

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΜΕ ΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ

Ε. Αντωνοπούλου^{1,*}, Α. Λάζου², Θ. Τσιάκα², Π. Βαρελτζής¹

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

²Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης & Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, ΠΑΔΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(*antoevge@cheng.auth.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των αποβλήτων επεξεργασίας προϊόντων φυσικής προέλευσης καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, καθώς συμβάλλει στη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος, αλλά και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη μελέτη αξιοποίησης αποβλήτων απόσταξης στέμφυλων με μαντζουράνα και δίκταμο. Για την παραγωγή των αποβλήτων των στέμφυλων με τα δύο βότανα πραγματοποιήθηκε απόσταξη σε αποστακτική στήλη. Στη συνέχεια, τα δύο απόβλητα συλλέχθηκαν και ακολούθησε ξήρανση σε ρεύμα αέρα χαμηλής θερμοκρασίας. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους των αποβλήτων, για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών ουσιών, επιλέγοντας ως μεταβλητές της διεργασίας την αναλογία αιθανόλης προς νερό (20 έως 100% v/v), την αναλογία στερεού/διαλύτη (1g/20mL έως 1g/60mL) και τον χρόνο (40 έως 70 min). Η διεργασία της εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε με στατιστικό πειραματικό σχεδιασμό απόκρισης επιφανειών (RSM) τριών επιπέδων. Από τη στατιστική ανάλυση βρέθηκε πως ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης για το απόβλητο στέμφυλων με μαντζουράνα είναι τα 70 min, σε 1g/60mL η αναλογία στερεού/διαλύτη και 50% v/v η αιθανόλη στο μίγμα αιθανόλη/νερό και για το απόβλητο στέμφυλων με δίκταμο 55 min, 1g/60mL η αναλογία στερεού/διαλύτη και 20% v/v η αιθανόλη στο μίγμα αιθανόλη/νερό. Υπό αυτές τις συνθήκες εκχυλίστηκαν 0.5g αποβλήτου με περιεχομένη υγρασία 7% και περίπου 85% ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) και περίπου 25 mg/g φαινολικών ουσιών. Τέλος, στα εκχυλίσματα των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιήθηκε ξήρανση καταιονισμού και προσδιορίστηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού δείγματος.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αντιοξειδωτικές ουσίες, απόβλητα απόσταξης στέμφυλων, δίκταμο, εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, μαντζουράνα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αειφορία στη βιομηχανία των τροφίμων μπορεί να προκύψει από την ανάπτυξη αποδοτικών και βιώσιμων μεθόδων με τη μελέτη και την ανάκτηση αντιοξειδωτικών και φαινολικών ουσιών από απόβλητα στέμφυλων με διάφορα βότανα. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν απόβλητα στέμφυλων με μαντζουράνα (*Origanum majorana*) και δίκταμο (*Origanum dictamnus*), τα οποία αποδείχτηκαν πολύ υποσχόμενες πρώτες ύλες, αφού είναι πλούσιες στους δραστικούς παράγοντες που μελετήθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους αποτελεί μία πολύ αποτελεσματική μέθοδο για την ανάκτηση αντιοξειδωτικών και φαινολικών ουσιών. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση και ο σχεδιασμός της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους (US assisted extraction) των υπολειμμάτων απόσταξης στέμφυλων με βότανα, επιλέγοντας κατάλληλα τις ανεξάρτητες μεταβλητές της διεργασίας (αναλογία αιθανόλης προς νερό, την αναλογία στερεού/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης), ενώ οι αποκρίσεις ήταν η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά και η

αντιοξειδωτική και αντιριζική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων. Ακολούθησε η βελτιστοποίηση της διεργασίας για την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού των παραμέτρων για τη λήψη της μέγιστης ποσότητας φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Τέλος, η συγκεκριμένη εργασία παρέχει στοιχεία και αποδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησης φυτικών αποβλήτων με σκοπό τη δημιουργία καινοτόμων προϊόντων με μεγαλύτερη αξία για το περιβάλλον και την κοινωνία.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την παραγωγή του αποβλήτου πραγματοποιήθηκε απόσταξη των στέμφυλων με τα βότανα σε αποστακτική στήλη 5L και πίεση 2.2 bar. Στη συνέχεια, το απόβλητο συλλέχθηκε, διηθήθηκε και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ξήρανση του ιζήματος σε ξηραντήρα ρεύματος αέρα (40°C). Ο πειραματικός σχεδιασμός (Box-Behnken) της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους περιελάμβανε τις ακόλουθες ανεξάρτητες μεταβλητές της διεργασίας με τρία επίπεδα: αναλογία αιθανόλης προς νερό (20 - 100% v/v), αναλογία στερεού/διαλύτη (1g/20mL - 1g/60mL) και χρόνος (40 - 70 min) και προέκυψαν 15 ανεξάρτητα πειράματα, στα οποία πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις. Οι μετρούμενες αποκρίσεις ήταν η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα και η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Το μαθηματικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των δεδομένων ήταν το πλήρες παραγοντικό της μεθοδολογίας απόκρισης επιφανειών (Response Surface Methodology). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0.05$. Ο πειραματικός σχεδιασμός και η βελτιστοποίηση της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Minitab 20. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους πραγματοποιήθηκε στη συσκευή υπερήχων Bandelin Sonoplus HD 2070 (20 kHz) της εταιρίας BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Germany) που είναι εξοπλισμένη με αισθητήρα (probe) υπερήχων διαμέτρου 6 mm. Μετά την εκχύλιση έγινε φυγοκέντρηση κάθε δείγματος στα 3500 rpm για 15 min και παρελήφθη το εκχύλισμα. Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) έγινε φωτομετρικά στα 765 nm με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η Εκτίμηση της Ικανότητας Δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας (DPPH) έγινε φωτομετρικά στα 517 nm και ο προσδιορισμός της Αναγωγικής Ισχύος έγινε φωτομετρικά στα 595 nm με τη Μέθοδο FRAP. Σε όλες τις αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. (Tsakni et al., 2023, Tsiaka et al., 2023; Vareltzis et al., 2023)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- Εκχυλίσματα αποβλήτων στέμφυλων με μαντζουράνα:

Στον Πίνακα 1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προτύπου των αντιοξειδωτικών και φαινολικών ουσιών συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης, της αναλογίας δείγματος/διαλύτη και της αναλογίας αιθανόλης/νερού.

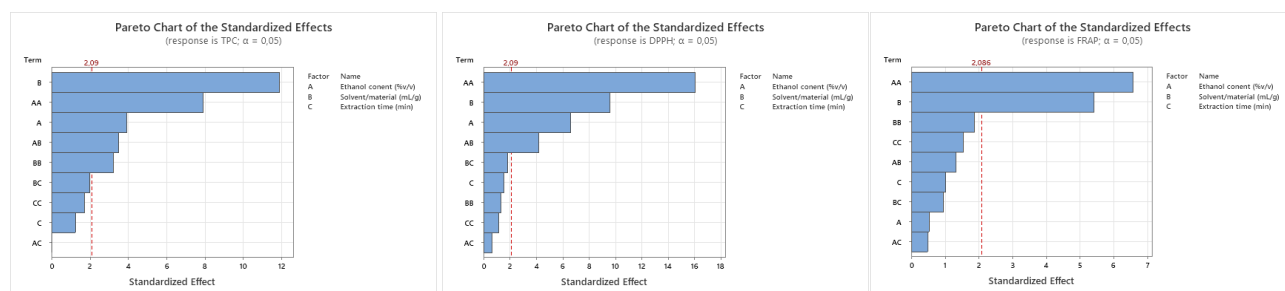
Πίνακας 1. Περίληψη μοντέλου της εκχύλισης της μαντζουράνας.

| | S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|------------|---------|--------|-----------|------------|
| TPC (mg/g) | 1,55139 | 92,44% | 89,04% | 80,78% |

| | | | | |
|-----------------------------|---------|--------|--------|--------|
| DPPH (%) | 4,98562 | 95,53% | 93,52% | 88,58% |
| FRAP (mg Fe(II)/g dry herb) | 46,8554 | 79,88% | 70,82% | 48,49% |

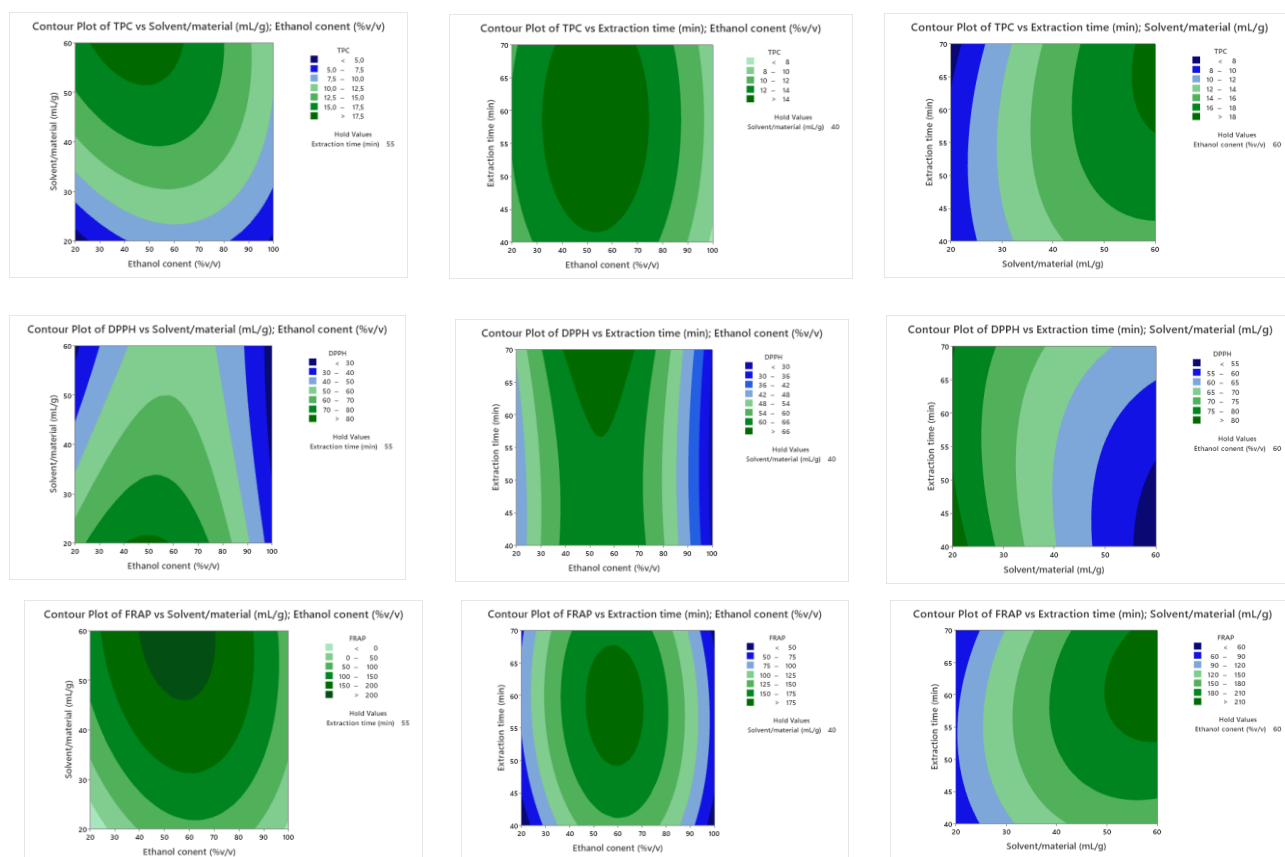
Παρατηρείται, από την τιμή του R²adj (Πίνακας 1), ότι το μαθηματικό πρότυπο περιέγραψε πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα.

Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται τα γραφήματα Pareto για τα TPC, DPPH και FRAP για τα δείγματα της εκχύλισης αποβλήτων στέμφυλων με μαντζουράνα, από τα οποία καταδεικνύεται ότι: για το TPC, DPPH και FRAP οι σημαντικότερες παράμετροι ήταν η αναλογία αιθανόλης/νερού και η αναλογία στερεού/διαλύτη.



Σχήμα 1. Διαγράμματα Pareto των TPC, DPPH και FRAP για τους στατιστικά σημαντικούς παράγοντες κατά την εκχύλιση με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

Επίσης, στο Σχήμα 2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα γραφήματα Contour Plot για το TPC, DPPH και FRAP συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης, της αναλογίας δείγματος/διαλύτη και της αναλογίας αιθανόλης/νερού. Στα παρακάτω γραφήματα, η υψηλότερη απόδοση σε TPC, DPPH και FRAP διακρίνεται με χρωματικό κώδικα σε όσες περιοχές που παρουσιάζουν βαθύτερο πράσινο χρώμα.



Σχήμα 2. Contour Plots για TPC, DPPH και FRAP της εκχύλισης με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα βελτιστοποίησης εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

| | | Βέλτιστες συνθήκες | | | | |
|----|-----------------------------|---------------------------------|----|---------------------------------|--------------|----|
| | | Αναλογία αιθανόλης/νερού (%v/v) | | Αναλογία στερεού/διαλύτη (mL/g) | Χρόνος (min) | |
| 1. | TPC (mg/g) | 45 | | 60 | 70 | |
| 2. | DPPH (%) | 50 | | 20 | 40 | 70 |
| 3. | FRAP (mg Fe(II)/g dry herb) | 55 | 70 | 60 | 60 | 70 |

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Vareltzis et al., 2023) παρατηρήθηκε ότι τα TPC και FRAP αυξάνονταν με τον χρόνο εκχύλισης, ενώ το ποσοστό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μειώθηκε γραμμικά. Στα εκχυλίσματα στέμφυλων με μαντζουράνα παρατηρήθηκε ότι το DPPH δεν επηρεάζεται από τον χρόνο εκχύλισης, ενώ το TPC παρουσίασε μία αύξηση μέχρι κάποιων τιμών του χρόνου εκχύλισης (περίπου 45 έως 65 min) και έπειτα παρατηρήθηκε φθίνουσα τάση. Επίσης, και στο TPC παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση μέχρι κάποιων τιμών του χρόνου εκχύλισης (περίπου 40 έως 65 min) και έπειτα παρατηρήθηκε φθίνουσα τάση.

- Εκχυλίσματα αποβλήτων στέμφυλων με δίκταμο:

Στον Πίνακα 3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προτύπου των αντιοξειδωτικών και φαινολικών ουσιών συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης, της αναλογίας δείγματος/διαλύτη και της αναλογίας αιθανόλης/νερού.

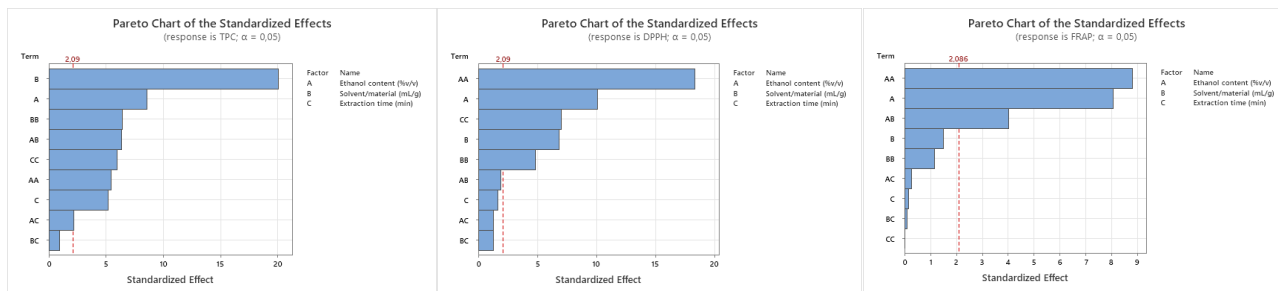
Πίνακας 3. Περιήληψη μοντέλου της εκχύλισης του δίκταμου.

| | S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------------------------|---------|--------|-----------|------------|
| TPC (mg/g) | 1,07855 | 97,06% | 95,74% | 92,48% |
| DPPH (%) | 3,63645 | 96,62% | 95,10% | 91,46% |
| FRAP (mg Fe(II)/g dry herb) | 7,06809 | 89,19% | 84,32% | 72,36% |

Παρατηρείται, από την τιμή του R^2_{adj} (Πίνακας 3), ότι το μαθηματικό πρότυπο περιέγραψε πάρα πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα.

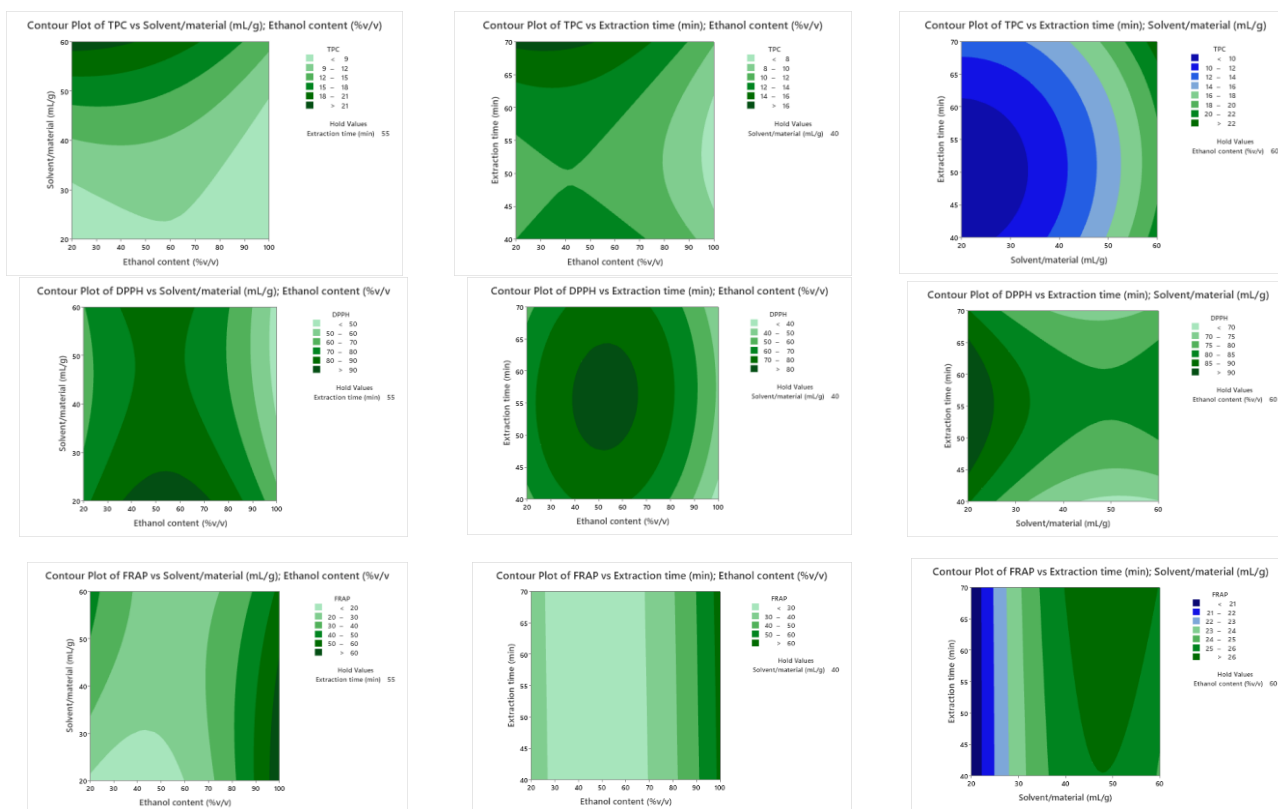
Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται τα γραφήματα Pareto για τα TPC, DPPH και FRAP για τα δείγματα της εκχύλισης αποβλήτων στέμφυλων με δίκταμο, από τα οποία καταδεικνύεται ότι: για το TPC και DPPH και οι τρεις παράμετροι ήταν σημαντικές, ενώ για το FRAP οι σημαντικότερες

παράμετροι ήταν η αναλογία αιθανόλης/νερού και η αναλογία στερεού/διαλύτη.



Σχήμα 3. Διαγράμματα Pareto των TPC, DPPH και FRAP για τους στατιστικά σημαντικούς παράγοντες κατά την εκχύλιση με υπερήχους από δείγματα δίκταμου.

Επιπρόσθετα, στο σχήμα 4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα γραφήματα Contour Plot για το TPC, DPPH και FRAP συναρτήσει του χρόνου της εκχύλισης, της αναλογίας δείγματος/διαλύτη και της αναλογίας αιθανόλης/νερού. Στα παρακάτω γραφήματα, η υψηλότερη απόδοση σε TPC, DPPH και FRAP διακρίνεται με χρωματικό κώδικα σε όσες περιοχές που παρουσιάζουν βαθύτερο πράσινο χρώμα.



Σχήμα 4. Contour Plots για TPC, DPPH και FRAP της εκχύλισης με υπερήχους από δείγματα δίκταμου.

Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα βελτιστοποίησης εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους από δείγματα μαντζουράνας.

| | | Βέλτιστες συνθήκες | | | | | |
|----|-----------------------------|---------------------------------|----|---------------------------------|----|--------------|----|
| | | Αναλογία αιθανόλης/νερού (%v/v) | | Αναλογία στερεού/διαλύτη (mL/g) | | Χρόνος (min) | |
| 1. | TPC (mg/g) | 20 | 60 | 60 | | 70 | 40 |
| 2. | DPPH (%) | 50 | | 20 | 40 | 80 | 95 |
| 3. | FRAP (mg Fe(II)/g dry herb) | 35 | 60 | 20 | 60 | 40 | 70 |

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Vareltzis et al., 2023) παρατηρήθηκε ότι τα TPC και FRAP αυξάνονταν με τον χρόνο εκχύλισης, ενώ το ποσοστό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μειώθηκε γραμμικά. Στα εκχυλίσματα στέμφυλων με δίκταμο παρατηρήθηκε ότι το FRAP δεν επηρεάζεται από τον χρόνο εκχύλισης, ενώ το DPPH παρουσίασε μία σημαντική αύξηση μέχρι κάποια τιμή του χρόνου εκχύλισης (περίπου 60 min) από την οποία και έπειτα παρατηρήθηκε φθίνουσα τάση. Όσον αφορά το TPC παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά τα 55 min.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βαρελτζή Πάτροκλο για την αμέριστη εμπιστοσύνη και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Λάζου Ανδριάνα για την πολύτιμη βοήθειά της, αλλά και για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης & Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων του ΠΑΔΑ. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κ. Τσιάκα Θάλεια για τις συμβουλές και τη στήριξή της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή στήριξή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I., (2013). *Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and marjoram (Origanum majorana L.) extracts. Ind. Crops Prod.* 43, 827–831.
- [2] Tsakni, A., Chatzilazarou, A., Tsakali, E., Tsantes, A., Jan Van Impe, Houhoula, D., 2023. *Separations / Free Full-Text | Identification of Bioactive Compounds in Plant Extracts of Greek Flora and Their Antimicrobial and Antioxidant Activity [WWW Document]. URL https://www.mdpi.com/2297-8739/10/7/373 (accessed 1.30.24).*
- [3] Tsiaka, T., Stavropoulou, N.A., Giannakourou, M.C., Strati, I.F., Sinanoglou, V.J., 2023. *Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction and Characterization of the Phenolic Compounds in Rose Distillation Side Streams Using Spectrophotometric Assays and High-Throughput Analytical Techniques. Molecules* 28, 7403. <https://doi.org/10.3390/molecules28217403>
- [4] Vareltzis, P., Stergiou, A., Kalinderi, K., Chamilaki, M., 2023. *Antioxidant Potential of Spray- and Freeze-Dried Extract from Oregano Processing Wastes, Using an Optimized Ultrasound-Assisted Method. Foods* 12, 2628. <https://doi.org/10.3390/foods12132628>