

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Κ. Παπαγεωργίου¹, Δ. Π. Ζάγκλης, Ι. Διαμαντόπουλος¹, Χ. Παρασκευά^{1,2,*}

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα

²Ιδρυμα Τεχνολογία και Έρευνας/Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ), Σταδίου,
Πλατάνι Αχαΐας, Πάτρα

(*takisp@chemeng.upatras.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα πρώτα στάδια απομόνωσης ουσιών υψηλής προστιθέμενης αξίας από φύλλα ελιάς με απώτερο σκοπό τον σχεδιασμό μονάδας επεξεργασίας αποβλήτων ελαιοτριβείου, η οποία δε θα αφήνει καθόλου οργανικά υπολείμματα. Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των φύλλων είναι η εκχύλιση ουσιών από την βιομάζα σε ένα διαλύτη. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν το είδος και τη σύσταση του διαλύτη, τις συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και την παρουσία οξέος ή βάσης. Η μέθοδος που θα επιλεγεί θα πρέπει να έχει μεγάλη απόδοση σε εκχυλιζόμενες ουσίες και να αφήνει στη στερεή φάση μόνο τα συστατικά της βιομάζας που είναι αδιάλυτα (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη), αλλά να είναι και οικονομική ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα. Από απαλλαγμένη από εκχυλιζόμενες ουσίες βιομάζα μπορεί να παραχθεί καλής ποιότητας καύσιμη ύλη και οι διαλυόμενες ουσίες μπορούν να χωριστούν σε κλάσματα ανάλογα με την χρησιμότητά τους (ουσίες με αντιοξειδωτική ικανότητα, βιοτοξικές/φυτοτοξικές, χρωστικές κ.α.) έτσι ώστε να γίνει πλήρης εκμετάλλευση των αποβλήτων. Η διεργασία μπορεί να επεκταθεί εύκολα και στα υπόλοιπα απόβλητα της βιομηχανίας ελαιόλαδου όπως διφασικό απόβλητο (πυρήνας), απόβλητο πυρηνελαιουργείου (πυρηνόξυλο), τριφασικό απόβλητο (υδατικά απόβλητα ελαιοτριβείου) και κλαδέματα (φύλλα και κλαδιά) που παράγονται κατά την συγκομιδή ελιάς καθώς και τις περιόδους κλαδέματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή ελαιόλαδου είναι μια από τις κυριότερες δραστηριότητες της ελληνικής οικονομίας. Το ελληνικό λάδι είναι από τα πιο διάσημα παγκοσμίως και σήμα κατατεθέν τις υγιεινής μεσογειακής διατροφής. Η βιομηχανία ελαιόλαδου παρ' όλα αυτά δημιουργεί αρκετά απόβλητα με μεγάλο οργανικό φορτίο και τοξικές προς το περιβάλλον ουσίες. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί λύση στο πρόβλημα αυτό παρά μόνο η αλλαγή από τριφασική λειτουργία σε διφασική σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας. Επιπλέον, οι ευρωπαϊκές νομοθεσίες παραμένουν αυστηρές και με τα χρόνια γίνονται ακόμα αυστηρότερες, κάνοντας έτσι αναγκαία την εύρεση μιας ολοκληρωμένης λύσης στο πρόβλημα της διαχείρισης των αποβλήτων της ελιάς. Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια μελέτης του προβλήματος διαχείρισης ενός από τα απόβλητα του ελαιοτριβείου, τα φύλλα ελιάς. Σημαντικό μέρος της διεργασίας για τη βιωσιμότητά της είναι η επιδίωξη κέρδους μέσα από πώληση παραπροϊόντων. Στην περίπτωση των φύλλων ελιάς, τα πλέον πολύτιμα συστατικά είναι φαινολικά μόρια με μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα και ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό (ελαιοευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη κ.α.)^[1] καθώς και μόρια με αυξημένη τοξικότητα προς μικροοργανισμούς (ελενολικό οξύ, άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή). Οι ουσίες αυτές μπορούν να εκχυλιστούν σε κατάλληλο διαλύτη υπό κατάλληλες συνθήκες και με μετέπειτα φυσικοχημικά στάδια να απομονωθούν σε μεγάλη καθαρότητα. Επιπλέον, η βιομάζα που θα απομείνει μπορεί να μετατραπεί σε καύσιμη ύλη. Στην παρούσα εργασία περιλαμβάνονται τα πρώτα στάδια μελέτης της εκχύλισης των φύλλων ελιάς, και μελετώνται παράμετροι όπως το είδος και η ποσότητα του διαλύτη, η προεπεξεργασία των φύλλων για αύξηση της απόδοσης της

εκχύλισης, η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης. Παράγοντες που καθορίζουν την απόδοση είναι η ποσότητα των ολικών φαινολικών (Total Phenolics), η ποσότητα των σακχάρων, η σύσταση στην κυριότερη ουσία (Υδροξυτυροσόλη) και η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρούμενη με τη μέθοδο ORAC^[2]. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποσκοπούν στον καθορισμό κατάλληλων συνθηκών εκχύλισης με προοπτική για κλιμάκωση μεγέθους. Στόχος είναι η συλλογή των απαραίτητων δεδομένων για τον προκαταρκτικό σχεδιασμό μιας μονάδας επεξεργασίας φύλλων ελιάς και τη μετάβαση σε πιλοτική κλίμακα. Οι βέλτιστες συνθήκες της διεργασίας θα καθοριστούν αφού γίνει τεχνοοικονομική μελέτη της μονάδας σε μελλοντική εργασία.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα φυτικά εκχυλίσματα είναι πολύπλοκα μίγματα που περιέχουν διάφορες ομάδες ουσιών που ποικίλουν σε μέγεθος και πολικότητα. Είναι πρακτικά αδύνατο να αναλυθούν όλες αυτές οι ενώσεις και για το λόγο αυτό θα πρέπει να δοθεί βαρύτητα στα κυριότερα συστατικά ή στα συστατικά ενδιαφέροντος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται δύο από τις πιο γνωστές φωτομετρικές μεθόδους, η πρώτη για προσέγγιση ολικών φαινολικών (Total Phenolics) με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu^[3] και η δεύτερη για μέτρηση ολικών σακχάρων με αντιδραστήριο τρυπτοφάνης-βορικού οξέος σε θειικό οξύ^[4]. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη μετρήθηκε με ποσοτικές αναλύσεις HPLC. Επειδή η υδροξυτυροσόλη εμπεριέχεται σε διάφορες ουσίες όπως ελαιοευρωπαϊνή, verbascoside, ισομερή της ελαιοευρωπαϊνης και άλλους γλυκοζίτες, προηγείται της ανάλυσης ένα στάδιο χημικής υδρόλυσης με HCl έτσι ώστε να υπολογίζεται κάθε φορά μόνο η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης^[5]. Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, εφαρμόζεται η μέθοδος ORAC για μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Η ORAC εισέρχεται ως συμπληρωματική της Folin-Ciocalteu και αποσκοπεί στο να προσδώσει παραπάνω κύρος στα αποτελέσματα δεδομένου του ότι η δεύτερη μπορεί να επηρεαστεί και από μη-φαινολικές ουσίες όταν αυτή εφαρμοστεί σε πολύπλοκα δείγματα.

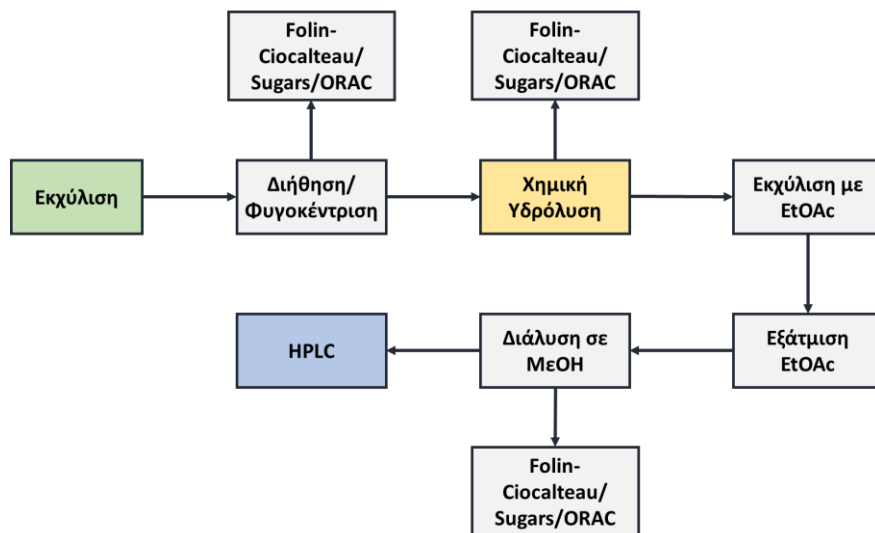
Στόχος είναι να επιλεγεί μια μέθοδος που να έχει μικρό κόστος εξοπλισμού, εγκατάστασης και λειτουργίας αλλά παράλληλα να έχει μεγάλη απόδοση εκχύλισης. Άρα γίνεται προσπάθεια ελαχιστοποίησης του λόγου κόστους-λειτουργίας-και-εγκατάστασης (Ci) προς εκχυλιζόμενη υδροξυτυροσόλη (HTi).

Οι μέθοδοι εκχύλισης που εξετάζονται στην παρούσα εργασία είναι: (1) εκχύλιση με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, (2) εκχύλιση με μίγμα αιθανόλης νερού, (3) εκχύλιση με νερό παρουσία οξέος, (4) εκχύλιση με νερό παρουσία βάσης, (5) εκχύλιση με νερό σε αυξημένες θερμοκρασίες έως 100°C, (6) υδροθερμική κατεργασία σε αυξημένες θερμοκρασίες και πιέσεις^[6], (7) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη και θερμοκρασίας, (8) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη και pH, (9) συνδυασμός επίδρασης διαλύτη, θερμοκρασίας και pH. Για να έχουν οι αναλύσεις HPLC κοινή βάση αλλά και τα εκχυλίσματα να είναι απαλλαγμένα από ιστούς, συστατικά της βιομάζας και πρωτεΐνες πραγματοποιείται εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα έτσι ώστε να εκχυλιστεί η υδροξυτυροσόλη στον οργανικό διαλύτη^[7]. Αφού αποφασιστεί η βέλτιστη μέθοδος εκχύλισης με το μικρότερο κόστος κλιμάκωσης, αυτή θα αναλυθεί περαιτέρω σε επόμενες μελέτες για μεγιστοποίηση της απόδοσης και τελειοποίηση των παραμέτρων της .

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ένας παράγοντας αύξησης της απόδοσης της εκχύλισης είναι η αύξηση της ειδικής επιφάνειας της βιομάζας. Ο διαλύτης θα πρέπει να διεισδύσει στις κυτταρικές δομές και για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει η επιφάνεια επαφής του στερεού με το διαλύτη να είναι μεγάλη. Η αύξηση της ειδικής επιφάνειας επιτυγχάνεται με ξήρανση των φύλλων και θρυμματισμό τους με μηχανή άλεσης σε σωματίδια μικρότερα από 710 μm. Με αυτό το μέγεθος στερεού οι εκχυλίσεις συνήθως ολοκληρώνονται σε λιγότερο από 10 λεπτά αλλά για συνέπεια τα πειράματα διήρκησαν 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 30 λεπτά σε θερμοκρασίες κοντά στο βρασμό και 10 λεπτά στην

περίπτωση της υδροθερμικής κατεργασίας για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι εκχυλίσες έλαβαν χώρα υπό ανάδευση σε όλες τις περιπτώσεις και υπό αναρροή όταν το σύστημα βρισκόταν σε θερμοκρασία βρασμού έτσι ώστε να μην απομακρύνεται ο διαλύτης. Στην περίπτωση υδροθερμικής κατεργασίας το σύστημα ήταν κλειστό, κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα και ικανό να αντέξει θερμοκρασίες έως 350°C και πιέσεις έως 100 bar. Επιπλέον, ο χρόνος του πειράματος ήταν μεγαλύτερος από τον χρόνο εκχύλισης στις συνθήκες πειράματος επειδή το σύστημα απαιτεί κάποιο χρονικό διάστημα μέχρι να φτάσει τις επιθυμητές συνθήκες και επίσης πρέπει να επανέρθει σε συνθήκες περιβάλλοντος πριν έρθει σε επαφή με την ατμόσφαιρα.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση ανάλυση των εκχυλισμάτων

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η μεθοδολογία των πειραμάτων και αναλύσεων για την εύρεση της καλύτερης απόδοσης εκχύλισης με βάση την ποσότητα υδροξυτυροσόλης που εκχυλίζεται. Τα εκχυλίσματα παραλαμβάνονταν από το μίγμα υγρού στερεού με διήθηση από μεταλλικά κόσκινα 63 μm. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν φυγοκέντριση και στο υπερκείμενο διάλυμα εφαρμοζόταν ένα στάδιο υδρόλυσης με HCl 3M για 10 min έτσι ώστε να διασπαστούν οι ενώσεις που μπορεί να περιέχουν υδροξυτυροσόλη στο μόριό τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα έτσι ώστε να ληφθούν τα απλά φαινολικά και αφού αυτός απομακρυνθεί με εξάτμιση υπό κενό, το συμπύκνωμα επαναδιαλυόταν σε μεθανόλη για να αναλυθεί σε HPLC. Η ποσότητα διάλυσης στη μεθανόλη ήταν 1 mg/ml.

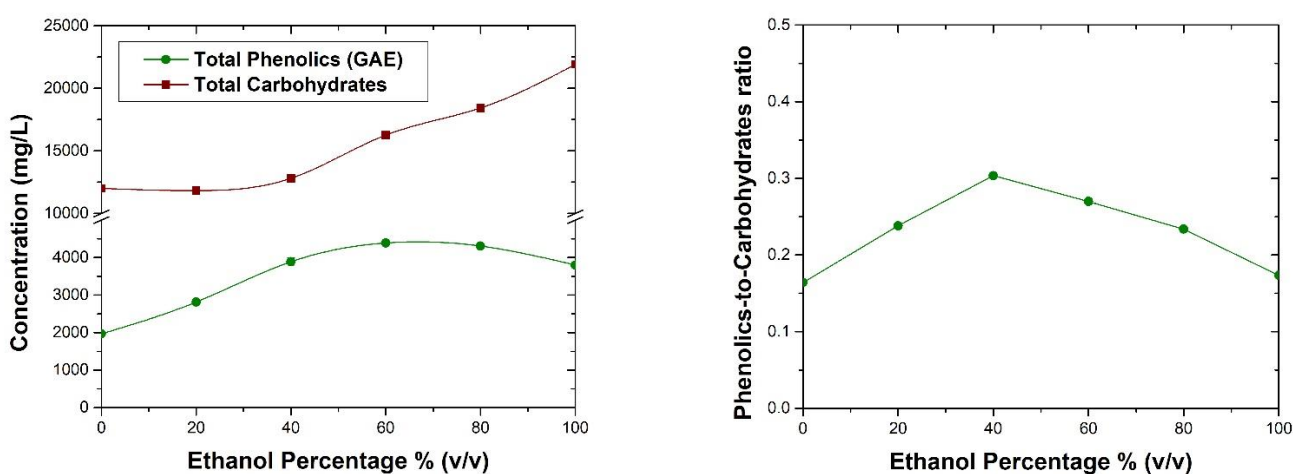
Η ανάλυση HPLC πραγματοποιήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας Prodigy C18 ODS3 100A με διαλύτες 0.1% TFA (A) και Ακετονιτρίλιο (B). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 10% A για 10 min έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός της υδροξυτυροσόλης και να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ευκολία.

Σχετικά με τις μετρήσεις ORAC, Folin-Ciocalteu και ολικών σακχάρων, τα δείγματα μετρούνταν κατευθείαν μετά την εκχύλιση, μετά την υδρόλυση και μετά την εκχύλιση υγρού-υγρού έτσι ώστε να παρατηρηθούν μεταβολές κατά την επεξεργασία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα αναμένεται να δώσουν ικανοποιητικότερες αποδόσεις στις πιο σκληρές συνθήκες (π.χ. υδροθερμική κατεργασία). Αυτή όμως η μέθοδος είναι πολύ κοστοβόρα στο να κλιμακωθεί και πιθανώς μια άλλη με μικρότερη απόδοση να είναι πιο επιθυμητή στο σχεδιασμό μιας συνεχούς και οικονομικής διεργασίας. Επιπλέον, ως αναφερθεί ότι το επόμενο βήμα επεξεργασίας των εκχυλισμάτων σε επόμενη μελέτη θα είναι διαδοχικές διηθήσεις μέσω

μεμβρανών υπερδιήθησης, νανοδιήθησης και αντίστροφης όσμωσης και άρα το εκχύλισμα θα πρέπει να βρίσκεται σε συγκεκριμένη μορφή. Πτητικοί και έφλεκτοι διαλύτες όπως αιθανόλη και μεθανόλη πιθανώς να αυξάνουν πολύ το κόστος της διεργασίας καθώς αν χρησιμοποιούνταν θα έπρεπε ο εξοπλισμός να ήταν σχεδιασμένος με αντικερηκτικές προδιαγραφές και τα υλικά των μεμβρανών ανθεκτικά σε διαλύτες. Επίσης αν θέλαμε να τους απομακρύνουμε πριν τις διηθήσεις θα έπρεπε να δαπανήσουμε μεγάλα ποσά ενέργειας για εξάτμιση και πιθανώς να καταστρέψαμε και μέρος των φαινολικών προς απομόνωση. Άρα, οι συνθήκες που πιθανώς να είναι βέλτιστες για κλιμάκωση δε θα περιέχουν έφλεκτους διαλύτες και θα λειτουργούν σε ανοιχτά συστήματα και ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία και η χρήση οξέος ή βάσης δεν είναι απαγορευτική και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αν αυξάνει αρκετά την απόδοση σε επιθυμητές εκχυλιζόμενες ουσίες. Σε κάθε περίπτωση, θα πραγματοποιηθεί μια προκαταρκτική τεχνοοικονομική μελέτη έτσι ώστε να μπορεί να γίνει μια άμεση σύγκριση των διεργασιών ως προς το κόστος και να μπορέσουμε να καταλήξουμε σε αυτήν με τον ελάχιστο λόγο κόστους προς εκχυλισμένη υδροζυτυροσόλη.



Σχήμα 2. Αριστερά: Μεταβολή εκχυλιζόμενων ουσιών (Ολικά Φαινολικά σε GAE και ολικοί υδατάνθρακες σε ισοδύναμα γλυκόζης) με το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη. Δεξιά: Μεταβολή του λόγου ολικών φαινολικών προς ολικούς υδατάνθρακες με το ποσοστό αιθανόλης στο διαλύτη

Σε προκαταρκτικές μελέτες παρατηρήθηκε η ποσότητα και το είδος των εκχυλιζόμενων ουσιών σε σχέση με την περιεκτικότητα του διαλύματος σε αιθανόλη (Σχήμα 2). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν δύο μεγάλες κατηγορίες ουσιών, τα φαινολικά και τους υδατάνθρακες. Στόχος είναι η εξαγωγή φαινολικών και ο εξευγενισμός τους. Άρα ουσίες όπως μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες πρέπει να αφαιρεθούν σε μετέπειτα στάδια επεξεργασίας. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι αυξάνοντας το ποσοστό της αιθανόλης αυξάνεται η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών καθώς η αιθανόλη προωθεί την διείσδυση του διαλύτη στις κυτταρικές δομές. Σε πρώτο πλάνο είναι δύσκολο να υπάρξει ταυτόχρονα εκλεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες και μεγάλη απόδοση. Αντικείμενο μελλοντικής εργασίας θα αποτελέσει ο “καθαρισμός” των ουσιών αυτών από σάκχαρα, πολυσακχαρίτες και άλλες ανεπιθύμητες ουσίες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μόνο ένα στάδιο στην όλη διεργασία απομόνωσης ουσιών με αντιοξειδωτική ικανότητα και υψηλή προστιθέμενη αξία από απόβλητα ελαιολιτριβείου αλλά είναι αυτό που καθορίζει την αρχική εκχύλιση και άρα όσο βελτιστοποιημένα και να είναι τα επόμενα στάδια δε θα έχουν νόημα αν η απόδοση είναι μικρή στο αρχικό στάδιο. Επιπλέον, η μελέτη επικεντρώθηκε μόνο σε ένα από τα απόβλητα που είναι τα φύλλα ελιάς, αλλά πιστεύεται ότι η διεργασία για τα υπόλοιπα θα ακολουθεί παρόμοια μεθοδολογία και για αυτό θα μελετηθεί σε

μελλοντικά πειράματα. Η διεργασία για τον πυρήνα ελαιτριβείου θα είναι παρόμοια με αυτήν των φύλλων όπως επίσης και για το πυρηνόξυλο από τα πυρηνελαιουργεία με το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζονται επιπλέον στάδιο ξήρανσης. Όσον αφορά το τριφασικό απόβλητο του ελαιτριβείου αυτό θεωρείται ήδη εκχύλισμα και άρα ξεκινά αυτόματα από τα στάδια επεξεργασίας σχετικά με εκχυλίσσεις υγρού-υγρού και διηθήσεις με μεμβράνες υπερδιήθησης και νανοδιήθησης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «INVALOR: Ερευνητική Υποδομή για την Αξιοποίηση Αποβλήτων και Αειφόρου Διαχείρισης Φυσικών Πόρων» (MIS 5002495) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Visioli, F.; Galli, C., Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (10), 4292-4296.
2. Gillespie, K. M.; Chae, J. M.; Ainsworth, E. A., Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* **2007**, *2* (4), 867.
3. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M., [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 1999; Vol. 299, pp 152-178.
4. Josefsson, B.; Uppström, L.; Östling, G. In *Automatic spectrophotometric procedures for the determination of the total amount of dissolved carbohydrates in Sea Water*, Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts, Elsevier: 1972; pp 385-395.
5. Ozkan, M.; Muftuler, F. B.; Kilcar, A. Y.; Medine, E.; Unak, P., Isolation of hydroxytyrosol from olive leaves extract, radioiodination and investigation of bioaffinity using in vivo/in vitro methods. *Radiochimica Acta* **2013**, *101* (9), 585-593.
6. Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A., Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid– solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (23), 6804-6811.
7. De Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R., Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* **2007**, *104* (2), 858-867.