



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

Παραλαβή φαινολικών συστατικών από τον καρπό της αρώνιας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΟΥΔΗ ΘΕΟΔΩΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2022

Περίληψη

Η Αρώνια (*Aronia melanocarpa* ή black chokeberry) είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος που παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ως καλλωπιστικό φυτό. Πλέον όμως είναι γνωστό ότι ο καρπός της είναι πλούσιος σε φαινολικά συστατικά και για το λόγο αυτό έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Τα φαινολικά συστατικά είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής, δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά και διαθέτουν ένα πλήθος ωφελειών για την υγεία (αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδης, αντιθρομβωτική δράση, αντικαρκινική πρόληψη κ.α.). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων ως φυσική απάντηση στα συντηρητικά πρόσθετα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο καρπός της αρώνιας διαθέτει υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από τους καρπούς συγγενικών της ειδών που θεωρούνται υπερτροφές, όπως είναι τα δαμάσκηνα, τα βατόμουρα και τα cranberries.

Η παρούσα διπλωματική διαχωρίζεται σε δύο κύρια μέρη. Το πρώτο σκέλος έχει ως στόχο τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα μέρη του καρπού μέσω μελέτης των κλασμάτων που τον συνθέτουν (φλοιός και εσωτερικό). Το δεύτερο έχει ως στόχο τη μελέτη της ολιστικής αξιοποίησής του. Η αρώνια διατίθεται στην αγορά συνήθως σε μορφή αποξηραμένου προϊόντος ή φυσικού χυμού. Για αυτό, διερευνήθηκε η εκμετάλλευση του υπολείμματος χυμοποίησης (πυρήνας) και μελετήθηκε η ανάκτηση φαινολικών συστατικών από τυχόν αδιάθετο προϊόν αποξηραμένου καρπού.

Για το πρώτο μέρος, ποσότητα μούρων αρώνιας αποφλοιώθηκε και τα κλάσματα που προέκυψαν (φλοιός και σάρκα-κουκούτσια) υποβλήθηκαν σε 3 διαδοχικές εκχυλίσεις με μεθανόλη οξινισμένη κατά 0,5 % v/v, υποβοηθούμενες από υπερήχους. Η μεθανόλη γενικά αποφεύγεται ως μέσο εκχύλισης στη βιομηχανία γιατί είναι τοξική όμως ενδείκνυται για αναλυτικούς σκοπούς καθώς παρέχει υψηλές αποδόσεις στην ανάκτηση φαινολικών συστατικών. Το μέσο οξίνισης (τριφθοροξικό οξύ) προστέθηκε με σκοπό την προστασία των ανθοκυανών, ασταθών φαινολικών ενώσεων που είναι και τα πολυτιμότερα συστατικά της αρώνιας. Διαπιστώθηκε ότι ο φρέσκος καρπός αποτελείται κατά 86 % από σάρκα-κουκούτσια και κατά 14 % από φλοιό w/w. Σε ξηρή βάση τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 81 % και 19 %. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενό τους (ανάλυση Folin – Ciocalteu) και το περιεχόμενό τους σε επιμέρους φαινολικές ενώσεις: ανθοκυάνες, φαινολικά οξέα και φλαβονόλες (ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης - HPLC). Για την ποσοτικοποίησή τους χρησιμοποιήθηκαν κατά αντιστοιχία οι ακόλουθες πρότυπες ενώσεις: Γαλλικό οξύ (GA), Κυανιδίνη (Cy), Χλωρογενικό οξύ (ChA) και Ρουτίνη (QRE). Ο φλοιός παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά ($150 \pm 5 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}^{(1)}$) και η σάρκα περίπου τη μισή ($79 \pm 3 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$) σε ξηρή βάση. Αναφορικά με την ανάκτηση των επιμέρους φαινολικών ενώσεων, διαπιστώθηκε ότι το 73 % των ανθοκυανών του καρπού περιέχεται στο φλοιό ($63,19 \pm 2,76 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{φλοιού}}^{(2)}$ και $5,44 \pm 0,19 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{σάρκας}}$ σε ξηρή βάση), το 78 % των φαινολικών οξέων περιέχεται στη σάρκα ($3,70 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{φλοιού}}^{(3)}$ και $3,121 \pm 0,035 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{σάρκας}}$ σε ξηρή βάση) και οι φλαβονόλες διαμοιράζονται εξίσου στα δύο κλάσματα ($5,47 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{φλοιού}}^{(4)}$ και $1,53 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{σάρκας}}$ σε ξηρή βάση). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν οι κύριες ανθοκυάνες και τα κύρια φαινολικά οξέα του καρπού, με τις πρώτες να απαρτίζονται από 4 γλυκοζίτες της κυανιδίνης (κατά σειρά ελαττούμενης συγκέντρωσης: 3-Ο-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης, 3-Ο-αραβινοζίτης της κυανιδίνης, 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης και 3-Ο-ξυλοζίτης της κυανιδίνης) και τα δεύτερα να απαρτίζονται από δύο ισομερή εστεροποιημένα οξέα (κατά σειρά ελαττούμενης συγκέντρωσης: χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ). Με βάση τη σύσταση του καρπού σε φλοιό και σάρκα, υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που ανακτήθηκαν συνολικά: 94 ± 2

$\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{καρπού}}$ πολυφαινόλες, $16,78 \pm 0,42 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{καρπού}}$ ανθοκυάνες, $3,27 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{καρπού}}$ φαινολικά οξέα και $2,32 \pm 0,00 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{καρπού}}$ φλαβονόλες (σε ξηρή βάση).

Για την αξιοποίηση τυχόν αδιάθετου καρπού μέσω ανάκτησης των φαινολικών συστατικών, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση αποξηραμένου προϊόντος αρώνιας του εμπορίου (πλήρης ανάμειξη, διαλύτης νερό σε αναλογία 1:20 w/v, χρόνος εκχύλισης 90 min, θερμοκρασία περιβάλλοντος) η οποία μελετήθηκε σε σχέση με το χρόνο. Η ανάκτηση που επετεύχθη σε φαινολικά συστατικά ήταν $27,9 \pm 0,8 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{καρπού}}$ (σε ξηρή βάση) και διαπιστώθηκε ότι σε χρόνο $t = 10 \text{ min}$ η συγκέντρωση είχε ήδη ξεπεράσει το 75 % της τελικής τιμής της. Η βέλτιστη περιγραφή της ανάκτησης φαινολικών συστατικών σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης παρασχέθηκε από καμπύλη της μορφής $c = c_{\infty} - a \cdot e^{-kt}$, όπου c η ανάκτηση πολυφαινολών ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$), t ο χρόνος εκχύλισης (min) και c_{∞} , a , k , κινητικές σταθερές του συστήματος.

Για την αξιοποίηση του υπολείματος χυμοποίησης, προσομοιώθηκε αρχικά η βιομηχανική χυμοποίηση του φρέσκου καρπού, από την οποία παρελήφθη φυσικός χυμός ($45,3 \pm 1,9 \text{ \% w/w}$) και πυρήνας χυμοποίησης ($51 \pm 2 \text{ \% w/w}$). Ο φυσικός χυμός υποβλήθηκε σε αναλύσεις και βρέθηκε ότι διέθετε $53,0 \pm 0,05 \text{ g/L}$ αναγωγικά σάκχαρα, $6231 \pm 159 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ πολυφαινόλες, $892 \pm 11 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{L}$ ανθοκυάνες, $1116 \pm 45 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{L}$ φαινολικά οξέα, $269 \pm 12 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{L}$ φλαβονόλες και $2190 \pm 109 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$ ταννίνες. Οι ταννίνες είναι πολυμερείς φαινολικές ενώσεις στις οποίες είναι ιδιαίτερα πλούσια η αρώνια, όμως δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός τους στα εκχυλίσματα κλασμάτων του καρπού. Στο χυμό του καρπού κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός τους μέσω καταβύθισης με πρωτεΐνη βόειου ορού (BSA).

Ο πυρήνας της χυμοποίησης υπέστη αρχικά ήπια ξήρανση με αέρα 40°C και κονιοποίηση. Η σκόνη υποβλήθηκε σε εκχύλιση σταθερής κλίνης ημιδιαλείποντος έργου. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε νερό οξιτισμένο κατά $0,75 \text{ \% w/v}$ με κιτρικό οξύ και η τελική αναλογία πρώτης ύλης - εκχυλίσματος προέκυψε ίση με $1:18 \text{ w/v}$. Η ανάκτηση πολυφαινολών από τον πυρήνα μελετήθηκε σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης και τον όγκο του παραγόμενου εκχυλίσματος. Διαπιστώθηκε ότι περιγράφεται από δύο στάδια: στο αρχικό στάδιο η διαφορική ανάκτηση αυξάνει γραμμικά σε σχέση με τον όγκο του παραγόμενου εκχυλίσματος (στάδιο έκπλυσης) ενώ έπειτα μειώνεται, ακολουθώντας κινητική της μορφής $y = a \cdot x^{-b}$ ($0 < b < 1$), όπου y η διαφορική ανάκτηση (δηλαδή η συγκέντρωση στο στιγμιαία παραγόμενο εκχύλισμα) σε πολυφαινόλες ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}$) και x ο όγκος ολικού παρεληφθέντος εκχυλίσματος (L). Σχέση ίδιας μορφής προκύπτει και για τη διαφορική ανάκτηση σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης (min). Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων προσδιορίστηκαν στο ολικό εκχύλισμα και εκφράστηκαν σε ξηρή βάση πυρήνα: $13,2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$ πολυφαινόλες, $3,67 \pm 0,14 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}$ ανθοκυάνες, $1,63 \pm 0,08 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}$ φαινολικά οξέα και $1,512 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}$ φλαβονόλες. Ο υπολογισμός της συνολικής ανάκτησης φαινολικών συστατικών (ανάκτηση μέσω χυμού + ανάκτηση μέσω πυρήνα) έδειξε πολύ μικρότερη παραλαβή από ότι η εκχύλιση κλασμάτων του καρπού με μεθανόλη, ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και ιδιαίτερα ως προς τη συγκέντρωση σε ανθοκυάνες. Πραγματοποιήθηκε μερική διερεύνηση της αιτίας μέσω συμπληρωματικής εκχύλισης νωπού πυρήνα και αποδείχθηκε ότι ένας λόγος υποβάθμισης του υλικού ήταν η ξήρανση που προηγήθηκε.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε παραγωγή χρωστικής σκόνης με αντιοξειδωτικές ιδιότητες με ενθυλάκωση μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Για το σκοπό αυτό, το εκχύλισμα αναμίχθηκε με πολυμερή φορέα (αναλογία στερεού εκχυλίσματος – φορέα: $6,2 \text{ \% w/w}$) και το παραγόμενο μίγμα συγκέντρωσης 30 \% w/w σε ολικά στερεά ξηράθηκε με ψεκασμό (θερμοκρασία εισόδου ξηραντήρα 140°C , θερμοκρασία εξόδου $90-100^{\circ}\text{C}$ και ογκομετρική παροχή 4 mL/min). Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με 2 διαφορετικούς φορείς (μαλτοδεξτρίνη 17-20 DE και μίγμα μαλτοδεξτρίνης – αραβικού κόμμεος 4:1), που παρουσίασαν

εξίσου υψηλές αποδόσεις στην ενθυλάκωση ανθοκυανών και ολικών πολυφαινολών (> 88 %). Και στις δύο περιπτώσεις οι κόνεις διέθεταν χαμηλή υγρασία (< 2,5 %), εντός των ορίων διασφάλισης μικροβιακής σταθερότητας.

Λέξεις κλειδιά: αρώνια, εκχύλιση πολυφαινολών, εκχύλιση ανθοκυανών, υπόλειμμα χυμοποίησης αρώνιας, ενθυλάκωση ανθοκυανών, ξήρανση με ψεκάσμο.



Διευκρινίσεις: ¹GAE = Gallic Acid Equivalents, ²CyE = Cyanidin Equivalents, ³ChAE = Chlorogenic Acid Equivalents, ⁴QRE = Quercetin Rutinoside Equivalents

Abstract

Aronia (*Aronia melanocarpa* or black chokeberry) is a deciduous shrub formerly used as an ornamental plant. However, it is now known that its fruit is rich in phenolic components and for that reason has attracted the interest of many researchers. Phenolic components are an integral part of the human diet, act as natural antioxidants and have numerous health benefits (antibacterial, anti-inflammatory properties, anti-cancer prevention, etc.). In addition, they are used by the food industry as a natural response to preservative additives. Indicatively, aronia berries have a higher phenolic content than the fruits of related species considered as superfoods, such as plums, blueberries and cranberries.

The current thesis is divided into two main parts. The first part aims at a better understanding of the aronia berry through the study of the individual fractions that compose it (skin and interior). The second part aims at the study of its holistic utilization. Aronia is usually marketed in the form of a dried product or natural juice. Therefore, the exploitation of the juicing residue (presscake) was investigated and the recovery of phenolic components from any unallocated dried fruit product was studied.

For the first part, a quantity of aronia berries was peeled and the resulting fractions (skin / flesh-stones) were subjected to 3 consecutive extractions with methanol acidified by 0.5% v/v, assisted by ultrasound. Methanol is generally avoided as an extraction solvent in industry because it is toxic but is suitable for analytical purposes as it provides high efficiencies in the recovery of phenolic components. The acidifier (trifluoroacetic acid) was added to protect the anthocyanins, unstable phenolic compounds which are the most valuable constituents of chokeberry. It was found that aronia berries consist of 86 % flesh and 14% skin (w/w on a fresh basis). The extracts were analyzed for their total phenolic content (Folin - Ciocalteu analysis) and their content in individual phenolic compounds (anthocyanins, phenolic acids, flavonols, by HPLC analysis). The skin showed a very high content of phenolic components ($150 \pm 5 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}^{(1)}$) and the flesh about half comparatively ($79 \pm 3 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$) on a dry basis. Regarding the recovery of the individual phenolic compounds from the two fractions, it was found that 73% of the berry's anthocyanins are contained in the skin ($63.19 \pm 2.76 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{skin}}^{(2)}$ and $5.44 \pm 0.19 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{flesh}}$ on a dry basis), 78% of phenolic acids are contained in the flesh ($3.70 \pm 0.24 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{skin}}^{(3)}$ and $3.121 \pm 0.035 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{flesh}}$ on a dry basis) and flavonols are divided equally into two fractions ($5.47 \pm 0.13 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{skin}}^{(4)}$ and $1.53 \pm 0.02 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{flesh}}$ on a dry basis). In addition, the main anthocyanins and the main phenolic acids of the fruit were identified, with the former consisting of 4 glycosides of cyanidine (in order of decreasing concentration: cyanidin 3-*O*-galactoside, cyanidin 3-*O*-arabinoside, cyanidin 3-*O*-glucoside and cyanidin 3-*O*-xyloside) and the latter consisting of two isomerized esterified acids (in order of decreasing concentration: chlorogenic and neochlorogenic acid). From the computed reconstitution of the berry, the total concentrations of polyphenols were extracted: $94 \pm 2 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{berry}}$ polyphenols, $16.78 \pm 0.42 \text{ mg}_{\text{CYE}}/\text{g}_{\text{berry}}$ anthocyanins, $3.27 \pm 0.05 \text{ mg}_{\text{ChAE}}/\text{g}_{\text{berry}}$ phenolic acids and $2.32 \pm 0.00 \text{ mg}_{\text{QRE}}/\text{g}_{\text{berry}}$ flavonols (on a dry basis).

Additionally, dried aronia product (full mixing, solvent water, ratio 1:20 w/v, 90 min) was extracted and the extraction was studied in relation to time. The recovery achieved in phenolic components was $27.9 \pm 0.8 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{berry}}$ (on a dry basis) and it was found that at time $t = 10 \text{ min}$ the concentration had already exceeded 75% of its final value. The optimal description of the recovery of phenolic components in relation to the extraction time was provided by a curve of the form $c = c_{\infty} - a \cdot e^{-kt}$.

For the second part, the industrial juicing process was laboratory simulated, from which was obtained natural juice ($45.3 \pm 1.9\%$ v/w) and juicing presscake ($51 \pm 2\%$ w/w). The natural juice was analyzed and found to have $5.30 \pm 0.05\%$ w/v reducing sugars, 6231 ± 159 mg_{GAE}/L polyphenols, 892 ± 11 mg_{CyE}/L anthocyanins, 1116 ± 45 mg_{ChAE}/L phenolic acids, 269 ± 12 mg_{QRE}/L flavonols and 2190 ± 109 mg_{GAE}/L tannins. Tannins are polymeric phenolic compounds in which chokeberry is particularly rich. However, it has not been possible to determine them in fruit fragment extracts and that's why they have not been mentioned before. In the fruit juice it was possible to determine them by precipitation with bovine protein (BSA).

The juicing presscake was initially dried with 40°C air and pulverized. The powder was subjected to a semi-intermittent fixed bed extraction with water. Solvent was acidified by adding 0.75% w/v citric acid and extract's final ratio between raw material and solvent was 1:18 w/v. The recovery of polyphenols from the presscake was studied in relation to the extraction time and the volume of the extract produced. It was found to be described by a branch function: in the first minutes the differential recovery increases linearly (wetting stage) while then decreases with kinetics of the form: $y = a \cdot x^{-b}$ ($0 < b < 1$). The point of intersection of the two curves indicates the position of the total maximum. Concentrations of phenolic compounds were determined in the total extract and expressed on a dry presscake basis: 13.2 mg_{GAE}/g polyphenols, 3.67 ± 0.14 mg_{CyE}/g anthocyanins, 1.63 ± 0.08 mg_{ChAE}/g phenolic acids and 1.512 mg_{QRE}/g flavonols. The computational reconstitution of the berry (recovery via juice + recovery via presscake), however, came into conflict with the findings of the first part (extraction of fractions with methanol). There was recorder a significant deficit of phenolic content and especially anthocyanins. The cause was partially investigated by a supplementary extraction of fresh presscake and it was proved that one reason for degradation of the material was the drying performed before.

Finally, a pigment powder with antioxidant properties was produced. For this purpose, the extract was enriched with carrier polymers (wall material) to a final concentration of 30% w/w in total solids (core:wall ratio: 6.2% w/w) and the resulting mixture was spray dried (inlet temperature 140°C, outlet temperature 90-100°C and volumetric flow 4 mL/min). Tests were performed with 2 different wall materials (maltodextrin 17-20 DE and maltodextrin-gum Arabic mixture 4:1), which showed equally high yields in the encapsulation of anthocyanins and total polyphenols (> 88%). In both cases the powders had low humidity (< 2.5 %), within the limits of ensuring microbial stability.

Keywords: black chokeberry, polyphenols extraction, anthocyanins extraction, chokeberry juicing residue, chokeberry presscake, anthocyanins encapsulation, spray drying