θερμική διεργασία μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή διαπερατότητα με την αποπρωτονίωση των φορτισμένων ομάδων και διάσπαση των υδρόφοβων δεσμών (Briones-Labarca et al., 2015). Επιπλέον, μπορεί να αδρανοποιήσει τα

ένζυμα αποικοδόμησης, που μπορεί να συνεισφέρει στην υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με ΗΗΡ επίσης από άλλες φυτικές πηγές (Briones-Labarca et al., 2015, Akhmazillah et al., 2013). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που απεικονίζονται με την ανάλυση κύριων συστατικών είναι σύμφωνα με τα όσα συζητήθηκαν στις παραπάνω ενότητες.

4.3 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα σε εφαρμογές σε συστήματα τροφίμων

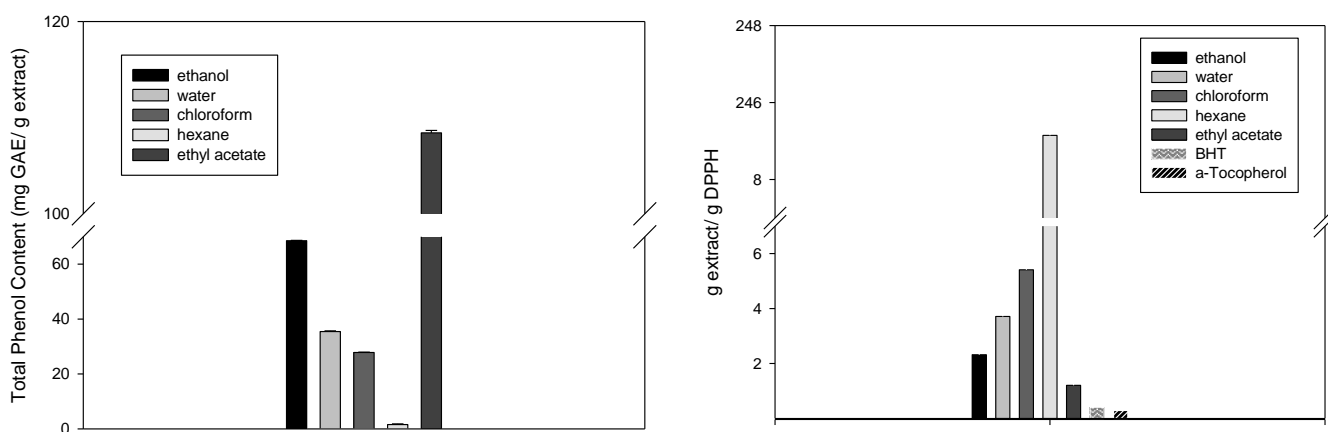
4.3.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων ελαιοπυρήνα σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ ή και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο

Αν και η αντιοξειδωτική δράση των επιμέρους φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα έχει αποδειχθεί, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματός του και των κλασμάτων του δεν έχουν διερευνηθεί με σαφήνεια. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη για να καθιερωθεί η βέλτιστη διαδικασία ώστε να ληφθούν εκχυλίσματα από τον ελαιοπυρήνα εμπλουτισμένα σε βιοδραστικές ενώσεις και να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους. Αξιολογήθηκαν το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών συστατικών (TPC), η αντιοξειδωτική δράση (με τη ρίζα DPPH), η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος του ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα λινελαϊκού οξέος, στο σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (Linoleic Acid Emulsion - LAE) και στο σύστημα με φυτικό έλαιο, όπως το ηλιέλαιο.

4.3.1.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, αντιοξειδωτική δράση και επιμέρους φαινολικά συστατικά του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος αιθανόλης 70% του ελαιοπυρήνα ήταν 68,34 mg GA/g εκχυλίσματος (Σχήμα 79). Το εκχύλισμα αιθανόλης 70% από τον ελαιοπυρήνα κλασματώθηκε με διάφορους διαλύτες όπως το εξάνιο, το χλωροφόρμιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, και το νερό. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών του εκχυλίσματος χλωροφορμίου, εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού ήταν 27,82, 1,58, 108,41 και 35,18 mg GA/g εκχυλίσματος, αντιστοίχως. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτά των κλασμάτων εξανίου, νερού και χλωροφορμίου ($P < 0,05$). Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες (Škerget et al., 2005, Lee et al., 2009). Το υψηλό TPC των εκχυλισμάτων αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα αντιπροσωπεύει την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση σε σύγκριση με τα κλάσματα εξανίου, χλωροφορμίου και νερού.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος του ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του, για λόγους σύγκρισης προσδιορίστηκε επιπλέον η αντιοξειδωτική δράση του BHT και της α -τοκοφερόλης. Η αντιοξειδωτική δράση του BHT, της α -τοκοφερόλης, του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του χλωροφορμίου, εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού σε συγκέντρωση 0,1% v/v ήταν: 0,41, 0,29, 2,32, 5,41, 247,2, 1,20 και 3,71, αντίστοιχα (Σχήμα 79). Η αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος και του κλάσματός του με οξικό αιθυλεστέρα ήταν υψηλότερη σε σχέση με εκείνες των υπόλοιπων κλασμάτων. Αυτή η αντιοξειδωτική τους δράση συσχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα των φαινολικών ενώσεων ειδικότερα σε ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, ρουτίνη και λουτεολίνη που ανιχνεύονται με ανάλυση HPLC (Πίνακας 52).



Σχήμα 79. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του αιθανολικού εκχυλίσματος και των κλασμάτων του (εκχυλίσματα χλωροφορμίου, εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού)

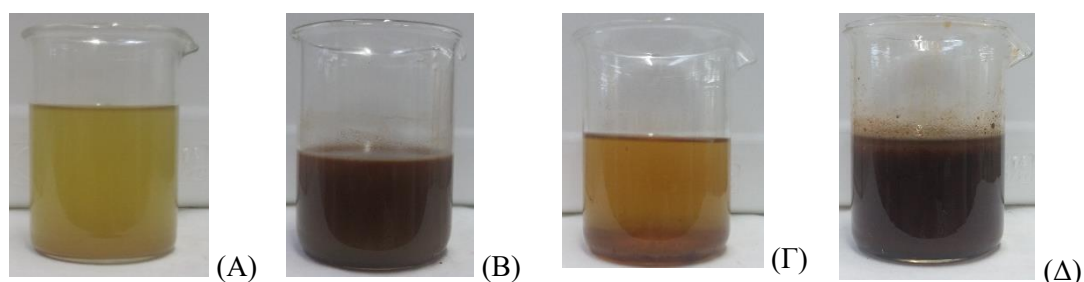
Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του παρουσιάζονται στον Πίνακα 52. Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη βρέθηκε ότι είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος αιθανόλης 70%. Η ρουτίνη (4 μ g/mg εκχυλίσματος), η βανιλίνη (0,87 μ g/mg εκχυλίσματος) και η λουτεολίνη (1,94 μ g/mg εκχυλίσματος) ήταν δευτερεύουσες φαινολικές ενώσεις. Οι συγκεντρώσεις της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης στα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα και του νερού ήταν 6,85 μ g/mg εκχυλίσματος και 20,21 μ g/mg εκχυλίσματος, αντίστοιχα για τον οξικό αιθυλεστέρα και 5,45 μ g/mg εκχυλίσματος και 9,25 μ g/mg εκχυλίσματος, αντίστοιχα για το νερό. Στο κλάσμα του χλωροφορμίου η υδροξυτυροσόλη (5,45 μ g/mg εκχυλίσματος) και η ελευρωπαΐνη (13,16 μ g/mg εκχυλίσματος) βρέθηκαν επίσης

σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στο κλάσμα του εξανίου, όλες οι φαινολικές ενώσεις εντοπίστηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

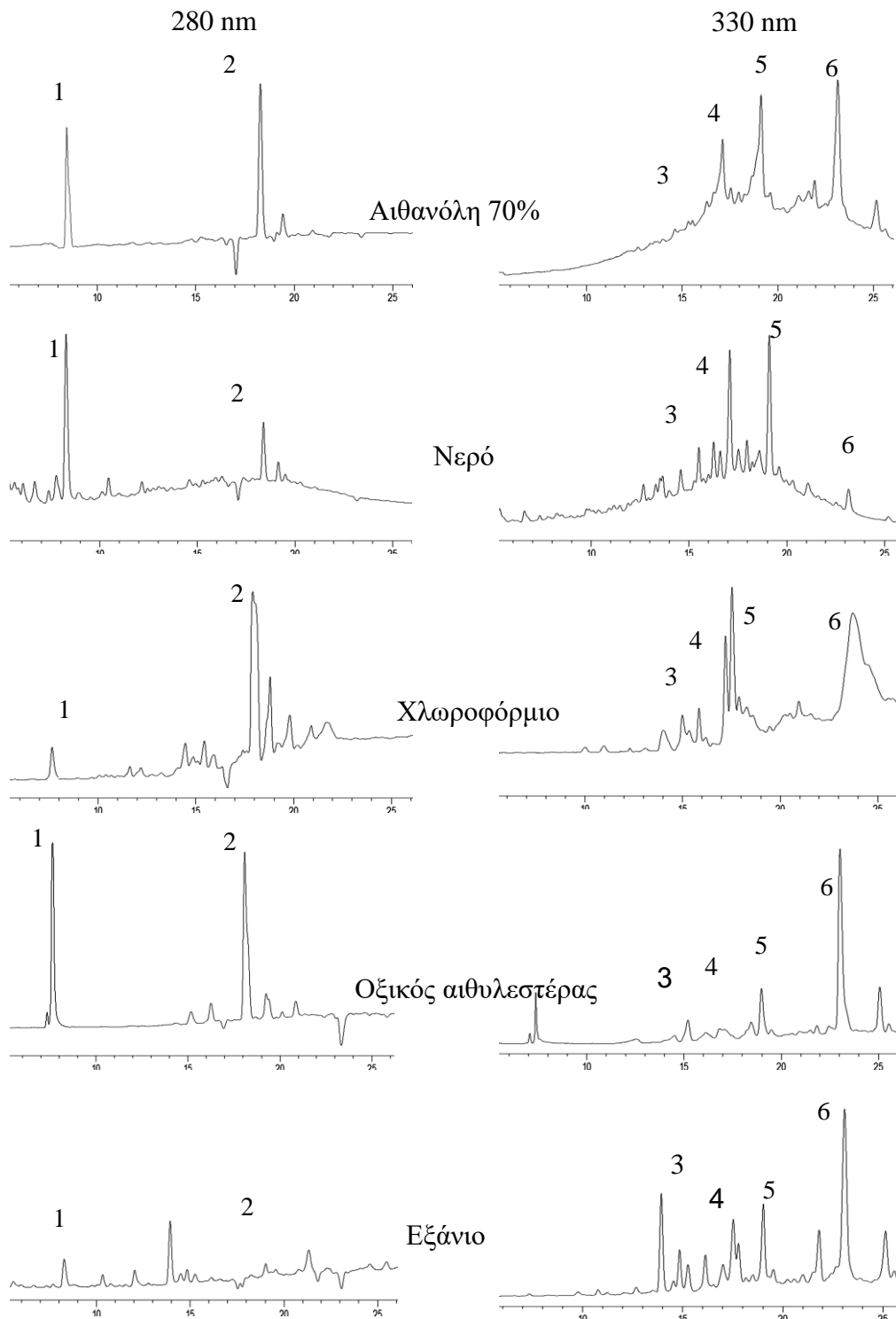
Πίνακας 52. Φαινολικά συστατικά του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του

Φαινολικά συστατικά	Αιθανόλη*	Νερό*	Χλωροφόρμιο*	Εξάνιο*	Οξικός αιθυλεστέρας*
Ελευρωπαΐνη	8,61±0,2	5,45±2,0	13,16±2,2	0,51±0,5	6,85±0,5
Υδροξυτυροσόλη	11,62±0,6	9,25±0,82	5,45±0,17	1,41±0,45	20,21±0,4
Καφεϊκό οξύ	0,08±0,1	0,06±0,1	0,18±0,1	0,09 ±0,1	0,02 ± 0,01
Βανιλίνη	0,87±0,2	1,59±0,2	1,11±0,07	0,04±0,05	0,92±0,05
Ρουτίνη	4,00±1,2	4,06±1,8	3,55±0,9	0,25±0,9	7,12± 0,12
Λουτεολίνη	1,94±0,3	0,17± 0,1	1,19± 0,2	0,12± 0,7	5,32±1,2
Σύνολο	27,12± 1,4	20,58 ±1,8	24,64 ±2,3	2,42± 1,14	40,44 ±1,4

*μg/mg εκχυλίσματος



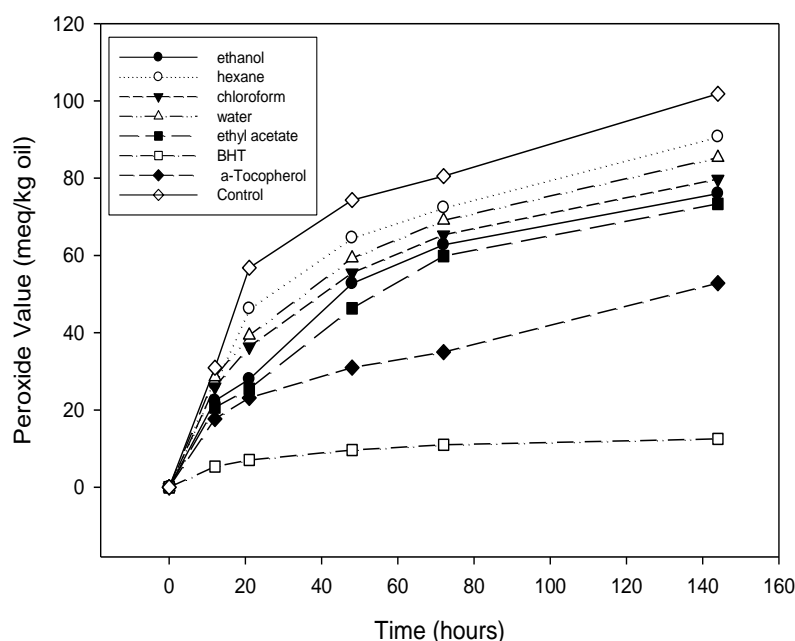
Σχήμα 80. Φαινολικά συστατικά του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% με εξάνιο (A), χλωροφόρμιο (B), οξικό αιθυλεστέρα (Γ) και νερό (Δ)



Σχήμα 81. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα που ανακτώνται από το εκχύλισμα αιθανόλης 70% και τα κλάσματά του. 1. Ελευρωπαΐνη (OL), 2. Υδροξυτυροσόλη (HY), 3. Καφεϊκό οξύ (CA), 4. Βανιλίνη (VA), 5. Ρουτίνη (RU), 6. Λουτεολίνη (LU)

4.3.1.2 Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων (PV) του συστήματος του λινελαϊκού οξέος με το αιθανολικό εκχύλισμα ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του

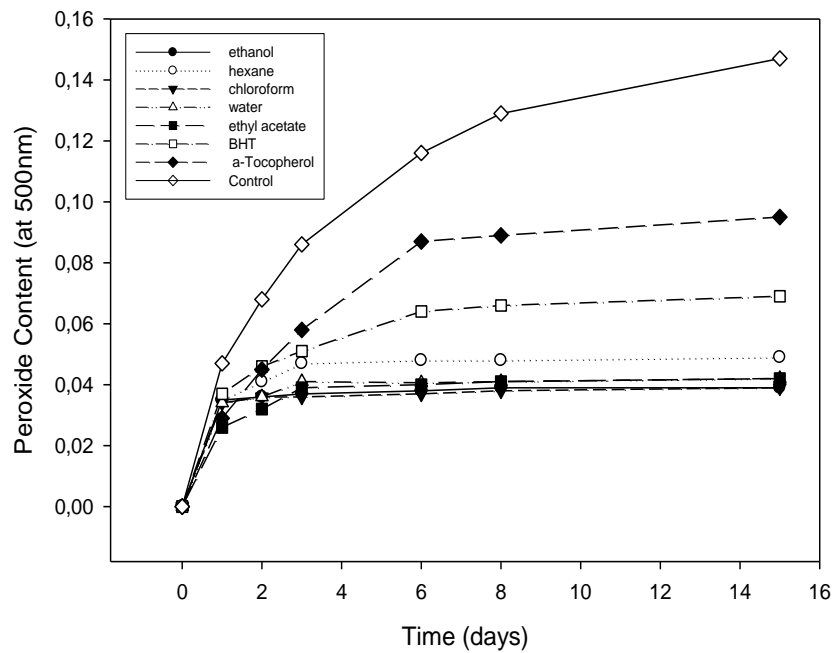
Για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως στο σύστημα του λινελαϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός υπεροξειδίων (PV) του δείγματος αναφοράς (τυφλού) αυξήθηκε από 30 meq/kg ελαίου έως 102 meq/g ελαίου με οξείδωση στους 40 °C για 140 h (Σχήμα 82). Ο αριθμός υπεροξειδίων του συστήματος λινελαϊκού οξέος με το BHT, την α -τοκοφερόλη, το αιθανολικό εκχύλισμα, και τα κλάσματα του εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού έναντι της οξείδωσης του για 140 h ήταν 12,5, 52,5, 76,1, 90,3, 79,3, 73,5 και 85,3 meq/kg ελαίου, αντίστοιχα (Σχήμα 82). Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα και το αιθανολικό εκχύλισμα είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνες των κλασμάτων του εξανίου, του χλωροφορμίου και του νερού. Η αποτελεσματικότητα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα και του εκχυλίσματος της αιθανόλης σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά που δείχνει ότι αναστέλλουν την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα και με άλλες μελέτες (Škerget et al., 2005, Lee et al., 2009).



Σχήμα 82. Αριθμός υπεροξειδίων (PV) του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του

4.3.1.3 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (Linoleic Acid Emulsion - LAE)

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του ελαιοπυρήνα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του θειοκυανικού αμμωνίου (3.4.8), η οποία μετρά το επίπεδο των υπεροξειδίων χρησιμοποιώντας το σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (LAE). Το Σχήμα 83 δείχνει ότι το περιεχόμενο των υπεροξειδίων του δείγματος αναφοράς αυξήθηκε από 0,047 σε 0,147 κατά τη διάρκεια των 15 ημερών αποθήκευσης. Το περιεχόμενο των υπεροξειδίων του συστήματος LAE με το BHT και την α -τοκοφερόλη αυξήθηκε από 0,037 σε 0,069 και από 0,029 σε 0,095 κατά τη διάρκεια των 15 ημερών αποθήκευσης, αντίστοιχα. Αντίθετα, το περιεχόμενο των υπεροξειδίων του συστήματος LAE με το αιθανολικό εκχύλισμα και των κλασμάτων του οξικού αιθυλεστέρα, του εξανίου, του χλωροφορμίου, και του νερού κατά τη διάρκεια των 15 ημερών αποθήκευσης αυξήθηκε σε 0,039, 0,042, 0,052, 0,040, και 0,049, αντιστοίχως. Είναι προφανές ότι το περιεχόμενο των υπεροξειδίων του συστήματος LAE με το αιθανολικό εκχύλισμα και των κλασμάτων του ήταν σημαντικά χαμηλότερο από αυτό του δείγματος αναφοράς, του συστήματος LAE με το BHT και την α -τοκοφερόλη. Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος αιθανόλης και των κλασμάτων του από τον ελαιοπυρήνα στο σύστημα LAE παρουσίασαν την εξής σειρά: εκχύλισμα αιθανόλης 70%, κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα>κλάσμα χλωροφορμίου>κλάσμα νερού>κλάσμα εξανίου>BHT> α -τοκοφερόλη>δείγμα αναφοράς. Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος αιθανόλης 70% ήταν παρόμοια με αυτή του κλάσματος του οξικού αιθυλεστέρα και του κλάσματος του χλωροφορμίου που μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις όπως η ελεωρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη και η ρουτίνη συνδέονται με την αντιοξειδωτική δράση, η οποία αντιστοιχεί στη συνεργιστική συμπεριφορά του συνόλου του εκχυλίσματος του ελαιοπυρήνα.

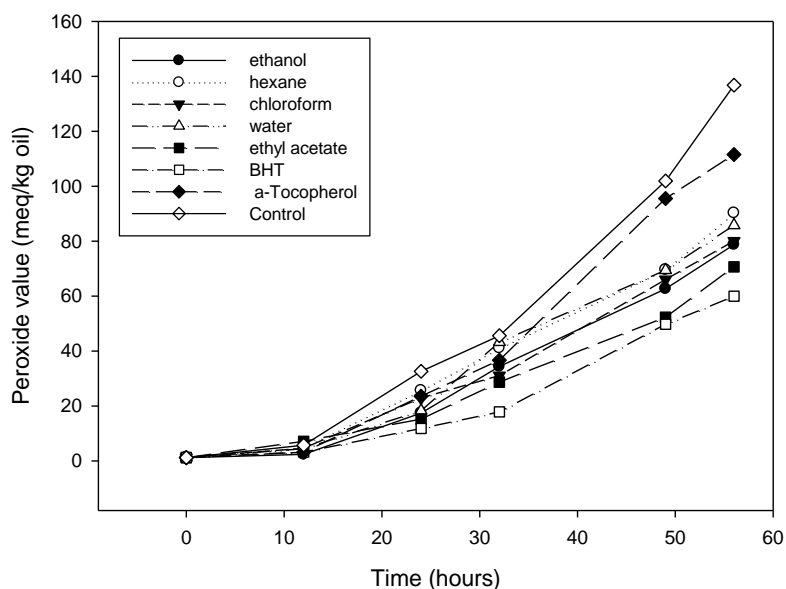


Σχήμα 83. Αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του στο σύστημα γαλακτώματος με λινελαϊκό οξύ (LAE)

4.3.1.4 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του σε φυτικό έλαιο, όπως το ηλιέλαιο με θερμική οξείδωση

Ο αριθμός υπεροξειδίων των δειγμάτων του ηλιέλαιου με BHT, α-τοκοφερόλη, αιθανολικό εκχύλισμα ελαιοπυρήνα, και τα κλάσματά του κατά τη θερμική οξείδωσή τους για 60 h στους 80 °C φαίνεται στο Σχήμα 84. Ο αριθμός υπεροξειδίων του δείγματος αναφοράς αυξήθηκε από 1,2 έως 136,8 meq/kg ελαίου κατά τη διάρκεια της θερμικής οξείδωσης. Ο αριθμός υπεροξειδίων των δειγμάτων ηλιέλαιου με BHT, α-τοκοφερόλη, αιθανολικό εκχύλισμα, κλάσμα εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα και νερού κατά τη διάρκεια της θερμικής οξείδωσης αυξήθηκε στα 59,9, 111,6, 78,7, 90,2, 80,0, 70,6 και 85,7 meq/kg ελαίου, αντίστοιχα. Ο αριθμός υπεροξειδίων του ηλιέλαιου με το αιθανολικό εκχύλισμα και με τα κλάσματά του ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτούς του δείγματος αναφοράς και της α-τοκοφερόλης. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε με το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα που είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων (108,41 mg GA/g εκχυλίσματος). Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος αιθανόλης και των κλασμάτων του από τον ελαιοπυρήνα στη θερμική οξείδωση με βάση τον αριθμό υπεροξειδίων του ηλιέλαιου

ήταν κατά σειρά: BHT>κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα> αιθανολικό εκχύλισμα> κλάσμα χλωροφορμίου>κλάσμα νερού>κλάσμα εξανίου> α-τοκοφερόλης>δείγμα αναφοράς.



Σχήμα 84. Αντιοξειδωτική δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα και των κλασμάτων του κατά τη θερμική οξείδωση του ηλιέλαιου

4.3.2 Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο)

Ο εμπλουτισμός του ελαιόλαδου με εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη ορισμένης ποσότητας εκχυλίσματος φαινολικών συστατικών ως έχει ή και σε εγκλεισμένη μορφή σε φορέα μαλτοδεξτρίνης.

4.3.2.1 Χαρακτηρισμός των φαινολικών συστατικών σε εγκλεισμένη μορφή

Τα εκχυλίσματα των φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα που παρελήφθησαν με υδατική ενζυμική εκχύλιση με συμβατική μέθοδο και με χρήση μικροκυμάτων επιλέχθηκαν και εγκλείστηκαν σε μαλτοδεξτρίνη ως φορέα εγκλεισμού και με εφαρμογή της ξήρανσης υπό κατάψυξη και προσδιορίστηκαν οι ιδιότητες των προϊόντων εγκλεισμού (Πίνακας 53). Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα που επιλέχθηκαν ήταν με συμβατική εκχύλιση (CEW και CEE)

στους 60 °C για 1 h και με εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (MAEW και MAEE) στους 60 °C για 30 min. Η απόδοση εγκλεισμού των φαινολικών συστατικών ελαιοπυρήνα (MEE%) κυμάνθηκε από 82,39 έως 92,12%. Τα εκχυλίσματα ελαιοπυρήνα που ελήφθησαν από τη συμβατική μέθοδο και την εκχύλιση με μικροκύματα έδειξαν υψηλές τιμές MEE%, αποδεικνύοντας έτσι μία καλή προστασία που προσφέρεται από το φορέα εγκλεισμού. Ωστόσο, η MEE% ήταν ανεξάρτητη από τη μέθοδο εκχύλισης καθώς και από τη χρήση ενζύμου.

Εξετάστηκαν οι ιδιότητες των προϊόντων εγκλεισμού που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την ενσωμάτωσή τους σε συστήματα τροφίμων. Οι τιμές της περιεκτικότητας σε υγρασία ήταν εντός της αναμενόμενης κλίμακας για τα κονιοποιημένα προϊόντα φαινολικών συστατικών (0,39-1,58%), όπως ανέφεραν άλλοι ερευνητές (Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009). Όσον αφορά την υγροσκοπικότητα, αυτή μειώθηκε μετά τον εγκλεισμό, αυξάνοντας τη σταθερότητα των προϊόντων εγκλεισμού (Πίνακας 53). Η διαλυτότητα των προϊόντων εγκλεισμού ενισχύθηκε, και συγκεκριμένα από 64,93 έως 71,52%, για τα μη εγκλεισμένα εκχυλίσματα, έφθασε μετά τον εγκλεισμό σε 91,28 έως 97,41%, αντίστοιχα. Παρόμοιες παρατηρήσεις για βελτιωμένη περιεκτικότητα σε υγρασία, υγροσκοπικότητα και διαλυτότητα έχουν αναφερθεί για τα εγκλεισμένα προϊόντα σε προηγούμενη εργασία (Chranioti, Chanioti, & Tzia, 2016). Από τα αποτελέσματα του εγκλεισμού των εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών, μπορεί να επιβεβαιωθεί η ανάπτυξη σταθερών προϊόντων φαινολών από ελαιοπυρήνα, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων, όπως σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο), που εξετάζεται στη συνέχεια.

Πίνακας 53. Ιδιότητες των εγκλεισμένων εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα

Δείγμα ^a	MEE% ^b	Υγρασία%	a _w ^c	Διαλυτότητα%	Υγροσκοπικότητα ^d	Αντιοξειδωτική δράση ^e
CEW	90,12±1,87	0,99±0,01	0,16±0,00	97,41±0,11	22,88±0,13	1,25±0,05
CEE	88,89±1,46	1,85±0,04	0,17±0,00	96,07±0,10	22,83±0,14	0,98±0,06
MAEW	87,58±1,59	1,88±0,02	0,18±0,00	95,32±0,09	23,19±0,09	0,89±0,07
MAEE	82,39±1,53	1,49±0,04	0,16±0,00	91,28±0,07	6,69±0,05	0,69±0,05
MD	-	6,28 ± 0,03	0,98±0,00	88,21 ± 0,10	24,95 ± 0,09	-
A	-	3,58±0,06	0,36±0,00	71,52±0,13	67,28±0,12	-
B	-	4,58±0,08	0,36±0,00	64,93±0,09	65,02±0,13	-
C	-	4,46±0,09	0,39±0,00	68,16±0,10	64,59±0,04	-
D	-	3,89±0,07	0,37±0,00	71,58±0,12	64,87±0,07	-

^a μη εγκλεισμένα εκχυλίσματα: A: CE (1h/60°C), B: CEE (1h/60°C), C: MAE (30min/60°C), D: MAEE (30min/60°C)

^b MEE%: απόδοση εγκλεισμού (%)

^c a_w: ενεργότητα νερού στους 25°C,

^d: g H₂O/100 g ξ.β.

^e: mg Trolox/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

4.3.2.2 Ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων των φαινολικών συστατικών ως έχουν ή και σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο)

Το ελαιόλαδο εμπλουτίστηκε με εκχυλίσματα φαινολικών ενώσεων από ελαιοπυρήνα, ως έχουν ή και σε εγκλεισμένη μορφή. Το αρχικό ελαιόλαδο (ΟΟ) καθώς και τα εμπλουτισμένα έλαια (ΟΟ 1-4) αναλύθηκαν για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών τους και τις επιμέρους φαινολικές τους ενώσεις. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την οξειδωτική τους σταθερότητα των συστημάτων στα οποία ενσωματώθηκαν. Το TPC του αρχικού ελαιόλαδου (ΟΟ) πριν τον εμπλουτισμό ήταν 0,045 mg GA/g ελαίου και για την παρασκευή των εμπλουτισμένων ελαίων χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε εκχυλίσματος, ώστε να αντιστοιχεί σε προσθήκη ποσότητας ~0,115 mg φαινολικών ενώσεων (GA)/g ελαίου (Πίνακας 54). Το μέγιστο όριο ενός συνθετικού αντιοξειδωτικού στα λιπαρά και τα έλαια είναι αντίστοιχα 0,200 mg GA/g ελαίου (JECFA, 2016).

Πίνακας 54. Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC) και αντιοξειδωτική δράση (DPPH) εκχυλισμάτων από ελαιοπυρήνα

Πηγή φαινολών	Εγκλεισμός	TPC των εκχυλισμάτων (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)	Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (mg Trolox/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)
CEE	×	11,41±0,40	9,14±0,08
MAEE	×	14,37±0,97	9,87±0,30
CEEenc	✓	11,15±0,90	0,98±0,05
MAEEenc	✓	14,27±0,81	0,69±0,05

CEE: εκχύλισμα με συμβατική υδατική ενζυμική εκχύλιση.

MAEE: εκχύλισμα με υδατική ενζυμική εκχύλιση και χρήση μικροκυμάτων.

CEEenc: εγκλεισμένο εκχύλισμα συμβατικής υδατικής ενζυμικής εκχύλισης.

MAEEenc: εγκλεισμένο εκχύλισμα υδατικής ενζυμικής εκχύλισης και χρήσης μικροκυμάτων.

Στον Πίνακα 55 παρουσιάζονται οι τιμές του TPC και της αντιοξειδωτικής δράσης των ελαίων για την πρώτη και την τελευταία (15^η) ημέρα αποθήκευσής τους στους 80 °C. Το TPC στα εμπλουτισμένα έλαια που εξετάστηκαν μειώθηκε σημαντικά κατά την αποθήκευση σε επιταχυνόμενες συνθήκες (P<0,05). Ωστόσο, τα εμπλουτισμένα έλαια παρουσίασαν μικρότερη μείωση του TPC, ειδικά με εκείνα τα εγκλεισμένα εκχυλίσματα. Ειδικότερα, η μείωση του TPC στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης ήταν 87%, 55%, 52%, 40% και 35% για τα OO, OO1, OO2, OO3 και OO4, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Frag, Mahmoud, & Basuny, 2007).

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα με υδατική ενζυμική εκχύλιση με συμβατικό τρόπο (CEE) και με χρήση μικροκυμάτων (MAEE) ήταν αντιστοίχα 9,14 και 9,87 mg Trolox/g ελαιοπυρήνα ξ.β., και η αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση των εγκλεισμένων εκχυλισμάτων (CEEenc και MAEEenc) ήταν 0,98 και 0,69 mg Trolox/g ελαιοπυρήνα ξ.β.. Πριν από τον εμπλουτισμό, η αντιοξειδωτική δράση του ελαιόλαδου ήταν 0,022 mg Trolox/g ελαίου. Σε όλες τις περιπτώσεις εμπλουτισμού υπήρξε σημαντική αύξηση της τιμής Trolox (P<0,05), γεγονός που δείχνει την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης του ελαίου. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών του ελαιοπυρήνα όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Η μεγαλύτερη αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης (%) παρατηρήθηκε για το OO1 (81%) και ακολούθως από τα OO2 (80%), OO3 (76%) και OO4 (77%). Τα ευρήματα συμφωνούν και με άλλους ερευνητές (Delgado-Adámez, Baltasar, Concepción, Yuste, & Martín-Vertedor, 2014, Salta, Mylona, Chiou, Boskou, &

Andrikopoulos, 2002). Η αντιοξειδωτική δράση των εμπλουτισμένων ελαίων που εξετάστηκαν επίσης μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($P < 0,05$), ενώ τα εμπλουτισμένα έλαια με τα εγκλεισμένα εκχυλίσματα έδειξαν τη μικρότερη μεταβολή στις τιμές της αντιοξειδωτικής δράσης. Συγκεκριμένα, οι τιμές αντιοξειδωτικής δράσης στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης ήταν μειωμένες κατά 63%, 57%, 52%, 40% και 36% έναντι της αρχικής αντιοξειδωτικής δράσης των ΟΟ, ΟΟ1, ΟΟ2, ΟΟ3 και ΟΟ4, αντίστοιχα.

Πίνακας 55. Το TPC και η αντιοξειδωτική ικανότητας των ελαίων για την πρώτη (Ημέρα 0) και την τελευταία ημέρα (Ημέρα 15) αποθήκευσής τους στους 80 °C

Έλαιο	Εκχύλισμα εμπλουτισμού	TPC (mg GA/g ελαίου) Ημέρα: 0	TPC (mg GA/g ελαίου) Ημέρα: 15	Αντιοξειδωτική δράση (mg Trolox/g ελαίου) Ημέρα: 0	Αντιοξειδωτική δράση (mg Trolox/g ελαίου) Ημέρα: 15
ΟΟ	Αρχικό ελαιόλαδο	0,045±0,001	0,006±0,001 ^c	0,022±0,001	0,008±0,001
ΟΟ1	CEE	0,157±0,001	0,070±0,001 ^b	0,117±0,001	0,050±0,001
ΟΟ2	MAEE	0,154±0,001	0,072±0,002 ^b	0,109±0,002	0,052±0,001
ΟΟ3	CEEenc	0,155±0,002	0,092±0,001 ^a	0,098±0,002	0,058±0,001
ΟΟ4	MAEEenc	0,152±0,004	0,098±0,002 ^a	0,095±0,003	0,061±0,001

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c) στην ίδια στήλη ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan

Το προφίλ των φαινολικών ενώσεων των εμπλουτισμένων ελαίων που εξετάστηκαν παρουσιάζεται στον Πίνακα 56. Στο ΟΟ, ανιχνεύθηκαν σε μικρές ποσότητες τρεις κύριες φαινολικές ενώσεις [ελευρωπαΐνη (OL), βανιλίνη (VA) και ρουτίνη (RU)]. Ο εμπλουτισμός του ΟΟ με τα εκχυλίσματα του ελαιοπυρήνα, εγκλεισμένα ή μη, είχε ως αποτέλεσμα τα έλαια να εμπλουτιστούν και με άλλες φαινολικές ενώσεις [OL, VA, RU, υδροξυτυροσόλη (HY), καφεϊκό οξύ (CA) και λουτεολίνη (LU)]. Το ποσοστό μείωσης των επιμέρους φαινολικών ενώσεων των εμπλουτισμένων ελαίων που εξετάστηκαν κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C παρουσιάζεται στο Σχήμα 85.

Πίνακας 56. Φαινολικό προφίλ του αρχικού ελαιόλαδου και των εμπλουτισμένων ελαίων στο χρόνο 0.

Φαινολικά συστατικά (μg/g oil) ^a	Αρχικό ελαιόλαδο	001	002	003	004
OL	30,7±5,1 ^a	93,2±12,3 ^b	83,0±10,8 ^b	86,0±11,2 ^b	85,1±11,9 ^b
HY	n.d.	12,3±2,5 ^a	15,8±1,8 ^b	18,3±1,3 ^b	17,7±2,1 ^b
CA	n.d.	0,5±0,0 ^a	0,4±0,1 ^a	0,8±0,0 ^b	0,5±0,0 ^a
VA	1,2±0,1 ^a	2,2±0,4 ^c	1,4±0,2 ^{bc}	2,8±0,2 ^d	1,2±0,1 ^b
RU	4,5±0,8 ^a	7,5±0,4 ^c	5,2±1,4 ^b	7,2±0,8 ^c	4,9±0,5 ^b
LU	n.d.	0,9±0,0 ^a	1,5±0,3 ^b	0,7±0,0 ^a	1,1±0,1 ^b
Σύνολο^c	36,4±6,0 ^a	116,6±15,6 ^b	107,3±14,7 ^b	115,8±13,5 ^c	111,4±14,7 ^{bc}

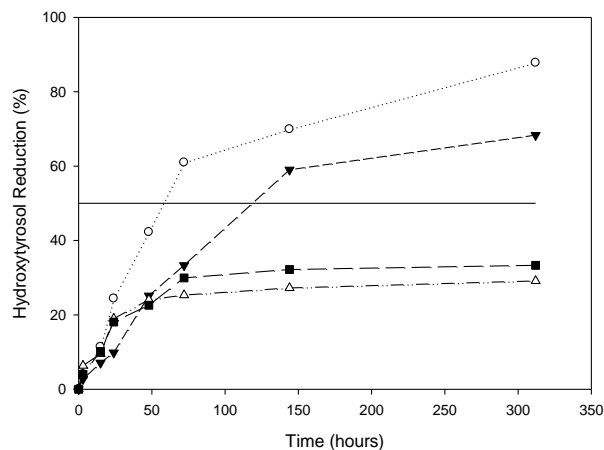
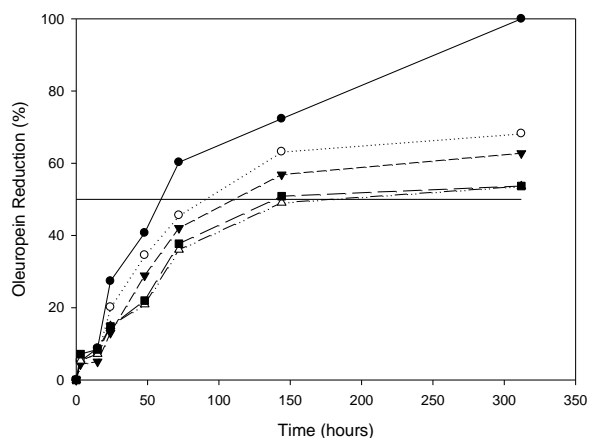
^a Μέση τιμή τριών επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

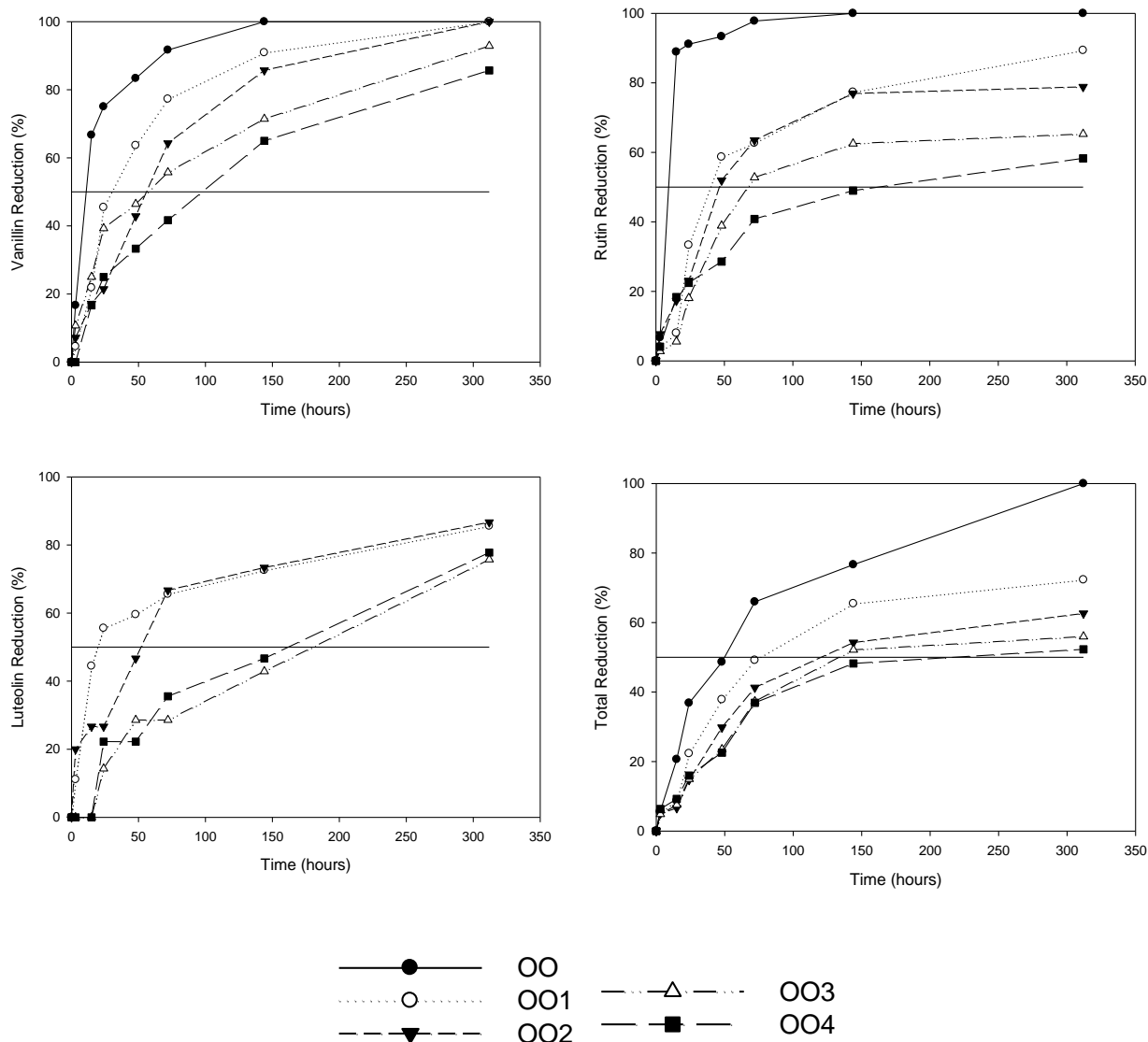
^b Ελευρωπαΐνη (OL), Υδροξυτυροσόλη (HY), Καφεϊκό οξύ (CA), Βανιλίνη (VA), Ρουτίνη (RU), Λουτεολίνη (LU) - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

n.d. μη ανιχνεύσιμη

^c Σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών - mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.

Οι τιμές με διαφορετικούς δείκτες (a, b, c, d) στην ίδια γραμμή ήταν σημαντικά διαφορετικές, με βάση το κριτήριο Duncan





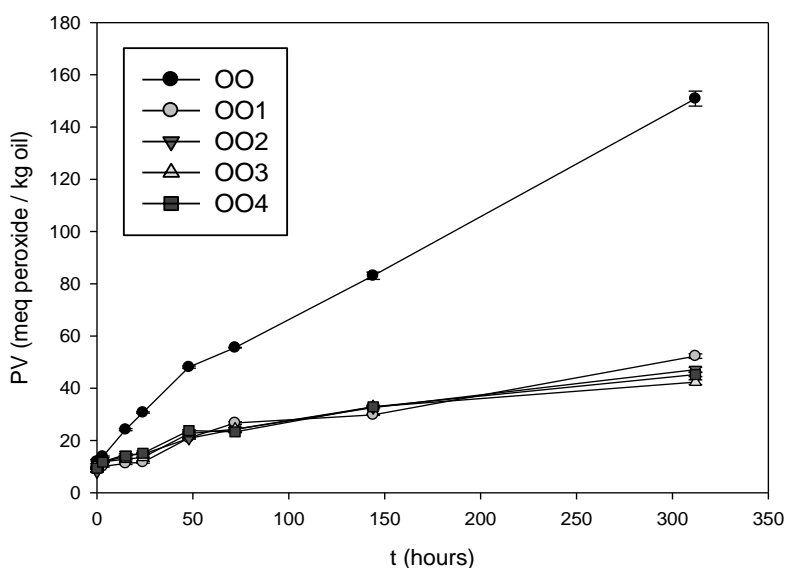
Σχήμα 85. Ποσοστό μείωσης των επιμέρους φαινολικών ενώσεων του αρχικού ελαιόλαδου (OO) και των εμπλουτισμένων ελαίων κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C

Το OO κατά τις πρώτες 60 h της περιόδου αποθήκευσης στους 80 °C έχασε σχεδόν το 50% της περιεκτικότητάς του σε OL, ενώ στην περίπτωση των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων, αυτή η μείωση παρατηρήθηκε μετά από περίπου 90, 112, 140 και 165 h για τα OO1, OO2, OO3 και OO4, αντίστοιχα. Τα έλαια εμπλουτισμένα με τα εγκλεισμένα εκχυλίσματα ελαιοπυρήνα (OO3 και OO4) έδειξαν τις ελάχιστες απώλειες της συγκέντρωσης της HY και LU στο τέλος της περιόδου αποθήκευσης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 85, το OO έχασε σχεδόν το 50% της περιεκτικότητάς του σε RU κατά τις πρώτες 8 h αποθήκευσης στους 80 °C, ενώ όσον αφορά τα εμπλουτισμένα έλαια, αυτή η μείωση ανιχνεύθηκε μετά από περίπου 40, 45, 70 και 150 h για το OO1, το OO2, το OO3 και το OO4, αντίστοιχα. Επιπλέον, όσον αφορά το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων, το OO έχασε σχεδόν το 50% της περιεκτικότητάς του

σε αυτές κατά τις πρώτες 50 h αποθήκευσης, ενώ τα εμπλουτισμένα έλαια μετά από περίπου 72, 125, 140 και 250 h για τα ΟΟ1, ΟΟ2, ΟΟ3 και ΟΟ4, αντίστοιχα.

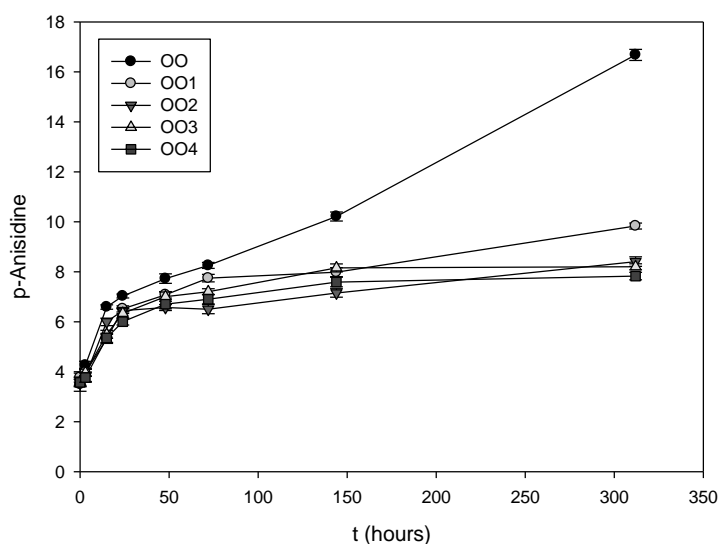
Οι φαινολικές ενώσεις είναι επιρρεπείς στην οξείδωση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστη γεύση και σε μικρότερη διάρκεια ζωής των προϊόντων στα οποία ενσωματώνονται (Halliwell, 2008, Chanioti et al., 2016). Επομένως, αυτές πρέπει να προστατευτούν πριν από την ενσωμάτωσή τους στο ελαιόλαδο με την μέθοδο του εγκλεισμού (Fang & Bhandari, 2010). Γενικότερα, τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα με εγκλεισμένα εκχυλίσματα ελαιοπυρήνα έδειξαν τις ελάχιστες μειώσεις των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων στο τέλος της αποθήκευσης. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση της ΟL μειώθηκε κατά 54% και 53%, της ΗΥ κατά 30% και 33% και του συνόλου των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων κατά 55% και 52% στα ΟΟ3 και ΟΟ4, αντίστοιχα, μετά από περίπου 300 h (13 ημέρες) στους 80 °C.

Οι τιμές του αριθμού των υπεροξειδίων (PV) που προσδιορίστηκαν στο ΟΟ και στα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C για καθορισμένη περίοδο παρουσιάζονται στο Σχήμα 86. Ο αριθμός υπεροξειδίων όλων των εμπλουτισμένων ελαίων ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν του ΟΟ για κάθε χρονική στιγμή, υποδεικνύοντας ότι και ο ελαιοπυρήνας αποτελεί σημαντική πηγή φαινολικών συστατικών που είναι ικανές να βελτιώσουν την οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων ($P < 0,05$). Μέχρι το τέλος της περιόδου αποθήκευσης, το PV αυξήθηκε από 11,9 έως 150,9 meq O₂/kg για το ΟΟ, από 9,8 έως 52,3 meq O₂/kg για το ΟΟ1, από 8,0 έως 47,1 meq O₂/kg για το ΟΟ2, από 8,9 έως 42,3 meq O₂/kg για το ΟΟ3 και από 9,3 έως 45,3 meq O₂/kg για το ΟΟ4.



Σχήμα 86. Μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων (PV) στο αρχικό ελαιόλαδο (ΟΟ) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C

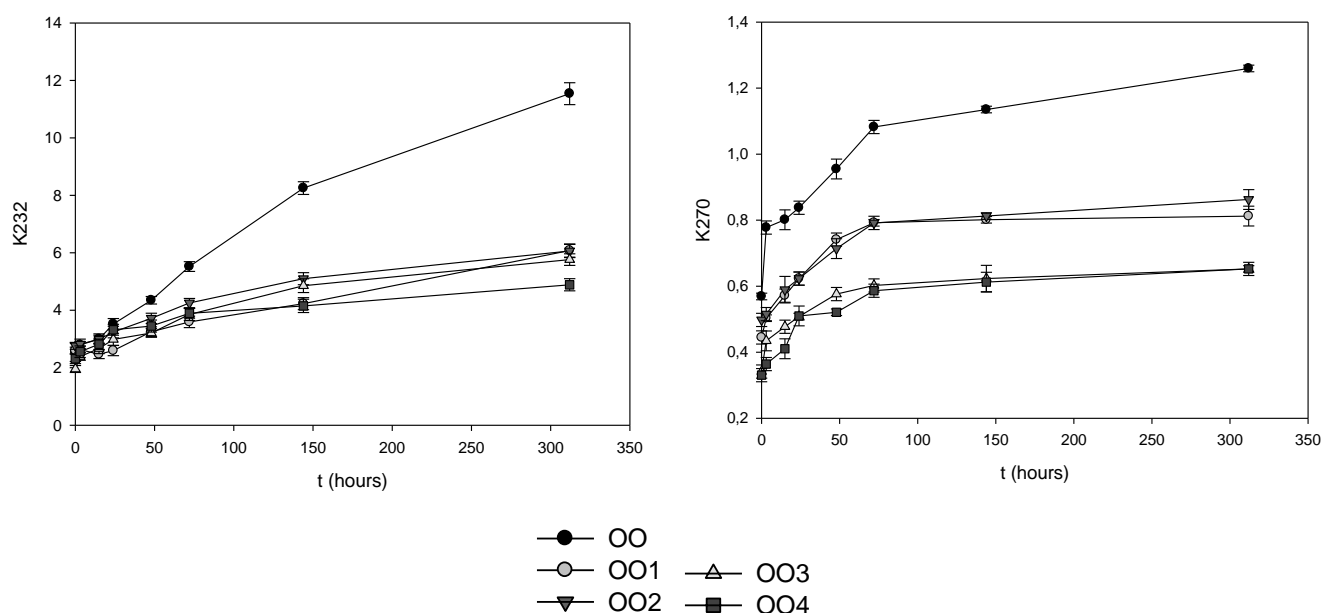
Τα υπεροξειδία αποσυντίθενται κατά την έκθεσή τους σε υψηλή θερμοκρασία προς προϊόντα δευτερογενούς οξείδωσης όπως αλδεΐδες, αλειφατικές κετόνες, αλκοόλες, οξέα και υδρογονάνθρακες. Για να εξασφαλιστεί καλύτερη παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, απαιτείται η ταυτόχρονη ανίχνευση των πρωτογενών και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Ο αριθμός ανισιδίνης (p-AV) είναι ένας αξιόπιστος δείκτης των δευτερογενών προϊόντων που σχηματίζονται κατά την οξείδωση των λιπαρών (Zhang et al., 2010). Ο αριθμός ανισιδίνης που προσδιορίστηκε στο ΟΟ και στα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C παρουσιάζεται στο Σχήμα 87. Ο αριθμός ανισιδίνης αυξήθηκε κατά την περίοδο αποθήκευσης, από 3,5 έως 16,7 για το ΟΟ, από 3,7 έως 9,8 για το ΟΟ1, από 3,5 έως 8,4 για ΟΟ2, από 3,6 έως 8,2 για το ΟΟ3 και από 3,6 έως 7,8 για το ΟΟ4. Ο αριθμός ανισιδίνης όλων των εμπλουτισμένων ελαίων ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν του αρχικού ελαιόλαδου (ΟΟ) για κάθε χρονική στιγμή ($P < 0,05$).



Σχήμα 87. Μεταβολή του αριθμού ανισιδίνης (p-AV) στο αρχικό ελαιόλαδο (ΟΟ) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C

Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, οι διπλοί δεσμοί των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιόλαδου υφίστανται δομική αναδιάταξη που δημιουργεί συζυγή διένια, τα οποία απορροφούν σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 232 nm. Όταν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (π.χ. λινελαϊκό οξύ) υποβάλλονται σε οξείδωση, η σύζευξη μπορεί να επεκταθεί σε άλλο διπλό δεσμό, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συζυγών τριενίων, τα οποία απορροφούν σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 270 nm (Poiana, Trasca, Moigradean, & Gaita, 2016). Οι συντελεστές απορρόφησης K232 και K270 χρησιμοποιήθηκαν

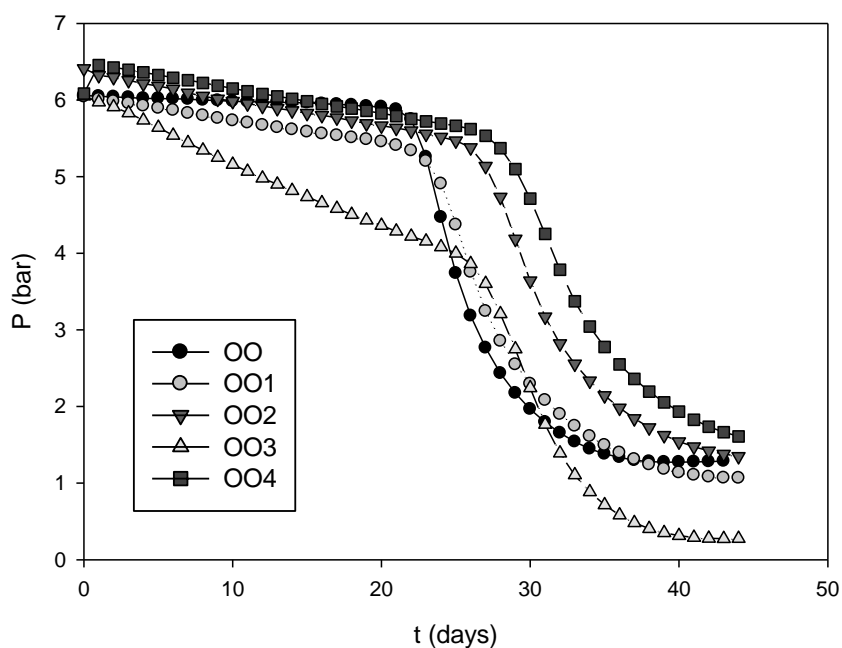
ως σημαντικοί δείκτες για την παρακολούθηση της οξειδωσης των λιπαρών. Η μεταβολή των δεικτών K232 και K270 στο ΟΟ και στα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα κατά την αποθήκευσή τους στους 80 ° C παρουσιάζονται στο Σχήμα 88. Μία αύξηση του δείκτη K232 παρατηρήθηκε για όλα τα δείγματα, ωστόσο ο ρυθμός αύξησης του αρχικού ελαιόλαδου (ΟΟ) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με αυτούς των εμπλουτισμένων ελαίων. Ο δείκτης K270 του ΟΟ αυξήθηκε ραγδαία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης από 0,57 σε 1,27. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα εμπλουτισμένα έλαια με εγκλεισμένα εκχυλίσματα έδειξαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές του δείκτη K270 σε σύγκριση με το ΟΟ και τα εμπλουτισμένα έλαια ΟΟ1 και ΟΟ2 ($P<0,05$).



Σχήμα 88. Μεταβολή των δεικτών K232 και K270 στο αρχικό ελαιόλαδο (ΟΟ) και στα εμπλουτισμένα έλαια κατά την αποθήκευσή τους στους 80 °C

Η αποτελεσματικότητα του εμπλουτισμού του ελαιόλαδου εκτιμήθηκε με την ταχεία μέθοδο Oxitest® που επιτρέπει την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των εμπλουτισμένων ελαίων. Τα αποτελέσματα της μεταβολής της οξειδωτικής σταθερότητας του αρχικού ελαιόλαδου (ΟΟ) και των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες παρουσιάζονται στο Σχήμα 89. Οι περίοδοι επαγωγής (IP) για τα έλαια που εξετάστηκαν ήταν 22,13 h, 23,59 h, 27,51 h, 25,59 h και 27,99 h για το αρχικό ελαιόλαδο, το ΟΟ1, το ΟΟ2, το ΟΟ3 και το ΟΟ4, αντίστοιχα. Όπως αναμενόταν, το αρχικό ελαιόλαδο οξειδώθηκε πιο γρήγορα, ενώ οι

φαινολικές ενώσεις από τον ελαιοπυρήνα επέτυχαν να επιτείνουν την οξειδωτική σταθερότητα των εμπλουτισμένων ελαίων, παρέχοντας υψηλότερες τιμές IP σε σύγκριση με το αρχικό ελαιόλαδο. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τους Suárez, Romero, & Motilva (2010), που ανέφεραν ότι η προσθήκη εκχυλίσματος ελαιοπυρήνα σε παρθένο ελαιόλαδο αύξησε τους χρόνους επαγωγής των εμπλουτισμένων ελαίων. Ως εκ τούτου, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι ενισχύουν αποτελεσματικά την οξειδωτική σταθερότητα των τελικών προϊόντων.



Σχήμα 89. Μεταβολή της οξειδωτικής σταθερότητας του αρχικού ελαιόλαδου (OO) και των εμπλουτισμένων ελαίων υπό επιταχυνόμενες συνθήκες με τη μέθοδο Oxitest®

Συμπεράσματα – Προτάσεις

4.1 Συμπεράσματα

Η συνήθης πρακτική αξιοποίησης του ελαιοπυρήνα, του στερεού παραπροϊόντος από την παραγωγή του ελαιόλαδου είναι για ανάκτηση του περιεχόμενου πυρηνέλαιου με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και η περαιτέρω χρήση του ως εδώδιμο έλαιο μετά από εξευγενισμό, όπως και η χρήση του στερεού υπολείμματος, του πυρηνόξυλου, ως πρόσθετο σε ζωοτροφές, ως καύσιμη βιομάζα ή τέλος η άμεση διάθεσή του χωρίς κάποια επεξεργασία.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα με έμφαση στην παραγωγή ελαίου ενισχυμένου ποιοτικά σε βιοδραστικά συστατικά, όπως στερόλες και σκουαλένιο, αλλά και στην παραλαβή φαινολικών συστατικών, όπως κυρίως ελευρωπαΐνης, υδροξυτυροσόλης και ρουτίνης, απευθείας από τον ελαιοπυρήνα, που μπορούν να ενσωματωθούν σε συστήματα τροφίμων.

Χρησιμοποιήθηκε νωπός ελαιοπυρήνας από ελαιοτριβείο που εφαρμόζει φυγοκεντρική κατεργασία τριών φάσεων, ο οποίος ξηράνθηκε και αλέσθηκε σε κατάλληλη κοκκομετρία. Αρχικά εξετάστηκε η πορεία αξιοποίησης του ξηρού ελαιοπυρήνα για την παραλαβή ελαίου (πυρηνέλαιου) με έμφαση στα βιοδραστικά του συστατικά [ασαπωνοποίητο υλικό (USM%), στερόλες, σκουαλένιο] με συμβατική εκχύλιση. Από την κινητική μελέτη της διεργασίας της εκχύλισης εξετάζοντας τους κύριους παράγοντες που την επηρεάζουν (θερμοκρασία-T, αναλογία στερεού/υγρού-S:L, ταχύτητα ανάδευσης-AS και χρόνος εκχύλισης-t) βρέθηκε ότι συνθήκες υψηλότερης θερμοκρασίας (60 °C), αναλογίας υγρού/στερεού (12:1 mL/g) και ταχύτητας ανάδευσης (800 rpm) οδήγησαν σε αυξημένη απόδοση ελαίου (6,56-7,11% ελαιοπυρήνα ξ.β.) και ευνόησαν την εκχύλιση του ασαπωνοποίητου υλικού (USM%=3,50-4,23% ελαίου), των στερολών [β-σιτοστερόλη (0,81-1,18 mg/g ελαίου), καμπεστερόλη (0,16-0,20 mg/g ελαίου), στιγμαστερόλη (0,10-0,14 mg/g ελαίου)] και του σκουαλένιου (3,95-4,20 mg/g ελαίου) στο εκχυλιζόμενο έλαιο. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν σε απόλυτη συμφωνία με τις προτεινόμενες από τα δύο μαθηματικά μοντέλα που δοκιμάστηκαν [το μοντέλο από τους So& Macdonald, (1986) και το μοντέλο των Sulaiman et al. (2013)]. Σημειώνεται ότι η επικράτηση του σταδίου έκπλυσης, όπου απομακρύνεται το έλαιο από την εξωτερική επιφάνεια του σπόρου (washing step) έναντι του σταδίου διάχυσης (diffusion step) του διαλύτη στο σπόρο επιβεβαιώθηκε από τα κινητικά μοντέλα τόσο για την εκχύλιση του ελαίου και του ασαπωνοποίητου υλικού του όσο και για την ανάκτηση των κύριων στερολών και του σκουαλένιου. Συμπεραίνεται ότι η εκχύλιση των στερολών και του σκουαλένιου παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με εκείνη του ελαίου καθώς τα μικρο-συστατικά αυτά έχουν ασθενή πολικότητα, και είναι εγγενώς δεσμευμένα σε δομές του ελαίου. Με βάση τα παραπάνω, η εκτίμηση της εξέλιξης της διεργασίας κρίνεται απαραίτητη και ιδιαίτερα σημαντική για τη

βιομηχανία, η οποία ενδιαφέρεται για τη γνώση των βέλτιστων συνθηκών παραλαβής ελαίου, που θα οδηγούν σε έλαιο ανώτερης ποιότητας καθώς θα είναι εμπλουτισμένο σε βιοδραστικά συστατικά.

Γενικότερα από την κινητική μελέτη προέκυψε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας (από τους 40 στους 60 °C) ευνοεί την εκχύλιση καθώς προκαλεί την αύξηση της διαλυτότητας του ελαίου ή/και των δευτερευόντων συστατικών στο εξάνιο, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και το ιξώδες τόσο του ελαίου/των δευτερευόντων συστατικών όσο και του εξανίου, ευνοώντας το ρυθμό μεταφοράς της μάζας. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι όσο μικρότερη ήταν η αναλογία στερεού/υγρού, τόσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα του ελαίου ή/και των δευτερευόντων συστατικών που εκχυλίζονται, διότι όταν ο όγκος του διαλύτη της εκχύλισης αυξάνεται, το φαινόμενο της διάχυσης είναι πιο αποτελεσματικό. Επιπλέον αποδείχτηκε ότι όσο υψηλότερη ήταν η ταχύτητα ανάδευσης, τόσο μεγαλύτερος ήταν ο ρυθμός της μεταφοράς της μάζας της διαλυτής ουσίας (έλαιο ή/και δευτερεύοντα συστατικά) καθώς ενισχύεται η διάχυσή της προς στο διάλυμα και τείνει να μειωθεί η αντίσταση του οριακού στρώματος.

Από τη μελέτη της εκχύλισης με χρήση συν-διαλύτη και συγκεκριμένα ισοπροπυλικής αλκοόλης και διαφόρων μιγμάτων εξανίου (H):ισοπροπανόλης (I) (H:I=3:1, H:I=3:2, H:I=4:1, H:I=9:1) έγινε φανερό ότι το μίγμα H:I=3:2, επιτυγχάνοντας να διεισδύσει εύκολα στις διπλοστοιβάδες της κυτταρικής μεμβράνης και να εκχυλίσει ένα ευρύτερο φάσμα συστατικών, όπως λιπαρά οξέα και στερόλες, εμφάνισε την υψηλότερη ανάκτηση ελαίου (13,70% ελαιοπυρήνα ξ.β.), και οδήγησε στην παραλαβή πυρηνέλαιου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ασαπωνοποίητο υλικό (USM%=4,92% ελαίου) καθώς και με υψηλή συγκέντρωση σε στερόλες και σκουαλένιο (σύνολο σε ολικές προσδιοριζόμενες στερόλες: 1,706 mg/g ελαίου, σκουαλένιο: 5,217 mg/g ελαίου). Με βάση τη συμπεριφορά του αυτή, προτείνεται η χρησιμοποίησή του σε διεργασίες εκχύλισης που απαιτείται αυξημένη παραλαβή ελαίου από ελαιούχους σπόρους, το οποίο θα είναι ενισχυμένο σε δευτερεύοντα συστατικά.

Στα πλαίσια της μελέτης της εκλεκτικής εκχύλισης ελαίου με σκοπό την εξοικονόμηση όγκου διαλυτών, χρόνου εκχύλισης και ταυτόχρονα τη μείωση της υποβάθμισης των βιοδραστικών συστατικών, εφαρμόστηκε η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (UAE) για την παραλαβή του πυρηνέλαιου αλλά και την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών του ασαπωνοποίητου υλικού του. Η UAE έχει προταθεί μεταξύ άλλων εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης λόγω πολλών πλεονεκτημάτων όπως η βελτιωμένη απόδοση και η μείωση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης αποφεύγοντας τη θερμική υποβάθμιση των εκχυλισμάτων. Μέσω πειραματικού σχεδιασμού (διαλύτης εξάνιο) με ταυτόχρονη εξέταση τριών παραγόντων (θερμοκρασία-T, αναλογία στερεού/υγρού-S:L, μέγεθος σωματιδίων του σπόρου-PS) βρέθηκε ότι οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων: T=60 °C, S:L=1:12 g/mL και PS=0,5 mm έδωσαν τη

μέγιστη απόδοση εκχύλισης σε έλαιο (11,22% ελαιοπυρήνα). Οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων: T=55 °C, S:L=1:12 g/mL και PS=0,5 mm έδωσαν τη μέγιστη συγκέντρωση του ασαπωνοποίητου υλικού (USM) % στο εκχυλιζόμενο έλαιο (USM=4,50% ελαίου). Η βέλτιστη τιμή του ολικού περιεχόμενου του ελαίου σε φαινολικά συστατικά (TPC) (TPC=0,261 mg GA/g ελαίου) προέκυψε με βέλτιστες τιμές των παραγόντων: T=50 °C, S:L=1: 8 g/mL και PS=0,9 mm, και η αντιοξειδωτική δράση (DPPH) του πυρηνέλαιου εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της (0,211 mg Trolox/g έλαιο) στις συνθήκες: T=55 °C, S:L=1:8 g/mL και PS=0,9 mm. Από τη μελέτη της αριστοποίησης της ανάκτησης των κυριότερων στερολών (β-σιτοστερόλης, καμπεστερόλης και στιγμαστερόλης) και του σκουαλένιου μέσω πειραματικού σχεδιασμού με ταυτόχρονη εξέταση δύο παραγόντων (θερμοκρασία και αναλογία στερεού/υγρού) βρέθηκε ότι η β-σιτοστερόλη εμφάνισε τη μέγιστη συγκέντρωσή της (1,399 mg/g) σε πυρηνέλαιο που προέκυψε με εφαρμογή: T=60 °C και S:L=1:12 g/mL, η καμπεστερόλη (0,220 mg/g) με εφαρμογή: T=55 °C και S:L=1:10 g/mL, η στιγμαστερόλη (0,105 mg /g) με εφαρμογή: T=50 °C και S:L=1:12 g/mL και το σκουαλένιο (4,575 mg/g) με εφαρμογή: T=60 °C και S:L=1:12 g/mL.

Από την εξέταση της χρήσης του μίγματος H:I=3:2 και της εφαρμογής των υπερήχων στις βέλτιστες συνθήκες προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα με χρήση εξάνιου και εφαρμογή των υπερήχων στις ίδιες συνθήκες ως προς τις αποκρίσεις: απόδοση ελαίου, ασαπωνοποίητο υλικό (USM%), TPC, αντιοξειδωτική δράση και επιμέρους στερόλες και σκουαλένιο του πυρηνέλαιου. Από τη σύγκριση των καλύτερων αποτελεσμάτων με UAE (διαλύτης: εξάνιο ή μίγμα H:I=3:2) με τα αντίστοιχα με συμβατική εκχύλιση Soxhlet (SE) (διαλύτης: εξάνιο και μίγμα H:I=3:2) όσον αφορά τις παραπάνω αποκρίσεις προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα (Πίνακας 57):

- Η εκχύλιση με υπέρηχους υπό τις βέλτιστες συνθήκες με διαλύτη είτε εξάνιο είτε το μίγμα H:I= 3:2 έδωσε υψηλότερη απόδοση εκχύλισης, και πυρηνέλαιο με περισσότερο ασαπωνοποίητο υλικό (USM%) και υψηλότερο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (0,255 mg GA/g ελαίου) και αντιοξειδωτική δράση από το αντίστοιχο με τη μέθοδο Soxhlet (SE) και διαλύτη εξάνιο. Παράλληλα, έφθασε περίπου το 82% της απόδοσης σε έλαιο και το 92% του συνολικού ασαπωνοποίητου υλικού των αντίστοιχων με τη μέθοδο SE και διαλύτη το μίγμα H:I=3:2. Αξίζει βέβαια να τονιστεί ότι η εκχύλιση με υπέρηχους έδωσε πυρηνέλαιο με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά (TPC) και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνο με τη μέθοδο SE και διαλύτη το μίγμα H:I=3:2. Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά, η μέθοδος εκχύλισης με υπέρηχους προτείνεται για κάθε εφαρμογή παραλαβής ελαίου από ελαιούχους σπόρους, όπου απαιτείται έλαιο εμπλουτισμένο σε βιοδραστικά συστατικά, όπως τα φαινολικά συστατικά χωρίς τη θερμική υποβάθμιση που είναι προφανές ότι

αυτές οι ενώσεις έχουν υποβαθμιστεί με τη μέθοδο Soxhlet (διαλύτη είτε εξάνιο είτε το μίγμα H:I=3:2) λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και του μεγάλου χρόνου εκχύλισης.

- Η εκχύλιση με υπέρηχους έδωσε πυρηνέλαιο με συγκέντρωση β-σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης μεγαλύτερη από αυτή που είχε το αντίστοιχο έλαιο με τη μέθοδο SE και χρήση εξανίου ή του μίγματος H:I=3:2. Η συγκέντρωση καμπεστερόλης στα εκχυλιζόμενα έλαια είτε με υπέρηχους είτε με τη μέθοδο SE και χρήση εξανίου ή του μίγματος H:I=3:2 βρέθηκε σε παρόμοια επίπεδα, ενώ το σκουαλένιο στα εκχυλιζόμενα έλαια βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε εκείνα που προέκυψαν με SE-H:I=3:2 και ακολούθως με UAE-εξάνιο≈UAE- H:I=3:2 και SE-εξάνιο. Η προτεινόμενη χρήση του μίγματος H:I=3:2 και εφαρμογή της μεθόδου Soxhlet είναι σε εφαρμογές παραλαβής είτε ελαίου εμπλουτισμένου με υψηλή συγκέντρωση σε σκουαλένιο είτε απομόνωσης του σκουαλένιου για περαιτέρω χρήση του σε συστήματα τροφίμων ή φαρμάκων. Γενικά, η εκχύλιση με υπέρηχους προτείνεται για κάθε εφαρμογή όπου απαιτείται εμπλουτισμός σε περιεχόμενες στερόλες.

Πίνακας 57. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που αφορούν την εκχύλιση ελαίου από τον ελαιοπυρήνα στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης

Μέθοδος εκχύλισης	Μετρήσεις	Διαλύτης	
		Εξάνιο	H:I = 3:2
CE	Απόδοση ελαίου (%)	9,80	13,70
	USM (%)	3,68	4,92
	β-Σιτοστερόλη	0,911	1,121
	Καμπεστερόλη	0,158	0,228
	Στιγμαστερόλη	0,091	0,101
	Σκουαλένιο	4,112	5,217
	TPC	0,207	0,241
	DPPH	0,189	0,205
UAE	Απόδοση ελαίου (%)	11,01	11,25
	USM (%)	4,41	4,42
	β-Σιτοστερόλη	1,649	1,358
	Καμπεστερόλη	0,202	0,209
	Στιγμαστερόλη	0,112	0,115
	Σκουαλένιο	4,474	4,594
	TPC	0,255	0,251
	DPPH	0,223	0,218

β-Σιτοστερόλη, Καμπεστερόλη, Στιγμαστερόλη, Σκουαλένιο= mg/g ελαίου

TPC= Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg GA/g ελαίου)

DPPH= Αντιοξειδωτική δράση (mg Trolox/g ελαίου)

Κατά τη διερεύνηση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα εξετάστηκαν εναλλακτικές μέθοδοι και νέοι διαλύτες εκχύλισης έναντι των συμβατικών μεθόδων/διαλυτών. Από τη μελέτη της συμβατικής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών, μέσω πειραματικού σχεδιασμού με ταυτόχρονη εξέταση δύο παραγόντων [είδος οργανικού διαλύτη - μεθανόλη, ακετόνη, αιθανόλη, συγκέντρωσή του σε νερό (% v/v)] βρέθηκε ότι η αιθανόλη σε αναλογία σε νερό 70% v/v έδωσε τις μέγιστες τιμές για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC=23,061 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), την αντιοξειδωτική δράση (DPPH=18,156 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), την ελευρωπαΐνη (OL), την υδροξυτυροσόλη (HY), τη ρουτίνη (RU) και το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (SUM) των εκχυλισμάτων (OL=0,834 mg/g ελαιοπυρήνα, HY=1,04 mg/g ελαιοπυρήνα, RU=0,493 mg/g ελαιοπυρήνα και SUM=2,41 mg/g ελαιοπυρήνα).

Από τη μελέτη της καινοτόμου εκχύλισης με υπέρηχους (UAE) για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα μέσω πειραματικού σχεδιασμού με ταυτόχρονη εξέταση τριών παραγόντων [είδος οργανικού διαλύτη, συγκέντρωσή του σε νερό (% v/v), θερμοκρασία] προέκυψε ότι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (TPC=21,77 mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.), η αντιοξειδωτική δράση (DPPH=20,95 g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH), η ελευρωπαΐνη (OL=0,674 mg/g ελαιοπυρήνα), η υδροξυτυροσόλη (HY=1,161 mg/g ελαιοπυρήνα) και το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων (SUM=2,32 mg/g ελαιοπυρήνα) εμφάνισαν τις μέγιστες τιμές τους με εφαρμογή: T=60 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%, ενώ η ρουτίνη (RU=0,421 mg/g ελαιοπυρήνα) με εφαρμογή: T=70 °C και διαλύτη αιθανόλη σε συγκέντρωση 70%. Με βάση τα αποτελέσματα τόσο της συμβατικής εκχύλισης όσο και μίας εναλλακτικής μεθόδου εκχύλισης, όπως είναι η εκχύλιση με υπέρηχους (UAE), προτείνεται η χρήση της αιθανόλης σε συγκέντρωση 70% v/v σε νερό, ως κύριος οργανικός διαλύτης εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα.

Η δυνατότητα παραλαβής φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα εξετάστηκε με τη μέθοδο της υδατικής εκχύλισης, της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης (μίγμα ενζύμων πηκτινάσης και πολυγαλακτουρονάσης) και της εκχύλισης με αιθανόλη 70% και με εφαρμογή νέων μεθόδων εκχύλισης, όπως με μικροκύματα (MAE), με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE), με υπερυψηλή υδροστατική πίεση (HHPAE) αλλά και με συμβατικό τρόπο (CE). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 58 και αφορούν τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν στις βέλτιστες συνθήκες για κάθε μέθοδο εκχύλισης, απ' όπου προέκυψαν και τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών με υπέρηχους (UAE) και διαλύτη αιθανόλη 70% v/v εμφάνισαν ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) που αντιστοιχεί στο 93% του αντίστοιχου που ελήφθη με τη μέθοδο CE, μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (κατά 13%) σε σχέση με εκείνη από τη CE, αλλά το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών ήταν παρόμοιο (κατά 98%) με το αντίστοιχο με τη συμβατική μέθοδο. Η χρήση υπέρηχων και αιθανόλης 70% v/v προτείνεται για την παραλαβή εκχυλισμάτων σχεδόν ισοδύναμων σε φαινολικά συστατικά με εκείνα της συμβατικής μεθόδου, τα οποία όμως λαμβάνονται σε μικρότερο χρόνο (30 min έναντι 4h). Επιπλέον, προτείνεται η χρήση ανάδευσης κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υπέρηχων προκειμένου να αυξηθεί η μεταφορά της μάζας και να ενισχυθεί η διάχυση των ενώσεων-στόχων. Η υδατική εκχύλιση με χρήση υπέρηχων παρουσίασε μικρότερο TPC και αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την αντίστοιχη εκχύλιση με συμβατικό τρόπο αλλά και με την εκχύλιση με υπέρηχους και αιθανόλη 70% v/v.

- Η χρήση αιθανόλης 70% και με εφαρμογή μικροκυμάτων (MAE) έδειξε ότι μπορεί να οδηγήσει σε παραλαβή εκχυλισμάτων με το μέγιστο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) σε σχέση με εκείνα που προέκυψαν με υδατική και υδατική ενζυμική εκχύλιση και χρήση MAE και μόλις κατά ~5% λιγότερο δραστικά από εκείνα με χρήση αιθανόλης 70% και συμβατική μέθοδο εκχύλισης, αντίστοιχα. Η υδατική ενζυμική εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (60 °C για 30 min) έδωσε εκχυλίσματα που περιέχουν περισσότερα φαινολικά συστατικά (κατά ~21%) και εμφανίζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (κατά ~9%) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης με CE (60 °C για 4 h). Η συγκέντρωση της OL ήταν σαφώς υψηλότερη στα εκχυλίσματα με αιθανόλη 70% και χρήση μικροκυμάτων (κατά ~83%) σε σύγκριση εκείνης της CE, ενώ στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με χρήση ενζύμου και MAE, η συγκέντρωση της OL κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε σύγκριση με την αντίστοιχη της CE. Γενικά, το σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με χρήση μικροκυμάτων ήταν μεγαλύτερο σε κάθε μέθοδο εκχύλισης που δοκιμάστηκε σε σχέση με εκείνο των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με συμβατική μέθοδο. Η αυξημένη απόδοση εκχύλισης στα επιμέρους φαινολικά συστατικά που παρατηρήθηκε οφείλεται στην αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα λόγω της εφαρμογής της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων που προκαλεί διάνοιξη στους φυτικούς ιστούς. Μία προτεινόμενη χρήση των μικροκυμάτων αποτελεί η παραλαβή εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα εμπλουτισμένων κυρίως σε ελευρωπαΐνη και με ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση σε μικρούς χρόνους εκχύλισης.
- Η χρήση αιθανόλης 70% και με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (HAE) έδωσε εκχυλίσματα με το μέγιστο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) (12% μεγαλύτερη της αντίστοιχης με CE) και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (5% πιο δραστικά από εκείνα με τη CE), επειδή κατά την HAE, η ισχυρή δύναμη διάτμησης που παράγεται από τον περιστρεφόμενο κόπτη του ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας λύει τα κυτταρικά τοιχώματα του ελαιοπυρήνα και προσφέρει τη μέγιστη μεταφορά μάζας και κατά συνέπεια και τη μέγιστη απόδοση σε φαινολικά συστατικά. Τα εκχυλίσματα της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (60 °C, 12000 rpm, 30 min) εμφάνισαν σαφώς υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά από όλες τις μεθόδους που δοκιμάστηκε η χρήση ενζύμων (~37% περισσότερο από την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη CE και 20% περισσότερο από την υδατική ενζυμική εκχύλιση με τη MAE). Οι συνθήκες για την ανάκτηση εκχυλισμάτων με τη μέγιστη

συγκέντρωση OL ήταν: αιθανόλη 70%, T=60 °C και AS=12000 rpm (~86% περισσότερο σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα η χρήση της εκχύλισης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας προτείνεται για την παραλαβή εκχυλισμάτων φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα, τα οποία έχουν τη μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με όλες τις νέες μεθόδους που εξετάστηκαν και λαμβάνονται σε ελάχιστο χρόνο εκχύλισης (30 min).

- Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από το συνδυασμό της χρήσης αιθανόλης 70% και της υδατικής ενζυμικής εκχύλισης με τη μη θερμική τεχνολογία της υψηλής υδροστατικής πίεσης (HHPAE) εμφάνισαν το μέγιστο περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) σε σχέση με την υδατική εκχύλιση με χρήση HHP. Σε συνθήκες: 600 MPa και 10 min, τα αιθανολικά εκχυλίσματα είχαν το ~71% του αντίστοιχου ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών και περιείχαν συγκέντρωση OL κατά ~84% περισσότερο από αυτή που είχαν τα εκχυλίσματα με CE, διότι κατά τη διαδικασία της HHP η πίεση μεταφέρεται στο σύνολο του υλικού ομοιόμορφα και άμεσα διασπώντας τους υδρόφοβους δεσμούς στις κυτταρικές μεμβράνες και επιτυγχάνοντας έτσι υψηλές αποδόσεις εκχύλισης των επιμέρους φαινολικών ενώσεων. Εφαρμόζοντας HHPAE, η χρήση ενζύμου έδωσε εκχυλίσματα κατά ~23% περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα με τη CE και πιο δραστικά από αυτά με την υδατική εκχύλιση και την εκχύλιση με αιθανόλη 70% με χρήση HHP. Συνολικά, η εφαρμογή της υψηλής υδροστατικής πίεσης που συνδυάζει χαμηλή θερμοκρασία (25 °C) και πολύ μικρό χρόνο (10 min) και προτείνεται για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα έναντι της συμβατικής μεθόδου έχοντας δώσει τις τρίτες κατά σειρά καλύτερες τιμές μετά την HAE και τη MAE.

Από τη μελέτη της χρήση ενζύμου ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκχύλισης που εξετάστηκε (συμβατική εκχύλιση, εκχύλιση με μικροκύματα, ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας ή υπερυψηλή υδροστατική πίεση) προέκυψε ότι τα εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με εκείνα από την υδατική εκχύλιση με τις μεθόδους αυτές, εξαιτίας της υδρόλυσης και αποδόμησης των συστατικών κυτταρικού τοιχώματος που λαμβάνει χώρα, διευκολύνοντας έτσι την απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, ο συνδυασμός της χρήσης ενζύμου και των παραπάνω μεθόδων εκχύλισης συνέβαλε σε εκχυλίσματα με πιο εμπλουτισμένα φαινολικά προφίλ και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με την υδατική εκχύλιση. Για όλα τα παραπάνω, η χρήση ενζύμου προτείνεται για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα έναντι της υδατικής εκχύλισης και, σε ορισμένες

περιπτώσεις που συζητήθηκαν προηγουμένως, προκύπτουν εκχυλίσματα που έχουν ισοδύναμες συγκεντρώσεις σε ορισμένα επιμέρους φαινολικά συστατικά, όπως σε υδροξυτυροσόλη, ρουτίνη, με τα αιθανολικά εκχυλίσματα.

Η δυνατότητα ανάκτησης φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα εξετάστηκε με την πρωτοποριακή χρήση των ευτηκτικών διαλυτών [NADES - μίγμα χλωριούχου χολίνης με μαλτόζη (DES-MA), γλυκερόλη (DES-GLY), κιτρικό οξύ (DES-CA) και γαλακτικό οξύ (DES-LA)] σε συνδυασμό με τις εναλλακτικές καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης, όπως χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας - HAE, μικροκυμάτων - MAE, υπερήχων - UAE και υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης - HHPAE (Πίνακας 59). Εφαρμόζοντας HAE (60 °C, 12000 rpm) και UAE (60 °C), τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με το διαλύτη DES-CA είχαν την καλύτερη απόδοση εκχύλισης όσον αφορά το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH). Εφαρμόζοντας την MAE (60 °C) και την HHPAE (600MPa για 10 min), ο διαλύτης DES-LA έδειξε την καλύτερη απόδοση εκχύλισης ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά (TPC) και την αντιοξειδωτική δράση (DPPH) των εκχυλισμάτων. Επειδή τα φαινολικά συστατικά είναι πολικά μόρια, οι ευτηκτικοί διαλύτες με βάση το οργανικό οξύ (DES-CA, DES-LA) ως πιο πολικοί διαλύτες παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα δίνοντας τις μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης τους σε σχέση με τους άλλους λιγότερο πολικούς ευτηκτικούς διαλύτες (DES-MA, DES-GLY). Συνολικά, τα εκχυλίσματα με εφαρμογή HAE έδειξαν τη μέγιστη απόδοση φαινολικών συστατικών, την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και την υψηλότερη συγκέντρωση σε ελευρωπαΐνη, ρουτίνη καθώς και στο σύνολο των προσδιοριζόμενων φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με τις MAE, UAE και HHPAE, διότι ο κύριος μηχανισμός της HAE, κonioποίηση με ισχυρή μηχανική διατμητική δύναμη και ανάμιξη του στερεού με το διαλύτη, προσφέρει τη μέγιστη μεταφορά μάζας μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη σε σύγκριση με τις άλλες συμβατικές και καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα με ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) με όλες τις μεθόδους που εξετάστηκαν ήταν περισσότερο εμπλουτισμένα σε φαινολικές ενώσεις από εκείνα με τους συμβατικούς διαλύτες (αιθανόλη 70%, υδατική εκχύλιση). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι NADES προτείνεται να χρησιμοποιηθούν ως πράσινοι διαλύτες για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα και ο συνδυασμός τους με νέες καινοτόμες μεθόδους όπως οι HAE, MAE, UAE και HHPAE αποδείχτηκε ότι προσφέρει πολύ υψηλές αποδόσεις εκχύλισης σε σημαντικά μειωμένο χρόνο έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης και διαλυτών.

Πίνακας 58. Συγκενρωτικά αποτελέσματα που αφορούν τα εκχύλιματα που λαμβάνονται στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης

Μέθοδος εκχύλισης	Αναλύσεις	Υδατική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5)	Υδατική ενζυμική εκχύλιση (Ρυθμιστικό δ/μα pH=4,5 + ένζυμο 1% v/v)	Αιθανόλη 70%
CE	TPC	9,92	11,41	23,88
	DPPH	24,74	22,23	18,36
	OL	0,416	0,446	0,868
	Σύνολο	1,425	1,796	2,478
UAE	TPC	10,71	-	21,45
	DPPH	30,35	-	20,78
	OL	0,110	-	0,680
	Σύνολο	0,497	-	2,320
MAE	TPC	10,61	14,37	16,87
	DPPH	24,41	20,23	19,38
	OL	0,319	0,549	5,328
	Σύνολο	1,975	2,465	7,040
HAE	TPC	12,95	18,38	26,37
	DPPH	24,16	21,58	17,62
	OL	0,460	0,590	6,340
	Σύνολο	0,840	1,310	7,420
HHPAE	TPC	9,25	14,84	16,52
	DPPH	35,21	20,32	26,85
	OL	0,190	0,790	4,420
	Σύνολο	0,680	1,460	5,130

CE: Συμβατική εκχύλιση

UAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους

MAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

HAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας

HHPAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερυψηλή υδροστατική πίεση

TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

DPPH: Αντιοξειδωτική δράση (g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH)

OL: Ελευρωπαΐνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

Σύνολο: Σύνολο προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

Πίνακας 59. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται στις βέλτιστες συνθήκες ανά μέθοδο εκχύλισης με ευτηκτικούς διαλύτες.

Μέθοδος εκχύλισης	Αναλύσεις	DES-CA	DES-MA	DES-LA	DES-GLY
HAE	TPC	34,08	23,42	28,83	27,92
	DPPH	5,11	20,26	5,58	14,71
	OL	12,86	7,16	12,24	12,05
	Σύνολο	18,3	14,66	15,52	14,70
MAE	TPC	15,76	10,06	29,57	19,14
	DPPH	19,85	26,97	17,51	23,79
	OL	5,36	5,00	7,56	7,52
	Σύνολο	6,51	5,87	9,49	9,21
UAE	TPC	20,14	8,40	15,32	14,79
	DPPH	20,69	26,07	21,83	22,83
	OL	0,85	0,49	0,78	0,77
	Σύνολο	2,51	2,17	2,20	2,18
HHPAE	TPC	14,91	20,58	25,96	12,70
	DPPH	22,43	18,56	15,67	30,12
	OL	0,62	0,94	1,94	0,39
	Σύνολο	1,99	3,63	5,31	1,60

UAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους

MAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

HAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας

HHPAE: Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερυψηλή υδροστατική πίεση

TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών (mg GA/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

DPPH: Αντιοξειδωτική δράση (g ελαιοπυρήνα ξ.β./g DPPH)

OL: Ελευρωπαΐνη (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

Σύνολο: Σύνολο προσδιοριζόμενων φαινολικών συστατικών (mg/g ελαιοπυρήνα ξ.β.)

Όσον αφορά τη δυνατότητα εφαρμογής των εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών σε συστήματα τροφίμων, προέκυψε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα και τα κλάσματά του (κλάσμα εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα, και νερού) κρίθηκαν αποτελεσματικά στην προστασία των συστημάτων που ενσωματώθηκαν (σε πρότυπο ακόρεστο λιπαρό οξύ όπως το λινελαϊκό οξύ ή και σε φυτικό έλαιο όπως το ηλιέλαιο) έναντι της οξείδωσής τους. Με βάση τη συμπεριφορά τους αυτή, προτείνεται η χρήση των εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα για την ανάπτυξη

λειτουργικών τροφίμων που προωθούν την υγεία. Ωστόσο, περαιτέρω in vivo μελέτες χρειάζονται σε αυτά τα εκχυλίσματα ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

Από την εφαρμογή της ενσωμάτωσης των φαινολικών συστατικών του ελαιοπυρήνα ως έχουν ή και προστατευμένα σε εγκλεισμένη μορφή σε γαλακτώματα με βάση το ελαιόλαδο (εμπλουτισμένο ελαιόλαδο), προέκυψε ότι επιτυγχάνεται η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και της οξειδωτικής σταθερότητας των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων (ο αριθμός υπεροξειδίων, ο αριθμός ανισιδίνης και οι συντελεστές απορρόφησης K232 και K270 των εμπλουτισμένων ελαιόλαδων ήταν μικρότεροι από αυτούς του αρχικού ελαιόλαδου κατά την αποθήκευση στους 80 °C για 15 ημέρες). Γενικότερα, τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα με εκχυλίσματα ελαιοπυρήνα σε εγκλεισμένη μορφή έδειξαν τη μικρότερη μεταβολή στις τιμές του ολικού περιεχόμενου φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής δράσης στο τέλος της αποθήκευσής τους. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα του ελαιοπυρήνα προτείνεται να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι ενισχύουν την οξειδωτική σταθερότητα των τελικών προϊόντων.

4.2 Προτάσεις

Από τη μελέτη επομένως διαφαίνεται ότι υπάρχουν ενδιαφέρουσες εναλλακτικές προοπτικές στη συμβατική εκχύλιση για την αξιοποίηση του ελαιοπυρήνα. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα οδηγούν σε νέα ερευνητικά μονοπάτια, όπως:

Μελέτη της εκχύλισης για την παραλαβή τόσο πυρηνέλαιου όσο και φαινολικών συστατικών από τον ελαιοπυρήνα με άλλες καινοτόμες μεθόδους εκχύλισης όπως με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, με χρήση υγρών διαλυτών υπό πίεση, με υπερκρίσιμα ρευστά κ.α. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης που εξετάζεται για την ανάκτηση της μέγιστης απόδοσης ελαίου και μικρο-συστατικών από ελαιοπυρήνα και άλλους ελαιούχους σπόρους.

Εύρεση των κινητικών μοντέλων για την εκχύλιση ελαίου και βιοδραστικών συστατικών από άλλους ελαιούχους σπόρους ή παραπροϊόντα τροφίμων που περιέχουν λιπαρά. Η γνώση της εξέλιξης της διεργασίας της εκχύλισης των δευτερευόντων συστατικών είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα βιο-διυλιστήρια και γενικότερα για τη βιομηχανία τροφίμων, ώστε το τελικό προϊόν (έλαιο) που θα προκύπτει υπό τις βέλτιστες συνθήκες να είναι εμπλουτισμένο σε βιοδραστικά συστατικά.

Μελέτη της ανάκτησης φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα και από άλλους ελαιούχους σπόρους με χρήση διαφορετικών ενζύμων, όπως κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πρωτεάσες ή ακόμη και μίγματα αυτών.

Μελέτη δειγμάτων ελαιοπυρήνα τα οποία θα έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και σε διαφορετικές περιόδους συγκομιδής, ώστε να εξεταστεί και η επίδραση αυτών των παραμέτρων στην ανάκτηση είτε ελαίου με τη μέγιστη συγκέντρωση σε βιοδραστικά συστατικά (στερόλες, σκουαλένιο) είτε φαινολικών συστατικών απευθείας από τον ελαιοπυρήνα.

Εξέταση της επίδρασης της μεθόδου ξήρανσης της πρώτης ύλης πριν την εκχύλιση, όπως ξήρανση με μικροκύματα, με λυοφιλίωση κ.α., στην απόδοση και εκλεκτικότητα των μεθόδων εκχύλισης.

Μελέτη της ανάκτησης των φαινολικών ενώσεων με διαφορετικούς ευτηκτικούς διαλύτες καθώς και μελέτη της ανκύκλωσης, της βιοαποικοδόμησης και της ενδεχόμενης τοξικότητας των ευτηκτικών διαλυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός της ενζυμικής προκατεργασίας και της χρήσης ευτηκτικών διαλυτών με εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από τον ελαιοπυρήνα και άλλους ελαιούχους σπόρους, με σκοπό τη μεγιστοποίηση της απόδοσης ανάκτησης φαινολικών συστατικών.

Σχεδιασμός και εφαρμογή των εκχυλίσεων με τις νέες καινοτόμες μεθόδους που εξετάστηκαν σε πιλοτική κλίμακα, καθώς όπως αποδείχτηκε προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων της μέγιστης απόδοσης, του μειωμένου χρόνου και όγκου διαλυτών και της μεγαλύτερης ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών-στόχων.

Τεχνικοοικονομική μελέτη πιλοτικής μονάδας επεξεργασίας, ικανής να χειριστεί μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων, ώστε να παράγει σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη της οικονομικής βιωσιμότητας με βάση τόσο το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των γραμμών παραγωγής όσο και την ποιότητα των τελικών ελαίων ή εκχυλισμάτων.

Βιβλιογραφία

- Abdulkarim, S., Lai, O., Muhammad, S., & Long, H. (2006). Use Of enzymes to enhance oil recovery during aqueous extraction of *Moringa Oleifera* seed oil. *Journal of Food Lipids*, *13*, 113–130.
- Ade-Omowaye, B., Angersbach, A., Taiwo, K., & Knorr, D. (2001). Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science & Technology*, *12*(8), 285–295. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00095-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00095-4)
- Adil, İ., Çetin, H., Yener, M., & Bayındırlı, A. (2007). Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, *43*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2007.04.012>
- Adil, I., Yener, E., & Bayindirli, A. (2008). Extraction of total phenolics of sour cherry pomace by high pressure solvent and subcritical fluid and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Separation Science and Technology*, *43*(5), 1091–1110.
- Aguilera, M. (2003). Solid–liquid extraction. In C. Tzia & G. Liadakis (Eds.), *Extraction optimization in food engineering* (pp. 35–55). New York: Marcel Dekker.
- Ahmad-qasem, M., Hussam, Barrajon-catalan, E., Vicente, M., Cárcel, J., & Garcia-perez, J. (2013). Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace. *Journal of Food Engineering*, *119*(3), 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.027>
- Ahmed, J., & Ramaswamy, H. (2006). High pressure processing of fruit and vegetables. *Stewart Postharvest Review*, *1*, 1–10.
- Akgun, N. A., & Doymaz, I. (2005). Modelling of olive cake thin-layer drying process. *Journal of Food Engineering*, *68*(4), 455–461. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.06.023>
- Akhmazillah, M. F. N., Farid, M. M., & Silva, F. V. M. (2013). High pressure processing (HPP) of honey for the improvement of nutritional value. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *20*, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.06.012>
- Alañón, M., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2018). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2018.01.003>

- Albuquerque, J., González, J., García, D., & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, *91*(2), 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00177-9)
- Alexandre, E., Silva, S., Santos, S., Silvestre, A., Duarte, M., & Saraiva, J. (2018). Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: Sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. *Food Research International*, *34*, 581–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>
- Al-Harashseh, M., & Kingman, S. (2004). Microwave-assisted leaching—a review. *Hydrometallurgy*, *73*(3-4), 189–203. <https://doi.org/10.1016/J.HYDROMET.2003.10.006>
- Aludatt, M., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-tawaha, A., & Rababah, T. (2010). Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry*, *123*(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.011>
- Amarante, R., Oliveira, P., Schwantes, F., & Morón-Villarreyes, H. (2014). Oil Extraction from Castor Cake Using Ethanol: Kinetics and Thermodynamics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *53*, 6824–6829.
- Amarni, F., & Kadi, H. (2010). Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane Comparison with the conventional extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *11*(2), 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.002>
- Amin, S. K., Hawash, S., Diwani, G. El, & Rafei, S. El. (2010). Kinetics and thermodynamics of oil extraction from jatropha curcas in aqueous acidic hexane solutions. *Chemical Engineering*, *6*(11), 293–300.
- Antonopoulos, K., Valet, N., Spiratos, D., & Siragakis, G. (2006). Olive oil and pomace olive oil processing, *57*(1), 56–67.
- Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 614–627.
- Aragon, J., & Palancar, M. (2001). *Improlive 2000. Present and future of Alpeorujo* (Editorial). Madrid.
- Arjona, R., Ollero, P., & Vidal, B. (2005). Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering*, *68*, 239–247.

- Azadmard-Damirchi, S., Alirezalu, K., & Achachlouei Fathi, B. (2011). Microwave pretreatment of seeds to extract high quality vegetable oil. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5(9), 72–75.
- Azlan, A., Prasad, K. N., Khoo, H., Abdul-aziz, N., Mohamad, A., Ismail, A., & Amom, Z. (2010) Comparison of fatty acids , vitamin E and physicochemical properties of *Canarium odontophyllum* Miq. (dabai), olive and palm oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(8), 772–776. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.026>
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.01.014>
- Baby, K., & Ranganathan, T. (2016). Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton.*) volatile oil. *Industrial Crops and Products*, 89, 200–206. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.05.017>
- Bagheri, H., Yamini, Y., Safari, M., Asiabi, H., Karimi, M., & Heydari, A. (2016). Simultaneous determination of pyrethroids residues in fruit and vegetable samples via supercritical fluid extraction coupled with magnetic solid phase extraction followed by HPLC-UV. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 571–580. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.07.017>
- Bagherian, H., Ashtiani, F., Fouladitajar, A., & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 50, 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.08.002>
- Bajer, T., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., & Ventura, K. (2015). Central composite design of pressurised hot water extraction process for extracting capsaicinoids from chili peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2014.12.008>
- Bajerová, P., Adam, M., Bajer, T., & Ventura, K. (2014). Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. *Journal of Separation Science*, 37, 835–844.
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research*

on Medicinal and Aromatic Plants, 3, 120–127.

- Balasubramanian, R., Yen Doan, T., & Obbard, J. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 215-216, 929–936. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2012.11.063>
- Barbosa-Canovas, GV Pothakamury, U., Palou, E., & Swanson, B. (1998). *Nonthermal Preservation of Foods*. New York: Marcel Dekker.
- Bäumler, E., Carelli, A., Crapiste, G., & Carrín, M. (2011). Solvent extraction modeling of vegetable oil and its minor compounds. *Journal of Food Engineering*, 107, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.025>
- Beltran, G., Bucheli, M., Aguilera, M., Belaj, A., & Jimenez, A. (2016). Squalene in virgin olive oil : Screening of variability in olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1–4. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500295>
- Bi, W., Tian, M., & Ho, K. (2013). Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, 1285, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>
- Bilgin, M., Sahin, S., Dramur, M. U., & Sevgili, L. M. (2013). Obtaining scarlet sage (*Salvia coccinea*) extract through homogenizer-and ultrasound-assisted extraction methods. *Chemical Engineering Communications*, 200(9), 1197–1209.
- Birch, E. J., & Zealand, N. (2000). Extraction by Solvent Based Methods, 2794–2801.
- Blekas, G., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2006). Olive Oil Composition. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil* (pp. 41–72). AOCS Press. <https://doi.org/10.1201/9781439832028.pt2>
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., ... Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2016.12.005>
- Boskou, D. (2009). Other important minor constituents. In D. Boskou (Ed.), *Olive oil: Minor constituents and health* (pp. 45–54). CRC Press.
- Boskou, D. (2011). Olive oil. In F. D. Gunstone (Ed.), *Vegetable oils in food technology. Composition, properties and uses* (pp. 243–269). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Brahmi, F., Khodir, M., Farid, D., Rahmani, T., Bousbaa, K., Oukmanou, S., & Chibane, M. (2012). Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from

- algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications*, 2(4), 72–86.
<https://doi.org/10.5530/pc.2012.4.1>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Briars, R., & Paniwnyk, L. (2013). Effect of ultrasound on the extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*, 42, 595–600.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.06.043>
- Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuna, C., & Fabiola, F. (2015). High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT-Food Science and Technology Journal*, 60, 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.057>
- Bubalo, M., Toma, M., Kovac, K., Bubalo, M., & Natka, C. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 156–166.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.10.027>
- Bullo, M., & Rosa Salas-Salvado, J. L.-R. (2011). Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1797–1810.
- Bullon, P., Quiles, J., Morillo, J., Rubini, C., Goteri, G., Granados-Principal, S., ... Ramirez-Tortosa, M. (2009). Gingival vascular damage in atherosclerotic rabbits: Hydroxytyrosol and squalene benefits. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2327–2331.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2009.06.026>
- Cacace, J., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389.
[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Capellini, M., Giacomini, V., Cuevas, M., & Rodrigues, C. (2017). Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. *Industrial Crops and Products*, 104, 133–143.

<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.04.017>

- Caputo, A. C., Scacchia, F., & Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry : waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, *23*, 197–214.
- Cavalcanti, R., Albuquerque, C., & Meireles, M. (2016). Supercritical CO₂ extraction of cupuassu butter from defatted seed residue: Experimental data, mathematical modeling and cost of manufacturing. *Food and Bioproducts Processing*, *97*, 48–62. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2015.10.004>
- Chan, C., Yusoff, R., & Ngoh, G. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, *92*(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2013.10.001>
- Chan, C., Yusoff, R., Ngoh, G., & Kung, F. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, *1218*(37), 6213–6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
- Chanioti, S., Liadakis, G., & Tzia, C. (2014). Solid-Liquid Extraction. In T. Varzakas & C. Tzia (Eds.), *Food engineering handbook* (pp. 253–286). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Chanioti, S., Siamandoura, P., & Tzia, C. (2016). Evaluation of extracts prepared from olive oil by-products using microwave-assisted enzymatic extraction: Effect of encapsulation on the stability of final products. *Waste and Biomass Valorization*, *7*(4). <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9533-1>
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *79*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.029>
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2019). Evaluation of ultrasound assisted and conventional methods for production of olive pomace oil enriched in sterols and squalene. *LWT*, *99*, 209–216. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.09.068>
- Charan, S., Bavisetty, B., & Narayan, B. (2015). An improved RP-HPLC method for simultaneous analyses of squalene and cholesterol especially in aquatic foods. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 6083–6089. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1793-4>
- Chemat, F., Vian, M., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*, 8615–8627.

- Chen, M., & Bergman, C. (2005). A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*(2-3), 139–151. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2003.09.004>
- Chen, R., Meng, F., Zhang, S., & Liu, Z. (2009). Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng. *Separation and Purification Technology*, *66*(2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2008.12.026>
- Cheng, Z., Song, H., Yang, Y., Liu, Y., Liu, Z., Hu, H., & Zhang, Y. (2015). Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *International Journal of Biological Macromolecules*, *76*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.01.048>
- Chien, J., Hoff, J., Lee, M., Lin, H., Chen, Y., & Chen, L. (1990). Oil extraction of dried ground corn with ethanol. *The Chemical Engineering Journal*, *43*(3), B103–B113. [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(90\)80017-7](https://doi.org/10.1016/0300-9467(90)80017-7)
- Chranioti, C., Chanioti, S., & Tzia, C. (2016). Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant) - Evaluation of the final products. *Food Chemistry*, *190*, 1151–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.083>
- Chung, H., Ji, H., Canning, C., Sun, S., & Zhou, K. (2010). Comparison of Different Strategies for Soybean Antioxidant Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4508–4512.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., & Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(3), 218–236. <https://doi.org/10.1080/10408390701856223>
- Çiğeroğlu, Z., Aras, Ö., Pinto, C., Bayramoğlu, M., Kırbaşlar, Ş., Lorenzo, J., ... Şahin, S. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) leaves via D-optimal design and artificial neural network design with categorical and quantitative variables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(12), 4584–4596.
- Cioffi, G., Sabina, M., Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., & Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, *121*(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.013>

- Conte, R., Gullich, L., Bilibio, D., Zanella, O., Bender, J., Carniel, N., & Priamo, W. (2016). Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, *213*, 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.111>
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.06.002>
- Coulson, J., Richardson, F., Backhurst, J., & Harker, J. (1993). Leaching. In *Chemical Engineering* (pp. 391–407). Pergamon press.
- Couper, J., Penney, W., Fair, J., & Walas, S. (2012). Extraction and Leaching. In *Chemical Process Equipment*. (pp. 487–528). BH Elsevier.
- Cui, Q., Peng, X., Yao, X., Wei, Z., Luo, M., Wang, W., ... Zu, Y. (2015). Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Separation and Purification Technology*, *150*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2015.06.026>
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, *194*, 135–142. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.08.008>
- Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, *200*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.01.040>
- Czaplicki, S., Ogrodowska, D., Derewiaka, D., Tańska, M., & Zadernowski, R. (2011). Bioactive compounds in unsaponifiable fraction of oils from unconventional sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*(12), 1456–1464. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000410>
- Dagostin, J., Carpiné, D., & Corazza, M. (2015). Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics. *Industrial Crops and Products*, *74*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.04.054>
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., & Spigno, G. (2013). Valorization of

- Citrus limon residues for the recovery of antioxidants : Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops & Products*, 50, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.013>
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>
- Dai, Y., Spronsen, J., & Witkamp, G. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Das, A., Sharma, M., Mondal, D., & Prasad, K. (2016). Deep eutectic solvents as efficient solvent system for the extraction of κ -carrageenan from *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Polymers*, 136, 930–935. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.09.114>
- De la Puerta, R., Marquez-Martin, A., Fernandez-Arche, A., & Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*, 25(5), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.10.010>
- de Moura, J., Maurer, D., Yao, L., Wang, T., Jung, S., & Johnson, L. (2016). Characteristics of Oil and Skim in Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 1079–1088.
- Delgado-Adámez, J., Baltasar, M. N., Concepción, M., Yuste, A., & Martín-Vertedor, D. (2014). Oxidative stability , phenolic compounds and antioxidant potential of a virgin olive oil enriched with natural bioactive compounds. *Journal of Oleo Science*, 65(1), 55–65.
- Delsart, C., Cholet, C., Ghidossi, R., Grimi, N., Gontier, E., Gény, L., ... Mietton-Peuchot, M. (2014). Effects of pulsed electric fields on cabernet sauvignon grape berries and on the characteristics of wines. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 424–436.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes : Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532–1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- Destandau, E., Michel, T., & Elfakir, C. (2013). Microwave-Assisted Extraction. In M. Rostagno, J. Prado, & G. Kraus (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications* (pp. 113–130). Royal Society of Chemistry.

- Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 587–601.
- Dias, A., Arroio Sergio, C., Santos, P., Barbero, G., Rezende, C., & Martínez, J. (2016). Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 284–294. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.01.013>
- Dibert, K., Cros, E., & Andrieu, J. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, *10*(3), 199–214. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(89\)90026-5](https://doi.org/10.1016/0260-8774(89)90026-5)
- Diphare, M., & Muzenda, E. (2014). The Effect of Extraction Conditions on Oil Yield from Waste Lubricating Grease. *International Journal of Research in Chemical, Metallurgical and Civil Engineering (IJRCMCE)*, *1*(1), 75–78.
- Dunford, N., Irmak, S., & Jonnala, R. (2010). Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran. *Food Chemistry*, *119*(3), 1246–1249. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.039>
- Erbay, Z., & Icier, F. (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *91*(4), 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.004>
- Espínola-Lozano, F. (2003). Technological change in the extraction of olive pomace oils. *Alimentación Equipos Y Tecnología*, *22*, 60–64.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2010.08.003>
- Farag, R. S., Mahmoud, E. A., & Basuny, A. M. (2007). Original article Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology*, *42*, 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01374.x>
- Farhoosh, R., Tavassoli-kafrani, M., & Hossein Sharif, A. (2011). Antioxidant activity of sesame , rice bran and bene hull oils and their unsaponifiable matters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *113*, 506–512. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000402>
- Federici, F., Fava, F., Kalogerakis, N., & Mantzavinos, D. (2009). Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *84*, 895–900.

- Fennell, C. W., Light, M. E., Sparg, S. G., Stafford, G. I., & Van Staden, J. (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of Ethnopharmacology*, *95*(2-3), 113–121. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.05.025>
- Fernández, M., Perez, E., Crapiste, G., & Nolasco, S. (2012). Kinetic study of canola oil and tocopherol extraction. Parameter comparison of nonlinear models. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, *111*, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.036>
- Fernández-Arche, A., Marquez-Martín, A., de la Puerta Vazquez, R., Perona, J., Terencio, C., Perez-Camino, C., & Ruiz-Gutierrez, V. (2008). Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *20*, 155–162.
- Fernández-bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., & Jiménez, A. (2006). Potential use of olive by-products. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas Y Aceites*, *57*(1), 95–106.
- Firestone, D. (2001). Wiley Award: Address Assuring the Integrity of Olive Oil Products. *Journal of AOAC International*, *84*, 176–180.
- Freire, F., Figueiredo, A., & Ferrão, P. (2001). PH—Postharvest Technology: Modelling high temperature, thin layer, drying kinetics of olive bagasse. *Journal of Agricultural Engineering Research*, *78*(4), 397–406. <https://doi.org/10.1006/JAER.2000.0657>
- Fu, X., Ma, N., Sun, W., & Dang, Y. (2018). Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta L.*) flower. *Industrial Crops and Products*, *123*, 296–302. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.087>
- Fu, Y., Liu, W., Zu, Y., Tong, M., Li, S., Yan, M., ... Luo, H. (2008). Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanuscajan (L.) Millsp.*] leaves. *Food Chemistry*, *111*(2), 508–512. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.04.003>
- Gai, Q., Jiao, J., Mu, P., Wang, W., Luo, M., Li, C., ... Fu, Y. (2013). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *45*, 303–311. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.12.050>
- Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2010). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, *15*, 6365–6374.

- Gan, C., & Latiff, A. (2011). Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*Garcinia mangostana*) rind: Optimization using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.025>
- García, A., Brenes, M., José Moyano, M., Alba, J., García, P., & Garrido, A. (2001). Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation. *Journal of Food Engineering*, 48(3), 189–194. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00157-6)
- García, A., Rodríguez-juan, E., Rodríguez-gutiérrez, G., Rios, J., & Fernández-bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS). *Food Chemistry*, 197, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
- García, A., Ruiz-Méndez, M. V, Romero, C., & Brenes, M. (2006). Effect of refining on the phenolic composition of crude olive oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(2), 159–164. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1189-8>
- Garcia-Mendoza, M., Paula, J., Paviani, L., Cabral, F., & Martinez-Correa, H. (2015). Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.01.026>
- Garzón, G., & Wrolstad, R. (2009). Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*, 114, 44–49.
- Ghafoor, K., Choi, Y., Jeon, J., & Jo, I. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K., & Gilani, A. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea L.*)— A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
- Gögüs, F., & Maskan, M. (2001). Drying of olive pomace by a combined microwave-fan assisted convection oven. *Food / Nahrung*, 45, 149–152.
- Gögüs, F., & Maskan, M. (2006). Air drying characteristics of solid waste (pomace) of olive oil processing. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 378–382. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.12.018>
- Gomes, T., & Caponio, F. (1997). Evaluation of the state of oxidation of crude olive-pomace

- oils. Influence of olive-pomace drying and oil extraction with solvent, *8561*(96), 1381–1384.
- Goula, A. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil - Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>
- Grigonis, D., Venskutonis, P., Sivik, B., Sandahl, M., & Eskilsson, C. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, *33*(3), 223–233. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2004.08.006>
- Grijó, D., Piva, G., Osorio, I., & Cardozo-Filho, L. (2019). Hemp (*Cannabis sativa L.*) seed oil extraction with pressurized n-propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, *143*, 268–274. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2018.09.004>
- Gu, Q., Yi, X., Shen, J., Shi, J., Liu, Y., & Shao, J. (2016). A highly automated method for simultaneous determination of sterols, erythrodiol and uvaol in olive oils. *Analytical Methods*, *8*(20), 4022–4027.
- Güçlü-Üstündag, O., & Temelli, F. (2005). Solubility behavior of ternary systems of lipids , cosolvents and supercritical. *Journal of Supercritical Fluids*, *36*, 1–15.
- Guderjan, M., Töpfl, S., Angersbach, A., & Knorr, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, *67*(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.04.029>
- Guedes, A., Gião, M., Matias, A., Nunes, A., Pintado, M., Duarte, C., & Malcata, X. (2013). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *Journal of Food Engineering*, *116*(2), 478–482. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.12.015>
- Guerrero, M., Torres, J., & Nuñez, M. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*, *99*(5), 1311–1318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.009>
- Guillén, N., Acín, S., Navarro, M., Perona, J., Arbonés-Mainar, J., Arnal, C., ... Osada, J. (2008). Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis*, *197*(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2007.08.008>
- Guo, X., Zhao, W., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, X. (2017). Extraction of pectin from the

- peels of pomelo by high-speed shearing homogenization and its characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 640–646. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.12.001>
- Hadj-Taieb, N., Grati, N., Ayadi, M., Attia, I., & Bensalem, H. (2012). Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation. *Biochemical Engineering Journal*, 62, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.04.003>
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2008.01.028>
- Hashemi, S., Michiels, J., Asadi Yousefabad, S., & Hosseini, M. (2015). Kolkhoung (*Pistacia khinjuk*) kernel oil quality is affected by different parameters in pulsed ultrasound-assisted solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 70, 28–33. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.023>
- Hayat, K., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, S., Xia, S., Jia, C., ... Zhang, J. (2010). Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry*, 123(2), 423–429. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.04.060>
- Hu, B., Zhou, K., Liu, Y., Liu, A., Zhang, Q., Han, G., & Liu, S. (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of oil from tiger nut (*Cyperus esculentus L.*) and its quality evaluation. *Industrial Crops & Products*, 115(February), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.034>
- Huang, W., Li, Z., Niu, H., Li, D., & Zhang, J. (2008). Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 89(3), 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.05.006>
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. (2016). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400–1407. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>
- Ibrahim, N., & Zaini, M. (2018). Microwave-assisted solvent extraction of castor oil from castor seeds. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26(12), 2516–2522. <https://doi.org/10.1016/J.CJCHE.2018.07.009>
- International Olive Council. (2015). TRADE STANDARD APPLYING TO OLIVE OILS

AND OLIVE-POMACE OILS. Retrieved May 20, 2002, from <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/3615-normaen1>

- Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds : Oleuropein , phenolic acids , phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops & Products*, *124*, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070>
- Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., & Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *14*, 46–60. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2011.11.008>
- Janu, C., Soban Kumar, D., Reshma, M., Jayamurthy, P., Sundaresan, A., & Nisha, P. (2014). Comparative study on the total phenolic content and radical scavenging activity of common edible vegetable oils. *Journal of Food Biochemistry*, *38*(1), 38–49.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J., & Luque de Castro, M. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, *1108*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.12.106>
- Jayaprakasha, G., Girenavar, B., & Patil, B. (2008). Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4484–4494. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.07.067>
- Jayaraman, K., & Das Gupta, D. (1992). Dehydration of fruits and vegetables. Recent developments in principles and techniques. *Drying Technology*, *10*, 1–50.
- JECFA. (2016). Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Call for Experts on Food Additives , Contaminants and toxins ; and Residues of Veterinary Drugs. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-bl776e.pdf>
- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S. (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, *88*(2-3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2009.08.002>
- Jiao, J., Li, Z., Gai, Q., Li, X., Wei, F., Fu, Y., & Ma, W. (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*, *147*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.079>
- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A., & Saura-Calixto, F. (2006). Common sources and

- estimated intake of plant sterols in the spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3462–3471.
- Johnson, L., & Lusas, E. (1983). Comparison of alternative solvents for oils extraction. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *60*, 181–194.
- Juliano, P., Bainczyk, F., Swiergon, P., Supriyatna, M., Guillaume, C., Ravetti, L., ... Xu, X. (2017). Extraction of olive oil assisted by high-frequency ultrasound standing waves. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 104–114. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2017.02.038>
- Kalogerakis, N., Politi, M., Foteinis, S., Chatzisyneon, E., & Mantzavinos, D. (2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters : A viable solution that promotes their overall sustainable management. *Journal of Environmental Management*, *128*, 749–758. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.027>
- Kalua, C., Bedgood, D., Bishop, A., & Prenzler, P. (2006). Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7641–7651.
- Katsouli, M., Polychniatou, V., & Tzia, C. (2017). Influence of surface-active phenolic acids and aqueous phase ratio on w/o nano-emulsions properties; model fitting and prediction of nano-emulsions oxidation stability. *Journal of Food Engineering*, *214*, 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2017.06.017>
- Ke, L., & Chen, H. (2016). Homogenate extraction of crude polysaccharides from *Lentinus edodes* and evaluation of the antioxidant activity. *Food Science and Technology*, *36*(3), 533–539. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.00916>
- Kelly, G. S. (1999). Squalene and its potential clinical use. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, *4*, 29–36.
- Kemper, T. (2005). Oil Extraction. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. (pp. 57–97). John Wiley & Sons.
- Ketenoglu, O., Sahin, K., Yorulmaz, A., & Tekin, A. (2018). LWT - Food Science and Technology Molecular distillation of olive pomace oil — Multiobjective optimization for tocopherol and squalene. *LWT-Food Science and Technology*, *91*, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.051>
- Khanal, R., Howard, L., & Prior, R. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*,

43(5), 1464–1469. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.04.018>

- Khezeli, T., Daneshfar, A., & Sahraei, R. (2016). A green ultrasonic- assisted liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oil. *Talanta*, *150*, 577–585.
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375.
- Kiritsakis, A. (2007). *OLIVE OIL-TABLE OLIVES-OLIVE PASTE*. (A. Kiritsakis, Ed.). Thessaloniki, Greece: Akritidis Broders.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świąło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(3-4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2006.02.012>
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, *47*(6), 156–161.
- Kopicová, Z., & Vavreinová, S. (2007). Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish. *Czech Journal of Food Sciences*, *25*(4), 195–201.
- Kostić, M., Joković, N., Stamenković, O., Rajković, K., Milić, P., & Veljković, V. (2013). Optimization of hempseed oil extraction by n-hexane. *Industrial Crops and Products*, *48*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.028>
- Kumar, C., Benal, M. M., Prasad, B. D., Krupashankara, M. S., & Kulkarni, R. S. (2018). Microwave assisted extraction of oil from *pongamia pinnata* seeds. *Materials Today: Proceedings*, *5*(1), 2960–2964. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.094>
- Latif, S., & Anwar, F. (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *86*, 393–400.
- Latif, S., Diosady, L., & Anwar, F. (2008). Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from canola (*Brassica napus* L.) seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*, 887–892.
- Lee, J., Kim, H., Ko, J., Jang, J., Kim, G., Lee, J., ... Jeon, Y. (2016). Rapid preparation of functional polysaccharides from *Pyropia yezoensis* by microwave-assistant rapid enzyme digest system. *Carbohydrate Polymers*, *153*, 512–517. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.07.122>

- Lee, O., Lee, B., Lee, J., Lee, H., Son, J., Park, C., ... Kim, Y. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, *100*(23), 6107–6113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.059>
- León-Camacho, M., Viera-Alcaide, I., & Ruiz-Méndez, M. (2003). Elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by bleaching of olive pomace oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *105*, 9–16.
- Leonelli, C., Veronesi, P., & Gravotto, G. (2013). Microwave-assisted Extraction: An introduction to dielectric heating. In F. Chemat & G. Gravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (pp. 1–10). Springer International Publishing.
- Leong, S., Burritt, D., & Oey, I. (2016). Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields. *Food Chemistry*, *196*, 833–841. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.025>
- Leouifoudi, I., Harnafi, H., & Zyad, A. (2015). Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/714138>
- Lercker, G., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2000). Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *Journal of Chromatography A*, *881*, 105–129.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.-C., Lorquin, J., Delattre, M., ... Labat, M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, *75*(4), 501–507. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00227-8)
- Leusink, G., Kitts, D., Yaghmaee, P., & Durance, T. (2010). Retention of antioxidant capacity of vacuum microwave dried cranberry. *Journal of Food Science*, *75*, 311–316.
- Li, B., Smith, B., & Hossain, M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, *48*(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2005.07.019>
- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, *130*(4), 928–936. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.08.019>
- Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, *37*, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.016>

- Li, J., Zu, Y., Luo, M., Gu, C., Zhao, C., Efferth, T., & Fu, Y. (2013). Aqueous enzymatic process assisted by microwave extraction of oil from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) seed kernels and its quality evaluation, *138*, 2152–2158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.011>
- Li, T., Qu, X., Zhang, Q., & Wang, Z. (2012). Ultrasound-assisted extraction and profile characteristics of seed oil from *Isatis indigotica* Fort. *Industrial Crops and Products*, *35*(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.013>
- Liau, M., Natan, F. A., Widiyanti, P., Ikasari, D., Indraswati, N., & Soetaredjo, F. E. (2008). Extraction of neem oil (*Azadirachta indica* A.) using n-hexane and ethanol: Studies of oil quality, kinetic and thermodynamic. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, *3*(3), 49–54. Retrieved from www.arpnjournals.com
- Litridou, M., Linsen, J., Schols, H., Bergmans, M., Posthumus, M., Tsimidou, M., & Boskou, D. (1999). Phenolic compounds in virgin olive oils: fractionation by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *74*, 169–174.
- Liu, C., Zhang, S., & Wu, H. (2009). Non-thermal extraction of effective ingredients from *Schisandra chinensis* baill and the antioxidant activity of its extract. *Natural Product Research*, *23*, 1390–1401.
- Liu, J., Gasmalla, M., Li, P., & Yang, R. (2016a). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *35*, 184–193. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2016.05.002>
- Liu, J., Gasmalla, M., Li, P., & Yang, R. (2016b). Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.002>
- Liu, S., Yang, F., Zhang, C., Ji, H., Hong, P., & Deng, C. (2009). Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, *48*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2008.09.013>
- Liu, T., Ma, C., Yang, L., Wang, W., Sui, X., Zhao, C., & Zu, Y. (2013). Optimization of Shikonin homogenate extraction from *Arnebia euchroma* using response surface methodology. *Molecules*, *18*(1), 466–481.
- Liyana-Pathirana, C., & Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, *93*(1), 47–56.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.08.050>

- Liza, M. S., Abdul Rahman, R., Mandana, B., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, I. S. M., & Hamid, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 319–326. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2009.02.001>
- Long, R. D., & Abdelkader, E. (2011). Mixed-Polarity Azeotropic Solvents for Efficient Extraction of Lipids from *Nannochloropsis Microalgae*, 7(2), 70–73.
- López-Fandiño, R. (2006). Functional improvement of milk whey proteins induced by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 351–363.
- Lu, H., Jiang, Y., & Chen, F. (2004). Determination of squalene using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia*, 59, 367–371. <https://doi.org/10.1365/s10337-003-0176-6>
- Luque-García, J. (2005). Microwave-assisted solvent extraction. In *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 584–591). Elsevier Academic Press.
- Luque-García, J., & Luque de Castro, M. (2004). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034, 237–242.
- Machado, A., Pasquel-Reátegui, J., Barbero, G., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus L.*) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.12.042>
- Malaman, F., Moraes, L., West, C., Ferreira, N., & Oliveira, A. (2011). Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora L.*): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. *Food Chemistry*, 124(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.05.109>
- Mani, S., Jaya, S., & Vadivambal, R. (2003). Optimization of solvent extraction of moringa (*moringa oleifera*) seed kernel oil using response surface. *Food and Bioproducts Processing*, 85(4), 328–335.
- Marić, M., Grassino, A., Zhu, Z., Barba, F., Brnčić, M., & Rimac Brnčić, S. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28–37.

<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.022>

- Marquez-Martin, A., Puerta, R., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., & Yaqoob, P. (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*, *36*(5-6), 211–217. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2006.12.007>
- Martin, L., Skinner, C., & Marriott, R. (2015). Supercritical extraction of oil seed rape: Energetic evaluation of process scale. *The Journal of Supercritical Fluids*, *105*, 55–59. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.04.017>
- Mason, T., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-Buesa, P. (2005). Application of Ultrasound. In D. Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Process* (pp. 323–343). Elsevier Academic Press.
- Mello, B., Petrus, J., & Hubinger, M. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, *96*(4), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.040>
- Meneses, M., Caputo, G., Scognamiglio, M., Reverchon, E., & Adami, R. (2015). Antioxidant phenolic compounds recovery from *Mangifera indica L.* by-products by supercritical antisolvent extraction. *Journal of Food Engineering*, *163*, 45–53. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2015.04.025>
- Meziane, S., & Kadi, H. (2008). Kinetics and Thermodynamics of Oil Extraction from Olive Cake. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *85*, 391–396.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, *106*(1), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
- Mishra, D., Shukla, A., Dixit, A., & Singh, K. (2005). Aqueous enzymatic extraction of oil from mandarin peels. *Journal of Oleo Science*, *54*, 355–359.
- Morales, M. T., & Tsimidou, M. (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (pp. 393–458). Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc.
- Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M., & Katzogiannos, E. (2004). Analysis of minor components in olive oil, *61*, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.002>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and

- herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Najafian, L., Ghodsvali, A., Haddad Khodaparast, M., & Diosady, L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42(1), 171–175. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.10.002>
- Nakkeeran, E., Umesh-Kumar, S., & Subramanian, R. (2011). Aspergillus carbonarius polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresource Technology*, 102(3), 3293–3297.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.10.048>
- Navarro, S., Capellini, M., Aracava, K., & Rodrigues, C. (2016). Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 185–194.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.009>
- Nkhili, E., Tomao, V., El Hajji, H., El Boustani, E., Chemat, F., & Dangles, O. (2009). Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochemical Analysis*, 20, 408–415.
- Nobre, B., Gouveia, L., Matos, P., Cristino, A., Palavra, A., & Mendes, R. (2012). Supercritical Extraction of Lycopene from Tomato Industrial Wastes with Ethane. *Molecules*, 17(7), 8397–8407.
- Notarnicola, B., Tassielu, G., Martino, G., & Nicoletti, G. (2004). Environmental and economic analysis of the organic and conventional extra-virgin olive oil. *Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and ...*, 28–34. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2004/QC/QC04003.xml;QC2004002103>
- Nunes, M. A., Costa, A. S. G., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R., ... Beatriz, P. (2018). Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds : A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of the Total Environment*, 644, 229–236.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.350>
- Ohlsson, T. (2002). Minimal processing of foods with non-thermal methods. In T. Ohlsson & N. Bengtsson (Eds.), *Minimal processing technologies in the food industry* (pp. 34–47). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J., & Guérère, M. (2006). Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions and chemometrics. *Food Chemistry*, 97(3), 382–393.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.024>

- Ortega, A., Palomar, J., Mata, J., Cruz, F., & Montoro, V. (2001). Automatic control of extractors. *Alimentación Equipos Y Tecnología*, *20*, 139–149.
- Ortega-Nieblas, M., Molina-Freaner, F., Robles-Burguenño, M., & Vázquez-Moreno, L. (2001). Proximate composition, protein quality and oil composition in seeds of *columnar cacti* from the sonoran desert. *Journal of Food Composition and Analysis*, *14*(6), 575–584. <https://doi.org/10.1006/JFCA.2001.1026>
- Ozturk, B., Parkinson, C., & Gonzalez-miquel, M. (2018). Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, *206*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>
- Paiva-Martins, F., & Kiritsakis, A. (2017). Olive fruit and olive oil composition and their functional compounds. In A. Kiritsakis & S. Shahidi (Eds.), *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing* (pp. 81–115). John Wiley & Sons.
- Pal, C., & Jadeja, G. (2019). Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa L.*) peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(4), 1969–1979. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9395>
- Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *42*(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(02)00037-5)
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G., & McHugh, T. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(5), 1249–1257. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2011.01.005>
- Passos, C., Yilmaz, S., Silva, C., & Coimbra, M. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, *115*(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.064>
- Patricelli, A., Assogna, A., Casalaina, E., Emmi, E., & Sodini, G. (1979). Fattori che influenzano l'estrazione dei lipidi da semi decor- ticati di girasole. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, *56*, 136–142.
- Paunović, D., Mitić, S., Stojanović, G., Mitić, M., Stojanović, B., & Stojković, M. (2015). Kinetics of the Solid-Liquid Extraction Process of Phenolic Antioxidants and Antioxidant Capacity from Hop (*Humulus lupulus L.*). *Separation Science and Technology*, *50*, 1658–

1664.

- Peña, F., Cárdenas, S., Gallego, M., & Valcarcel, M. (2003). Direct sampling of orujo oil for determining residual hexane by using a ChemSensor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*, 613–618.
- Peng, X., Duan, M., Yao, X., Zhang, Y., Zhao, C., Zu, Y., & Fu, Y. (2016). Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae Flos* with deep eutectic solvent. *Separation and Purification Technology*, *157*, 249–257. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2015.10.065>
- Perez, E., Carelli, A., & Crapiste, G. (2011). Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. *Journal of Food Engineering*, *105*(1), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.025>
- Periasamy, K., & Namasivayam, C. (1996). Removal of copper(II) by adsorption onto peanut hull carbon from water and copper plating industry wastewater. *Chemosphere*, *32*(4), 769–789. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00332-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00332-0)
- Perona, J., Arcemis, C., Ruiz-Gutierrez, V., & Catalá, A. (2005). Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 730–735.
- Perrier, A., Delsart, C., Boussetta, N., Grimi, N., Citeau, M., & Vorobiev, E. (2017). Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. *Ultrasonics - Sonochemistry*, *39*(April), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.003>
- Perry, R., Green, D., & Maloney, J. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook. *Journal of Chemical Education*.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Barros, L., Carvalho, A., Beatriz, M. P. P., Saraiva, J., & Ferreira, I. (2017). Cold extraction of phenolic compounds from watercress by high hydrostatic pressure: Process modelling and optimization. *Separation and Purification Technology*, *192*, 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.10.007>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A., & F, C. (2013). Ultrasound-Assisted Extraction. In M. Rostagno, J. Prado, & G. Kraus (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications* (pp. 89–105). Royal Society of Chemistry.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy, R., Herrero, M., Señoráns, F., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and*

Biomedical Analysis, 51, 450–455.

- Poiana, M., Trasca, T., Moigradean, D., & Gaita, C. (2016). Study on thermo-oxidative stability of soybean oil during convective heating at simulated frying temperature. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 22(2), 108–113.
- Poojary, M., Orlien, V., Passamonti, P., & Olsen, K. (2017). Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 234, 236–244. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.157>
- Prabhudesai, R. (1997). Leaching. In P. Schweitzer (Ed.), *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*. (pp. 3–19). McGraw-Hill.
- Prasad, K. N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., & Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.007>
- Prasad, K., Yang, B., Zhao, M., Ruenroengklin, N., & Jiang, Y. (2009). Application of ultrasonication or high-pressure extraction of flavonoids from litchi fruit pericarp. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 828–843.
- Prasad, K., Yang, B., Zhao, M., Sun, J., Wei, X., & Jiang, Y. (2010). Effects of high pressure or ultrasonic treatment on extraction yield and antioxidant activity of pericarp tissues of longan fruit. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 838–855.
- Pronyk, C., & Mazza, G. (2009). Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 215–226. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2009.06.002>
- Ptichkina, N., Markina, O., & Romyantseva, G. (2008). Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 192–195. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2007.04.002>
- Puertolas, E., Saldana, G., & Raso, J. (2016). Pulsed Electric Field Treatment for Fruit and Vegetable Processing. In D. Miklavcic (Ed.), *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2011.06.014>
- Putnik, P., Barba, F., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., & Bursać Kovačević, D.

- (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioproducts Processing*, 106, 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2017.08.004>
- Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.01.020>
- Que, F., Mao, L., Fang, X., & Wu, T. (2008). Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 1195–1201.
- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT*, 73, 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.05.037>
- Rahmanian, N., Jafari, S., & Galanakis, C. M. (2014). Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 1–18.
- Ramos, L., Kristenson, E., & Brinkman, Uat. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 3–29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01336-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01336-5)
- Rao, C., Newmark, H., & Reddy, B. (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 19(2), 287–290. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.287>
- Rashed, M., Tong, Q., Nagi, A., Li, J., Khan, N., Chen, L., ... Bakry, A. (2017). Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 100, 236–245. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.02.033>
- Rastrelli, L., Passi, S., Ippolito, I., Vacca, V., & De Simone, F. (2002). Rate of Degradation of α -Tocopherol, Squalene, Phenolics, and Polyunsaturated Fatty Acids in Olive Oil during Different Storage Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5566–5570.
- Rawal, G., Yadav, S., & Nagayach, S. (2015). Phytosterols and the Health. *Medical Research Chronicles*, 2, 441–444.

- Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(9), 881–888. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0359-z>
- Rivera del Álamo, R. M., Fregapane, G., Aranda, F., Gómez-Alonso, S., & Salvador, M. D. (2004). Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chemistry*, 84(4), 533–537. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00275-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00275-9)
- Rodrigues, S., Pinto, G., & Fernandes, F. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.01.006>
- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., & Fernández-Bolaños, J. (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, 99, 5261–5269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.027>
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Ruiz-Méndez, M., Rubio-Senent, F., & Fernández-Bolaños, J. (2012). New olive-pomace oil improved by hydrothermal pre-treatments. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions 0* (pp. 249–266). InTech.
- Roig, A., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960–969. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2005.07.024>
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M., & González-Navarro, C. (2012). Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum L.*) by-products. *Food Chemistry*, 133(3), 1045–1049. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.062>
- Roselló-Soto, E., Parniakov, O., Deng, Q., Patras, A., Koubaa, M., Grimi, N., ... Barba, F. (2016). Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8, 214–234.
- Ruesgas-Ramon, M., Figueroa-Espinoza, M., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 3591–3601.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>

- Rui, H., Zhang, L., Li, Z., & Pan, Y. (2009). Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.016>
- Ruiz-Méndez, V., López, A., & Fernández, G. (2008). Characterization and chemometric study of crude and refined oils from table olive by-products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 537–546.
- Ryan, E., Galvin, K., Connor, T. P. O., & Maguire, A. R. (2007). Phytosterol , Squalene , Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds , Grains , and Legumes, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0046-8>
- Ryckebosch, E., Paulina, S., Bermúdez, C., & Termote-verhalle, R. (2014). Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1501–1510. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0189-y>
- Sablani, S. (2006). Drying of fruits and vegetables: retention of nutritional/functional quality. *Journal Drying Technology*, 24, 123–135.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.09.095>
- Sagar, V., & Suresh Kumar, P. (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 15–26.
- Saha, B., Qureshi, N., Kennedy, G., & Cotta, M. (2016). Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 29–35. <https://doi.org/10.1016/J.IBIDOD.2015.12.020>
- Şahin, S., & Şamli, R. (2013a). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>
- Şahin, S., & Şamli, R. (2013b). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595–602.
- Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2002). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract.

<https://doi.org/10.1177/1082013208089563>

- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C., Ghazali, H., Bordbar, S., & Serjouie, A. (2015). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry*, *172*, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.068>
- San Martín, M., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42*, 627–645.
- Sancey, B. (2002). Extraction. In *Encyclopedia of Science & Technology* (pp. 767–769). McGraw-Hill.
- Sánchez Moral, P., & Ruiz Méndez, M. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Y Aceites*, *57*(1), 47–55. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.21>
- Sánchez-Gutiérrez, C., Ruiz-Méndez, M. V., Jiménez-Castellanos, M. R., & Lucero, M. (2017). Influence of refining processes on content of bioactive compounds, rheology, and texture of olive pomace oil for use in topical formulations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *119*(9). Retrieved from <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600408>
- Sanchez-Machado, D., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., & López-Cervantes, J. (2004). An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography*, *18*, 183–190. <https://doi.org/10.1002/bmc.316>
- Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P., & Cano, M. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(6), 552–576.
- Santos, S., Martins, M., Caneschi, A., Aguilar, P., & Coimbra, J. (2015). Kinetics and Thermodynamics of Oil Extraction from *Jatropha curcas* L. Using Ethanol as a Solvent. *International Journal of Chemical Engineering*, *2015*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/871236>
- Sattler, K., & Feidt, H. (1995). Extraction. In *Thermal Separation Processes* (pp. 393–465). VCH.
- Saxena, D. K., Sharma, S. K., & Sambhi, S. S. (2011). Kinetics and Thermodynamics of Cottonseed Oil Extraction. *Grasas Y Aceites*, *62*(2), 198–205.
- Sayyar, S., Abidin, Z., Yunus, R., & Muhammad, A. (2009). Extraction of oil from *Jatropha* seeds-optimization and kinetics. *American Journal of Applied Sciences*, *6*(7), 1390–1395. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.1390.1395>

- Seçmeler, Ö., Güçlü, Ö., Fernández-bolaños, J., & Rodríguez-gutiérrez, G. (2018). Effect of subcritical water and steam explosion pretreatments on the recovery of sterols, phenols and oil from olive pomace. *Food Chemistry*, 265, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.088>
- Segovia, F., Luengo, E., Corral-Pérez, J., Raso, J., & Almajano, M. (2015). Improvements in the aqueous extraction of polyphenols from borage (*Borago officinalis* L.) leaves by pulsed electric fields: Pulsed electric fields (PEF) applications. *Industrial Crops and Products*, 65, 390–396. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.11.010>
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montedoro, G. (2008). Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10048–10055.
- Seth, S., Agrawal, Y. C., Ghosh, P. K., Jayas, D. S., & Singh, B. P. N. (2007). Oil extraction rates of soya bean using isopropyl alcohol as solvent, 97, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.03.008>
- Sharma, A., Khare, S., & Gupta, M. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 215–218.
- Shi, W. G., Zu, Y. G., Zhao, C., & Yang, L. (2009). Homogenate extraction technology of camptothecine and hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* leaves. *Journal of Forest Research*, 20(2), 168–170.
- Shofinita, D., Feng, S., & Langrish, T. (2015). Comparing yields from the extraction of different citrus peels and spray drying of the extracts. *Advanced Powder Technology*, 26(6), 1633–1638. <https://doi.org/10.1016/J.APT.2015.09.007>
- Shouqin, Z., Jun, X., & Changzheng, W. (2005a). Effect of high hydrostatic pressure on extraction of flavonoids in propolis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, 50–54.
- Shouqin, Z., Jun, X., & Changzheng, W. (2005b). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 50–54. <https://doi.org/10.1002/jctb.1153>
- Shouqin, Z., Junjie, Z., & Changzhen, W. (2004). Novel high pressure extraction technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(2), 471–474. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.02.029>

- Sicaire, A., Vian, M., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., & Chemat, F. (2016). Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 319–329. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.01.011>
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., & Huopalahti, R. (1999). Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *10*(6-7), 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00049-7)
- Simić, V., Rajković, K., Stojičević, S., Veličković, D., Nikolić, N., Lazić, M., & Karabegović, I. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*, *160*, 89–97. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2016.01.019>
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, *89*(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.02.025>
- So, G., & Macdonald, D. (1986). Kinetics of Oil Extraction from Canola (Rapeseed). *The Canadian Journal Of Chemical Engineering*, *64*, 80–86.
- Sodeifian, G., Ghorbandoost, S., Sajadian, S., & Saadati Ardestani, N. (2016). Extraction of oil from Pistacia khinjuk using supercritical carbon dioxide: Experimental and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, *110*, 265–274. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.12.004>
- Soquetta, M., Terra, L., & Bastos, C. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CYTA - Journal of Food*, *16*(1), 400–412. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>
- Sowbhagya, H., & Chitra, V. (2010). Enzyme-Assisted Extraction of Flavorings and Colorants from Plant Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*, 146–161.
- Sparr Eskilsson, C., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *902*(1), 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- Stavroulias, S., & Panayiotou, C. (2005). Determination of Optimum Conditions for the Extraction of Squalene. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *19*(4), 373–381.

- Stroescu, M., Stoica-Guzun, A., Ghergu, S., Chira, N., & Jipa, I. (2013). Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.051>
- Suárez, M., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2010). Development of a phenol-enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10396–10403.
- Sulaiman, S., Aziz, A. R., & Kheireddine, M. (2013). Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil. *Journal of Food Engineering*, 114(2), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.025>
- Sumnu, S., & Sahin, S. (2012). Microwave heating. In D. Sun (Ed.), *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues, Second Edition* (pp. 555–560). CRC Press.
- Sun, Y., Yang, K., Cao, Q., Sun, J., Xia, Y., Wang, Y., ... Ma, C. (2017). Homogenate-assisted Vacuum-powered Bubble Extraction of Moso Bamboo Flavonoids for On-line Scavenging Free Radical Capacity Analysis. *Molecules*, 22(1156), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22071156>
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., ... Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 1817–1825. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.02.090>
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., & Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16–23. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.06.038>
- Tabtabaei, S., & Diosady, L. (2013). Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*, 52(2), 547–556. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.03.005>
- Taghvaei, M., Mahdi, S., Assadpoor, E., Nowrouzieh, S., & Alishah, O. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of cottonseed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 160, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.064>

- Takac, S., & Karakaya, A. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 2(3), 230–237. <https://doi.org/10.2174/2211334710902030230>
- Takeuchi, T., Pereira, C., Braga, M., Marostica, M., Leal, P., & Meireles, A. (2009). Low-Pressure Solvent Extraction (Solid–Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. In A. Meireles (Ed.), *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications* (pp. 140–171). CRC Press.
- Tandon, S., & Rane, S. (2008). Decoction and Hot Continuous Extraction Techniques. In S. Handa, S. Khanuja, G. Longo, & D. Rakesh (Eds.), *An Overview of Extraction Techniques for Medical and Aromatic Plants* (pp. 93–105). ICS UNIDO.
- Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4), 1461–1469. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.029>
- Teixeira, C., Macedo, G., Macedo, J., da Silva, L., & Rodrigues, A. (2013). Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. *Bioresource Technology*, 129, 575–581. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.11.057>
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., & Martin Lo, Y. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.010>
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., & Martin, L. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 202–208.
- Tir, R., Dutta, P., & Badjah-hadj-ahmed, A. Y. (2012). Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1427–1438. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200129>
- Toda, T., Sawada, M., & Rodrigues, C. (2016). Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2015.12.003>
- Toepfl, S., Siemer, C., & Heinz, V. (2014). Effect of High-Intensity Electric Field Pulses on Solid Foods. *Emerging Technologies for Food Processing*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00008-5>

- Tong, Y., Yan, Y., Jiang, S., Wang, P., Jiang, Y., Bathaie, S., ... Lu. (2018). Homogenate extraction of crocins from saffron optimized by response surface methodology. *Journal of Chemistry*, 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/9649062>
- Türker, N., & Erdogdu, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. *L.*). *Journal of Food Engineering*, 76(4), 579–583. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.06.005>
- Turner, C. (2006). Overview of Modern Extraction Techniques for Food and Agricultural Samples. In C. Turner (Ed.), *Modern Extraction Techniques* (pp. 3–19). ACS Symposium Series.
- Uddin, M., Yeasmin, S., Munsur, M., Mizanur, M., Mazumder, F., Saifur, M., ... Kamonasish, M. (2013). The Effect of Different Solvent Mixtures for the Extraction of Sesame (*Sesamum indicum* linn) Seed Lipids. *Bangladesh Research Publications Journal*, 8(2), 180–185.
- Uribe, E., Lemus-mondaca, R., Vega-gálvez, A., López, L. A., Pereira, K., López, J., ... Scala, K. Di. (2012). Quality characterization of waste olive cake during hot air drying : nutritional aspects and antioxidant activity, (Odepa 2010). <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0802-0>
- Uribe, E., Lemus-mondaca, R., Vega-gálvez, A., Zamorano, M., Quispe-fuentes, I., Pasten, A., & Di, K. (2014). Influence of process temperature on drying kinetics , physicochemical properties and antioxidant capacity of the olive-waste cake. *Food Chemistry*, 147, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.121>
- Veggi, P., Martinez, J., & Meireles, M. (2013). Fundamentals of Microwave Extraction. In F. Chemat & G. Gravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (pp. 15–52). Springer International Publishing.
- Viganó, J., Coutinho, J., Souza, D., Baroni, N., Godoy, H., Macedo, J., & Martínez, J. (2016). Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 110, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.12.001>
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, 468(2-3), 159–160. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01216-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01216-3)
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2009). Pulsed-electric-fields-induced effects in plant tissues:

- fundamental aspects and perspectives of applications. In E. Vorobiev & N. Lebovka (Eds.), *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterial* (pp. 39–81). Springer International Publishing.
- Wakeman, R. (1994). Extraction (Liquid-Solid). In J. Kroschwitz & M. Howe-Grant (Eds.), *Encyclopedia of Chemical Technology* (pp. 181–195). John Wiley & Sons.
- Wang, L., Qin, P., & Hu, Y. (2010). Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 4, 307–313.
- Wang, L., & Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2005.12.004>
- Wang, L., Weller, C., Schlegel, V., Carr, T., & Cuppett, S. (2008). Supercritical CO₂ extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles. *Bioresource Technology*, 99(5), 1373–1382. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.055>
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846–854. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.11.007>
- Waterhouse, A. (2002). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6, 11.11–11.18.
- Wei, Z., Qi, X., Li, T., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., & Fu, Y. (2015). Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, 149, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.05.015>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C., Zandile, M., Duan, Y., ... Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops - A review. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- White, B., Rice, L., & Howard, L. (2012). The Procedure, Principle, and Instrumentation of Antioxidant Phytochemical Analysis. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, 25–68.
- Wojdyło, A., Figiel, A., Krzysztof, L., & NowickaJan, P. (2014). Effect of convective and vacuum-microwave drying on the bioactive compounds, color, and antioxidant capacity

- of sour cherries. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 829–841.
- Xi, J. (2006). Application of high hydrostatic pressure processing of food to extracting lycopene from tomato paste waste. *High Pressure Research*, 26, 33–41.
- Xi, J. (2009). Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2009.03.003>
- Xi, J. (2013). High-Pressure Processing as Emergent Technology for the Extraction of Bioactive Ingredients From Plant Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 837–852.
- Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., & Zhang, R. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 139–143.
- Xiao, X., Wang, J., Wang, G., Wang, J., & Li, G. (2009). Evaluation of vacuum microwave-assisted extraction technique for the extraction of antioxidants from plant samples. *Journal of Chromatography A*, 1216(51), 8867–8873. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.10.087>
- Xie, D., Jin, J., Sun, J., Liang, L., Wang, X., Zhang, W., ... Jin, Q. (2017). Comparison of solvents for extraction of krill oil from krill meal: Lipid yield, phospholipids content, fatty acids composition and minor components. *Food Chemistry*, 233, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.138>
- Xu, L., & Diosady, L. (2003). Fats and oils from plant materials. In C. Tzia & G. Liadakis (Eds.), *Extraction optimization in food engineering* (pp. 1–35). Marcel Dekker.
- Xu, Y., Cai, F., Yu, Z., Zhang, L., Li, X., Yang, Y., & Liu, G. (2016). Optimisation of pressurised water extraction of polysaccharides from blackcurrant and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 194, 650–658. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.08.061>
- Xu, Z. (2012). Important Antioxidant phytochemicals in agricultural food products. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, 1–24.
- Xue, D., & Farid, M. (2015). Pulsed electric field extraction of valuable compounds from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 178–186. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2015.03.012>
- Yang, R., Li, W., Zhu, C., & Zhang, Q. (2010). Effects of ultra-high hydrostatic pressure on

- foaming and physical-chemistry properties of egg white. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 02(08), 617–620. <https://doi.org/10.4236/jbise.2009.28089>
- Yanik, D. (2017). Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.020>
- Yao, X., Zhang, D., Duan, M., Cui, Q., Xu, W., Luo, M., & Li, C. (2015). Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent. *Separation and Purification Technology*, 149, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.037>
- Yen, H., Yang, S., Chen, C., & Chang, J. (2015). Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 184, 291–296. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.10.030>
- Yin, C., Yang, S., Liu, X., & Yan, H. (2013). Efficient extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* with polar and non-polar solvents after acid washing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(7), 776–780. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)60510-8](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60510-8)
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M., & Farhoosh, R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>
- Young, M., Hoon, S., Yeong, G., Li, M., Ri, Y., Lee, J., & Sang, H. (2017). Changes of phenolic-acids and vitamin E profiles on germinated rough rice (*Oryza sativa* L.) treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 217, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.069>
- Yu, Y., Shouqin, Z., & Gao, F. (2008). Comparison of the polyphenol yield and antioxidant activity of peanut shell extract made by different solvent extraction methods. *Journal of Biotechnology*, 136(1), 508–509.
- Yuan, C., Ju, Y., Jin, R., Ren, L., & Liu, X. (2015). Simultaneous HPLC–DAD analysis of tocopherols, phytosterols, and squalene in vegetable oil deodorizer distillates. *Chromatographia*, 78, 273–278.
- Yuan, C., Xie, Y., Jin, R., Ren, L., Zhou, L., & Zhu, M. (2017). Simultaneous analysis of tocopherols, phytosterols, and squalene in vegetable oils by high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 10, 3716–3722. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0927-x>

- Zaher, F., El Kinawy, O., & El Haron, D. (2008). Solvent extraction of jojoba oil from pre-pressed jojoba meal. *Grasas Y Aceites*, 55(2), 129–134. <https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i2.156>
- Zbakh, H., & El Abbassi, A. (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2012.01.002>
- Zhang, G., Hu, M., He, L., Fu, P., Wang, L., & Zhou, J. (2013). Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. *Food and Bioprocesses Processing*, 91(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2012.09.003>
- Zhang, Q., Zhang, Z., Yue, X., Fan, X., Li, T., & Chen, S. (2009). Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry*, 116(2), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.071>
- Zhang, S., Lu, Q., Yang, H., Li, Y., & Wang, S. (2011). Aqueous enzymatic extraction of oil and protein hydrolysates from roasted peanut seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 727–732.
- Zhang, Y., Li, S., Yin, C., Jiang, D., Yan, F., & Xu, T. (2012). Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Food Chemistry*, 135(1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.04.111>
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.05.038>
- Zhang, Z., Wang, L., Li, D., Jiao, S., Chen, X., & Mao, Z. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 192–198. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2008.01.014>
- Zhong, J., Wang, Y., Yang, R., Liu, X., Yang, Q., & Qin, X. (2018). The application of ultrasound and microwave to increase oil extraction from *Moringa oleifera* seeds. *Industrial Crops & Products*, 120(April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.028>
- Zhou, L., Jing, T., Zhang, P., Zhang, L., Cai, S., Liu, T., ... Zhang, J. (2015). Kinetics and modeling for extraction of chrysin from *Oroxylum indicum* seeds. *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 2045–2050. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0272-z>

- Zhu, X., Mang, Y., Shen, F., & Xie, J. (2014). Homogenate extraction of gardenia yellow pigment from *Gardenia Jasminoides Ellis* fruit using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, *51*, 1575–1581. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0683-2>
- Zhu, X. Y., Lin, H. M., Xie, J., Chen, S. S., & Wang, P. (2011). Homogenate extraction of isoflavones from soybean meal by orthogonal design. *Journal of Scientific & Industrial Research*, *70*, 455–460.
- Zielinska, M., Zapotoczny, P., Alves-Filho, O., Eikevik, T., & Blaszcak, W. (2013). Microwave vacuum–assisted drying of green peas using heat pump and fluidized bed: a comparative study between atmospheric freeze drying and hot air convective drying. *Journal Drying Technology*, *31*, 633–642.