

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΚΑΙ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ ΜΕΣΩ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Α. Δ. Ζεντέλης^{1,2*}, Φ. Ν. Λάμαρη¹, Χ. Α. Παρασκευά^{2,3}

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τ.Κ. 26504, Πάτρα, Ελλάδα

²Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τ.Κ. 26504, Πάτρα, Ελλάδα

³ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, Σταδίου, Πλατάνι Αχαΐας, Τ.Κ. 26504, Πάτρα, Ελλάδα

(*pha2743@upnet.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αύξηση του ενδιαφέροντος για την αξιοποίηση των φυτικών εκχυλισμάτων για την απομόνωση ουσιών με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες, με σκοπό την χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Για την κάλυψη αυτών των αναγκών είναι απαραίτητη η απομόνωση τους σε βιομηχανική κλίμακα. Μια ομάδα τέτοιων φυσικών προϊόντων αποτελούν οι πολυφαινολικές ενώσεις λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας που εμφανίζουν. Σύμφωνα με πλήθος από δημοσιεύσεις, οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προστατεύουν από την εμφάνιση εκφυλιστικών νόσων που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες ενώ αποκαλύπτονται και διαφορετικές βιολογικές τους δράσεις. Υπάρχουν πολλές πηγές απομόνωσης φαινολικών ενώσεων, μερικές από τις οποίες είναι τα σταφύλια (*Vitis vinifera*), οι ελιές (*Olea europaea*), ο καφές (*Coffea arabica*), τα μύρτιλλα (*Vaccinium myrtillus*), κ.ά.. Ειδικότερα, τα στέμφυλα, δηλαδή τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας των σταφυλιών στα οινοποιεία, αποτελούν μια σημαντική πηγή απομόνωσης τέτοιων ενώσεων καθώς στην περιοχή της Μεσογείου υπάρχει πλήθος από εκτάσεις αμπελώνων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση του παραγόμενου από τις βιομηχανίες οινοποίησης παραπροϊόντος με κύριο άξονα την ανάπτυξη διεργασίας ανάκτησης των φαινολικών ενώσεων και εκλεκτικής παραλαβής τους με φυσικοχημικές μεθόδους. Σε αρχικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε παραμετρική μελέτη εκχύλισης στεμφύλων για την εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών παρασκευής εκχυλίσματος, το οποίο θα λειτουργούσε ως ρεύμα τροφοδοσίας κατά την διεργασία διαχωρισμού με την χρήση μεμβρανών. Τελικά το εκχύλισμα και τα επιμέρους συστατικά του κλασματοποιήθηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος χρησιμοποιώντας μεμβράνες νανοδιάχυσης (NF). Σε όλα τα κλάσματα έγινε μέτρηση της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά. Η χρήση των μεμβρανών αύξησε την συγκέντρωση ολικών φαινολών οδηγώντας στην παραλαβή ενός εμπλουτισμένου σε φαινολικά προϊόντος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα στέμφυλα που προκύπτουν κατά την βιομηχανική παραγωγή του οίνου μέσω επεξεργασίας των καρπών διαφορετικών ποικιλιών της αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) αποτελούν ένα είδος παραπροϊόντος με υψηλό οργανικό φορτίο. Οι μεγάλοι όγκοι στεμφύλων που αποτίθενται για βιοαποικοδόμηση, σε συνδυασμό με το υψηλό οργανικό φορτίο που εμπεριέχουν οδηγούν στην εμφάνιση τοξικών επιδράσεων στο περιβάλλον. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία και απαραίτητη η επεξεργασία των στεμφύλων πριν γίνει η διάθεση τους στο περιβάλλον. Η επεξεργασία του συγκεκριμένου βιομηχανικού παραπροϊόντος μέσω διάφορων βιομηχανικών διεργασιών, φιλικών προς το περιβάλλον, μπορεί να αποτελέσει λύση για το σημαντικό πρόβλημα της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Η απομάκρυνση και παραλαβή των οργανικών ενώσεων αποτελεί έναν από τους τρόπους επεξεργασίας ώστε μετέπειτα να γίνει ασφαλής εναπόθεση του παραπροϊόντος αυτού στο περιβάλλον προς βιοαποικοδόμηση. Από το οργανικό φορτίο που παραλαμβάνεται και αφού

επεξεργαστεί κατάλληλα μέσω βιομηχανικών διεργασιών, είναι δυνατή η απομόνωση των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες εν συνεχεία δύναται να χρησιμοποιηθούν τόσο στην φαρμακευτική βιομηχανία όσο και στην βιομηχανία τροφίμων [3].

Όπως είναι γνωστό, οι καρποί της αμπέλου και κυρίως οι κόκκινες ποικιλίες είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες, δηλαδή ενώσεις που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι ενώσεις αυτές λόγω της δομής τους αποτελούν υποστρώματα δράσης δραστικών ελεύθερων ριζών, συνεπώς καθυστερούν ή/και αναστέλλουν την οξειδωση των κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν – θωρακίζουν τον ανθρώπινο οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να προκαλέσει καρδιαγγειακά προβλήματα, καρκίνο και πολλές άλλες σοβαρές ασθένειες. Παράλληλα, έχουν πλειάδα ευεργετικών για την υγεία επιδράσεων οι οποίες υποδεικνύονται από την παραδοσιακή χρήση τους και αναδεικνύονται από τα αποτελέσματα της σύγχρονης έρευνας. Επομένως, τα στέμφυλα αποτελούν μια καινοτόμο πρώτη ύλη απομόνωσης πολυφαινολών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία τροφίμων και στην βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών. Στην πρώτη περίπτωση δύναται να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή βιολειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής, ενώ στην δεύτερη για την παρασκευή φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Είναι εμφανές λοιπόν, για την κάλυψη των αναγκών αυτών απαιτείται η απομόνωση τους σε βιομηχανική κλίμακα [4].

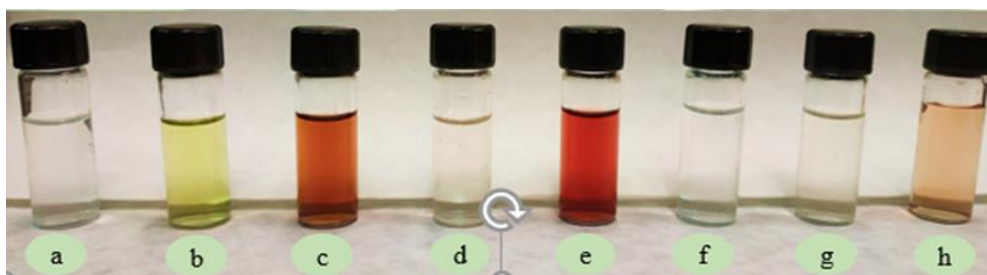
Η χρήση μεμβρανών Υπερδιήθησης (UF) και Νανοδιήθησης (NF) αποτελεί μια αξιοσημείωτη μέθοδο για την κλασματοποίηση και την απομόνωση φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος στεμφύλων, καθώς παρέχει την δυνατότητα διαχωρισμού των ενώσεων του εκχυλίσματος με βάση το μοριακό τους βάρος [1,2].

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η λεπτομερής μελέτη των συνθηκών εκχύλισης και της κλασματοποίησης του εκχυλίσματος μέσω διάταξης μεμβρανών νανοδιήθησης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Παραμετρική μελέτη συνθηκών εκχύλισης

Το αρχικό στάδιο της πειραματικής πορείας αφορούσε την μελέτη ανάκτησης TPC με βάση τις συνθήκες εκχύλισης, ώστε να επιλεγεί μια κατάλληλη και οικονομική μέθοδος. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν για μελέτη είναι οι εξής: νερό, αιθανόλη, ακετόνη και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), καθώς αποτελούν σχετικά “πράσινους” διαλύτες λόγω της χαμηλότερης τοξικότητας και επιβάρυνσης στο περιβάλλον σε σχέση με άλλους διαλύτες (Σχήμα 1)[6]. Οι μεταβλητές που μελετήθηκαν αφορούσαν i) το είδος του διαλύτη, ii) τον λόγο ξηρής μάζας στεμφύλων/όγκο διαλύτη (w/v), iii) τον χρόνο εκχύλισης, iv) το pH και v) την παρουσία NaCl σε διαφορετικές συγκεντρώσεις [5].



Σχήμα 1. Εκχυλίσματα: νερό 100 % (a), αιθανόλη 100 % (b), αιθανόλη 50 % (c), ακετόνη 100 % (d), ακετόνη 50 % (e), οξικός αιθυλεστέρας 100% (f), οξικός αιθυλεστέρας 50% (g), PEG 50 % (h)

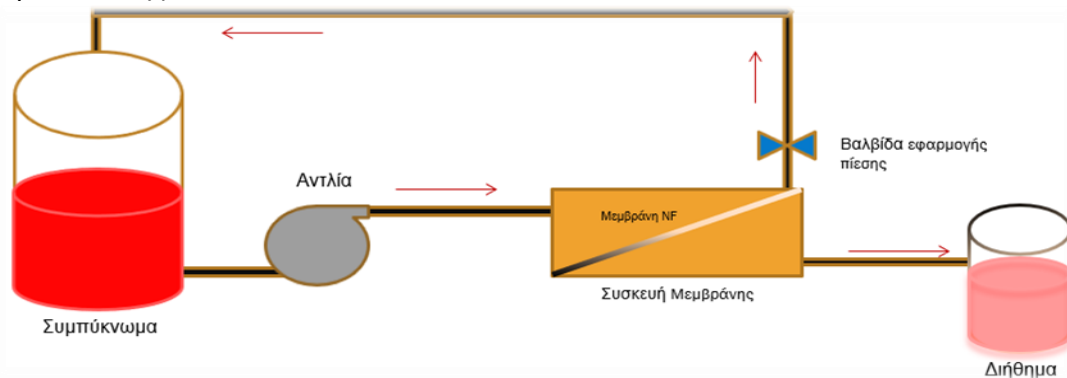
Σε κάθε πειραματική πορεία εκχύλισης το παραλαμβανόμενο εκχύλισμα αρχικά διηθούταν διαδοχικά με την βοήθεια κοσκίνων μεγέθους πόρων 2.00mm, 1.46mm και 125μm, έπειτα υπό κενό με χρήση φίλτρων μεγέθους πόρων 8μm και τέλος με φυγοκέντρηση, έτσι ώστε να απομακρυνθούν εντελώς τα στερεά σωματίδια και να γίνει παραλαβή του εκχυλίσματος κατάλληλο για μέτρηση .

2. Εκχύλιση στερεού

Οι συνθήκες εκχύλισης που επιλέχτηκαν ήταν: Διαλύτης αιθανόλη 50% v/v, αναλογία στεμφύλων/οργανικού διαλύτη: 1/2, θερμοκρασία διεξαγωγής της εκχύλισης (25°C), χρόνος ανάδευσης (60min). Σε αυτές τις συνθήκες 12.5kg στέμφυλα εκχυλίστηκαν με 25 L διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση για 60min. Μετά το πέρας των 60min, το εκχύλισμα διηθήθηκε και ο τελικός παραλαμβανόμενος όγκος εκχυλίσματος ανερχόταν στα 7 L.

3. Διήθηση εκχυλίσματος με χρήση μεμβρανών

Το επόμενο στάδιο της διεργασίας αφορούσε την κλασματοποίηση του εκχυλίσματος με βάση το μοριακό βάρος των συστατικών του χρησιμοποιώντας μεμβράνες Νανοδιήθησης NF 45 με MWCO 500 (Molecular Weight Cut-Off 500) και NFX με MWCO 150-300. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από το δοχείο που περιέχει το προς συμπύκνωση διάλυμα, μια περισταλτική αντλία, την συσκευή μεμβράνης στην οποία τοποθετείται η μεμβράνη και ένα δοχείο συλλογής του διηθήματος. Η περισταλτική αντλία αντλεί το προς συμπύκνωση διάλυμα από το δοχείο και το ωθεί με πίεση προς την συσκευή της μεμβράνης (Σχήμα 2). Εφαρμόζοντας διαφορά πίεσης στην συσκευή (10bar), μόρια με μικρότερο μοριακό βάρος από το MWCO της μεμβράνης διέρχονται και συλλέγονται στο δοχείο συλλογής του διηθήματος, ενώ όσα είναι μεγαλύτερα επιστρέφουν πίσω στο δοχείο συμπύκνωσης.

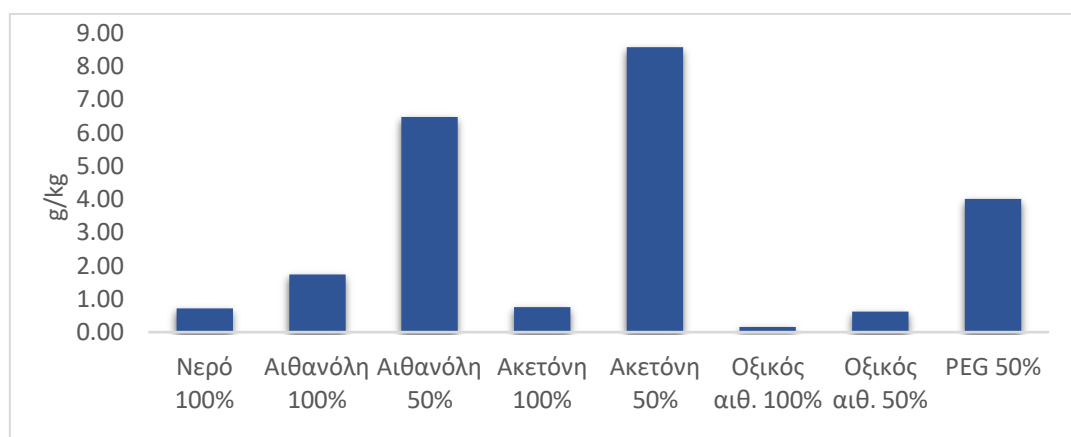


Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση διάταξης μεμβρανών NF

Το εκχύλισμα (7 L) διηθήθηκε πρώτα μέσω της μεμβράνης NF 45. Η όλη διαδικασία τερματίστηκε όταν ο όγκος στο δοχείο συμπύκνωσης έφτασε τα 3 L και ο όγκος στο δοχείο συλλογής του διηθήματος τα 4 L. Εν συνεχεία τα 4 L διηθήθηκαν μέσω της μεμβράνης NFX, και η διαδικασία ολοκληρώθηκε όταν ο όγκος στο δοχείο συμπύκνωσης έφτασε το 1.5 L και ο όγκος στο δοχείο συλλογής του διηθήματος τα 2.5 L [2].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε κάθε διεργασία γινόταν λήψη δείγματος και διεξαγόταν ποσοτικός προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic content, TPC) με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μεγαλύτερη εκχυλισσιμότητα ολικών φαινολικών επετεύχθη με την χρήση ακετόνης 50% (8.563g TPC/kg DM στεμφύλων). Ακολουθούν η αιθανόλη 50% και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) 50% με τιμές 6.46g/kg και 4g/kg, αντίστοιχα. Τις χαμηλότερες τιμές ολικών φαινολικών έδωσαν οι εκχυλίσεις με χρήση οξικού αιθυλεστέρα 100% (0.161g/kg), οξικού αιθυλεστέρα 50% (0.619g/kg) και νερού 100% με 0.71g/kg. Η χρήση αιθανόλης 100% παρουσίασε ενδιάμεση απόδοση εκχύλισης ολικών φαινολικών (1.73g/kg), η τιμή της οποίας είναι αρκετά μικρότερη αυτή της εκχύλισης με αιθανόλη 50% (Σχήμα 3).



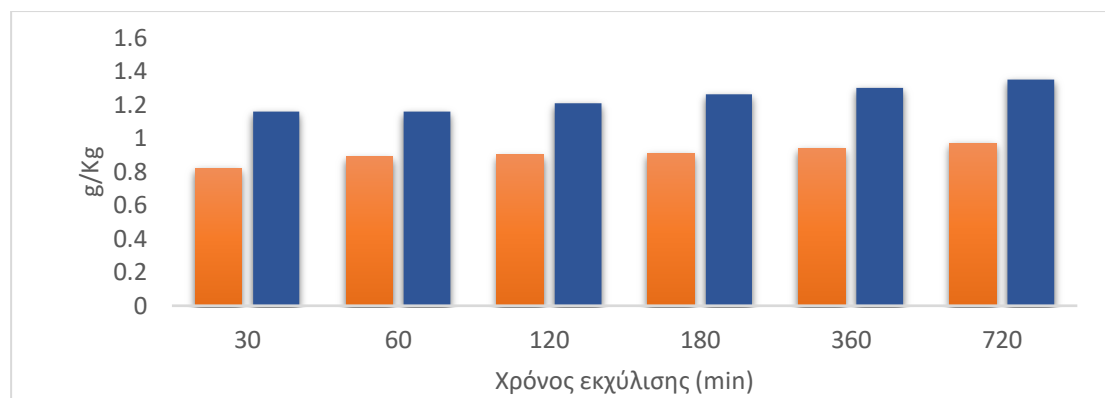
Σχήμα 3. Τιμές ολικών φαινολικών (TPC) g/kg μετά από εκχύλιση 30g ξηρής μάζας στεμφύλων σε 300mL διαλύτη (λόγος 1/10 w/v) σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 60min

Πίνακας 1. Επίδραση διαφορετικών λόγων εκχυλιζόμενης ουσίας και διαλύτη. Τιμές TPC εκχυίσματος μετά από εκχύλιση 30g ξηρής μάζας στεμφύλων σε διαφορετικούς όγκους διαλύτη νερό για 60min

Λόγος (w/v)	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (g/kg)
1/5	0.68
1/10	0.85
1/15	1.02
1/20	1.05

Πίνακας 2. Επίδραση διαφορετικής τιμής pH. Τιμές TPC εκχυίσματος μετά από εκχύλιση 30g ξηρής μάζας στεμφύλων σε 300mL διαλύτη, με λόγο 1/10 w/v για 60min

Συγκέντρωση	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (g/kg)
0.1 N HCl	1.15
0.5 N HCl	1.69
1 N HCl	1.45
0.1 N NaOH	2.30



Σχήμα 4. Επίδραση χρόνου εκχύλισης. Τιμές TPC g/kg μετά από εκχύλιση 30g ξηρής μάζας στεμφύλων σε 300 mL νερό (πορτοκαλί) και 0.1% HCl (μπλέ), λόγος 1/10 w/v, σε διαφορετικούς χρόνους

Πίνακας 3. Επίδραση άλατος στην εκχυλισιμότητα. Τιμές ολικών φαινολών (TP) g/kg μετά από εκχύλιση 30g ξηρής μάζας στεμφύλων σε 300 mL νερό, λόγος 1/10 w/v για 60min παρουσία άλατος

Συγκέντρωση NaCl	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (g/kg)
1N	0.82
3N	0.65
6.2N	0.53

Λαμβάνοντας υπόψη το κόστος, τις ποσότητες διαλυτών που απαιτούνται καθώς και τις τιμές ανάκτησης του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic content, TPC) ανά κιλό ξηρής μάζας στεμφύλων (Dry Mass, DM) (TPC: g/kg DM) επιλέχθηκε η χρήση αιθανόλης 50% ως μέσο εκχύλισης σε αναλογία 1/10, w/v, παρά την μειωμένη ανάκτηση TPC σε σύγκριση με άλλες συνθήκες εκχύλισης. Σε αυτές τις συνθήκες η συγκέντρωση TPC ανερχόταν σε 0.461g/L^{-1} . Στον πίνακα 4 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών του συμπυκνώματος και διηθήματος κατά την διαδικασία διήθησης μέσω μεμβρανών NF45, NFX καθώς και μετά την περαιτέρω συμπύκνωσή του μέσω Rotary Evaporator. Οι περισσότεροι σύνθετες, μεγάλου μοριακού βάρους φαινόλες κατακρατούνταν στο συμπύκνωμα της NF45, η οποία είχε μεγαλύτερο MWCO απ' ότι η NFX. Ως τελικό στάδιο επεξεργασίας εφαρμόστηκε το στάδιο της NFX, όπου το διήθημα της NF45 χρησιμοποιούταν ως ρεύμα τροφοδοσίας. Οι περισσότερες απλές φαινολικές ενώσεις διαχωρίζονταν στο συμπύκνωμα της NFX ενώ το τελικό διήθημα της μεμβράνης αυτής ήταν σχεδόν απαλλαγμένο από το φαινολικό κλάσμα. Το συμπυκνωμένο διάλυμα της NF45, στο οποίο επιτεύχθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό συμπύκνωσης φαινολών, συμπυκνώθηκε περαιτέρω με απόσταξη υπό κενό με απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και ένα μεγάλο ποσοστό νερού. Τα τελικά ποσοστά συμπύκνωσης μετρήθηκαν στα 7.94 g/l για τα φαινολικά.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις ολικών φαινολών συμπυκνώματος (*retentate*) και διηθήματος (*permeate*) κατά την διαδικασία διήθησης με μεμβράνες NF45 και NFX

Δείγμα	Όγκος δια/τος (L)	Ολικά φαινολικά (gL ⁻¹)
Αρχικό δείγμα (εκχύλισμα)	7	0.461 ± 0.042
NF 45 ret	3	0.791 ± 0.029
NF 45 per	4	0.164 ± 0.041
NFX ret	1.5	0.233 ± 0.008
NFX per	2.5	0.073 ± 0.011
Συμπύκνωμα NF 45 ret	0.2	7.939 ± 0.559

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αποτελεσματική διαχείριση του παραγόμενου στερεού παραπροϊόντος οινοποίησης με ταυτόχρονη διερεύνηση δυνατότητας ανάκτησης δραστικών ενώσεων (π.χ. πολυφαινόλες), οι οποίες περιέχονται σε αυτό. Η χρήση του κατάλληλου διαλύτη ως μέσο εκχύλισης καθόρισε την αρχική σύσταση του εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά. Τα υδατικά διαλύματα των οργανικών διαλυτών ακετόνης, αιθανόλης και πολυαιθυλενογλυκόλης αποτέλεσαν τους αποδοτικότερους διαλύτες εκχύλισης φαινολικών ενώσεων ενώ η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες χωρίς την παρουσία νερού δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική. Συνεπώς η χρήση υδατικής φάσης στο αρχικό στάδιο παραλαβής φαινολικών ενώσεων κρίνεται επιτακτική. Η περαιτέρω διεργασία διήθησης με μεμβράνες NF λειτούργησε αποτελεσματικά για την κλασματοποίηση των ενώσεων αλκοολικού εκχυλίσματος. Η επιπλέον απομάκρυνση του οργανικού και εν μέρει του υδατικού διαλύτη οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολών και την παραλαβή ενός συμπυκνωμένου πλούσιου σε φαινολικά διάλυμα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της Πράξης «ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ (ΠΕΡΑΝ)» με κωδικό ΟΠΣ 5002358, η οποία έχει ενταχθεί στη Δράση «Στρατηγική Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων» του Επιχειρησιακού Προγράμματος Επιχειρηματικότητα Ανταγωνιστικότητα και Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) που χρηματοδοτείται από την ΣΑΕ1451 με κωδικό πράξης ΣΑ (ενάριθμο)2017ΣΕ14510002 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ). Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς τον οινοποιό κ. Νικόλαο Καρέλα για τις πολύτιμες συμβουλές καθώς και για την προμήθεια της πρώτης ύλης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Kontos SS, Koutsoukos PG, Paraskeva CA. (2014). Chemical Engineering Journal, 251(0):319-328.
- [2] Zagklis DP, Paraskeva CA. (2015). Separation and Purification Technology, 156:328-335
- [3] Vatai, T., Skerget, M., Knez, Z., 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents. J. Food Eng. 90 (2), 246–254.
- [4] Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresource Technology, 87, 41–44.
- [5] Spigno, G., Tramelli, L., Marco de Faveri, D., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 81 (11), 200–208
- [6] Andy Connolly, 2016, Going Green – Solvents