



ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ
ΕΝΩΣΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ



24-26
ΝΟΕ/ΝΟΒ
ΜΕC
ΠΑΙΑΝΙΑ/ΡΕΑΝΙΑ



ΜΑΙCΗΑΝΙΑ



Εξαιρετικά αποδοτική εκχύλιση πολυφαινολών από φύλλα ελιάς (*Olea europaea*) με βαθέως εύτηκτο διαλύτη χρησιμοποιώντας μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη

Β. Αθανασιάδης^{1,3}, Σ. Γρηγοράκης², Σ. Λαλάς³, Δ. Μακρής¹

¹Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου

²Ποιότητα Τροφίμων & Χημεία Φυσικών Προϊόντων., Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ.), Διακρατικό Κέντρο Ανωτάτων Μεσογειακών Γεωπονικών Σπουδών

³Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

Εισαγωγή

➤ Προϊόντα ελαιοκομίας:

- Ελιές
- Ελαιόλαδο
- Φύλλα ελιάς



Γράφημα 1. Καλλιέργεια ελαιόδεντρων (*Olea europaea* L.) στην περιοχή της Μεσογείου.

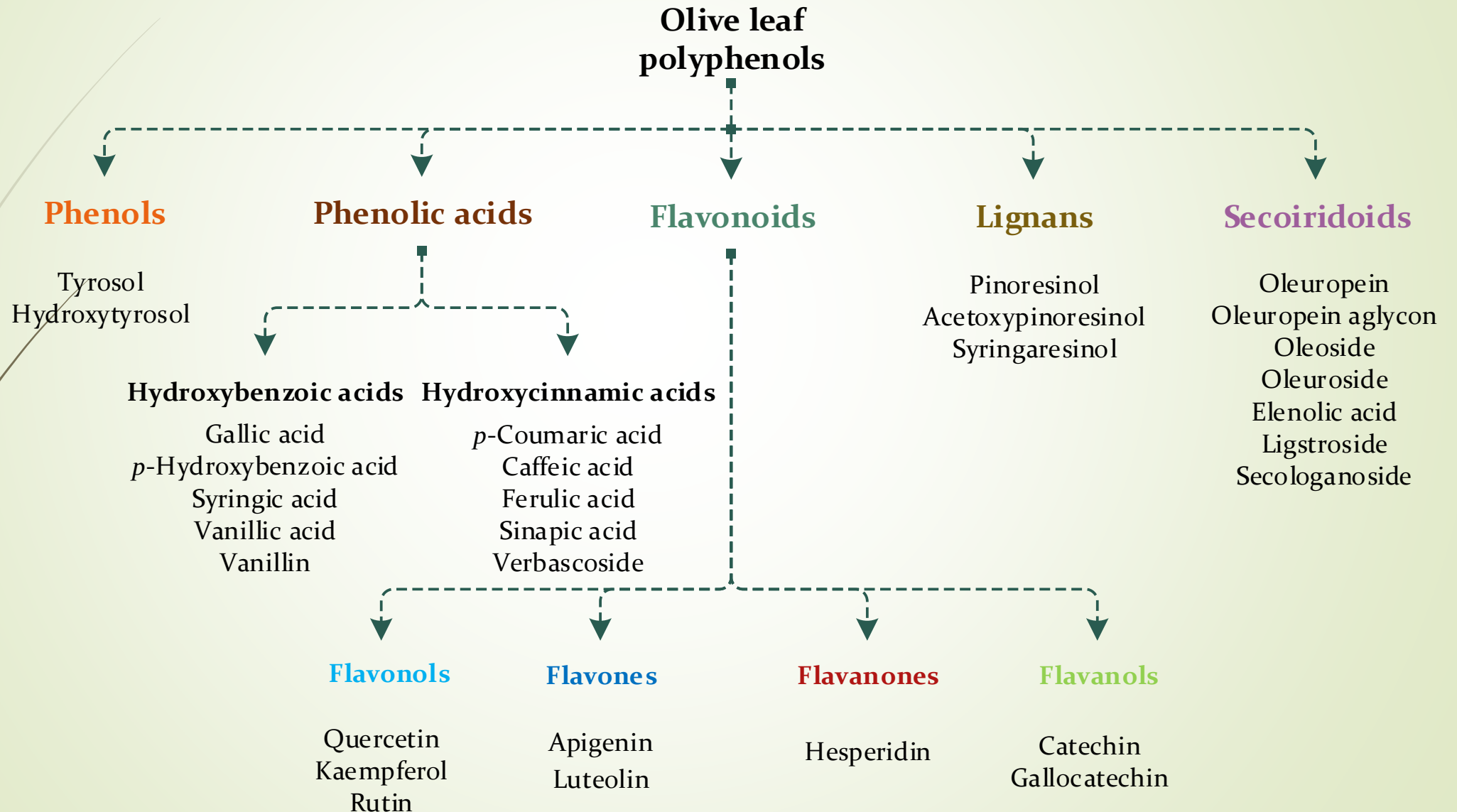


Γράφημα 2. Προϊόντα ελαιοκομίας.

Τα φύλλα της ελιάς

- Τα φύλλα *Olea europaea* είναι ένα σημαντικό υποπροϊόν στην παραγωγή του ελαιολάδου και παρουσιάζουν διάφορα πιθανά αντιοξειδωτικά μόρια, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των φυτοχημικών ουσιών, τις **πολυφαινόλες**.
- Οι κύριες κατηγορίες πολυφαινολών που βρίσκονται στα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς είναι:
 - **σεκοϊριδοειδή** (π.χ. ελευρωπαΐνη, λιγκστροσίδη, ολεοσίδη, κτλ),
 - διάφορα **φλαβονοειδή** (π.χ. απιγενίνη, λουτεολίνη, κερσετίνη, κτλ),
 - **φαινολικά οξέα** (π.χ. καφεϊκό, φερουλικό, βανιλλικό, κτλ),
 - απλές **φαινόλες** (π.χ. υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη) καθώς και
 - **λιγνάνες** (π.χ. πινορεσινόλη, κτλ).

Πολυφαινόλες φύλλων ελιάς



Ποιότητα φύλλων ελιάς

- Η πολυφαινολική σύνθεση των φύλλων ελιάς ποικίλλει ανάλογα με:
 - την ποικιλία της ελιάς,
 - την εποχή της συγκομιδής,
 - την καλλιεργητική ζώνη,
 - τις αγρονομικές πρακτικές,
 - την ηλικία των δέντρων,
 - την ωριμότητα των φύλλων και
 - τις συνθήκες αποθήκευσης.

Γράφημα 3. Το δέντρο της ελιάς.



Βιολογική δραστικότητα των φύλλων ελιάς και οφέλη για την υγεία

- Οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς έχουν πολλές αναφερθείσες φαρμακολογικές επιδράσεις οι οποίες υποδηλώνουν υψηλό δυναμικό για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών και την προαγωγή της ανθρώπινης υγείας.

European Medicines Agency (2011)
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)
Assessment report on *Olea europaea* L., folium



Εφαρμογές φύλλων ελιάς σε βιομηχανίες τροφίμων & ποτών

- Στη βιομηχανία τροφίμων & ποτών υπάρχουν:
 - Ζωοτροφές με φύλλα ελιάς.
 - Εμπλουτισμένες επιτραπέζιες ελιές με πολυφαινόλες από φύλλα ελιάς.
 - Εμπλουτισμένα έλαια με φύλλα ελιάς.
 - Αποξηραμένα φύλλα ελιάς για ρόφημα.



Εφαρμογές φύλλων ελιάς σε βιομηχανίες καλλυντικών

- Στη βιομηχανία καλλυντικών υπάρχουν:
 - Καλλυντικά και προϊόντα ομορφιάς με φύλλα ελιάς (π.χ. σαμπουάν, σαπούνια, κρέμες προσώπου και σώματος, κτλ).



Εφαρμογές φύλλων ελιάς σε βιομηχανίες φαρμάκων

- Στη βιομηχανία φαρμάκων υπάρχουν:
 - Φαρμακευτικά προϊόντα και συμπληρώματα διατροφής με φύλλα ελιάς (π.χ. εκχυλίσματα, κάψουλες, παστίλιες, σπρέι για τις ρινικές κοιλότητες, κτλ).





Φύλλα ελιάς: Ένα φυσικό πρόσθετο

- Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν μια φθηνή πρώτη ύλη και θεωρούνται ένα φυσικό πρόσθετο διότι:
 - περιέχουν **πολυφαινόλες** (π.χ. ελευρωπαΐνη, απιγενίνη, λουτεολίνη, κτλ),
 - έχουν εξαιρετικές **βιολογικές ιδιότητες** και οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (π.χ. αντικαρκινικές, καρδιαγγειακές, αντιδιαβητικές, κτλ),
 - είναι χρήσιμη **πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας** που συμβάλλουν στην **παραγωγή θρεπτικών και λειτουργικών προϊόντων** (π.χ. συμπληρώματα διατροφής, τρόφιμα, ποτά, καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα και ζωοτροφές).



Παράγοντες μεθόδου εκχύλισης

- Η ποιοτική και ποσοτική πολυφαινολική σύνθεση των φύλλων ελιάς εξαρτάται και από τη μέθοδο εκχύλισης και τις συνθήκες της όπως:
 - τον τύπο του διαλύτη,
 - το pH,
 - τη θερμοκρασία,
 - τον αριθμό των σταδίων εκχύλισης,
 - τον χρόνο της εκχύλισης,
 - την αναλογία υγρού προς στερεό και
 - το μέγεθος σωματιδίων του δείγματος.



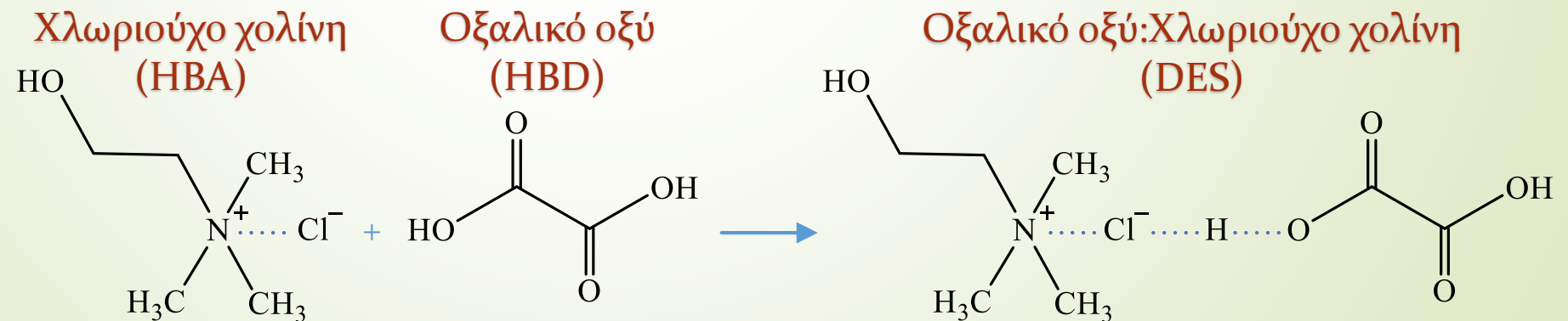
Ιδανικός διαλύτης

■ Ένας ιδανικός διαλύτης πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ χαμηλή πίεση ατμών,
- ✓ υψηλή θερμική σταθερότητα,
- ✓ μη ευφλεκτότητα,
- ✓ υψηλή ικανότητα διαλύσεως,
- ✓ χημική σταθερότητα,
- ✓ χαμηλή μεταβλητότητα,
- ✓ ευκολία μετρήσεως,
- ✓ μη τοξικότητα,
- ✓ βιοαποικοδομησιμότητα,
- ✓ βιωσιμότητα και
- ✓ χαμηλό κόστος.

Βαθέως εύτηκτοι διαλύτες

- Οι βαθέως εύτηκτοι διαλύτες ή αλλιώς DES (deep eutectic solvents) είναι ιδανικοί διαλύτες διότι τα χαρακτηριστικά τους είναι όμοια με αυτών.
- Οι διαλύτες DES αποτελούν μια καινοτόμο κατηγορία φιλικών προς το περιβάλλον υγρών που αποτελούνται από **βιομόρια**, όπως:
 - μια **πολυόλη** (π.χ. γλυκερόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, L-γαλακτικό οξύ, οξαλικό οξύ, αιθυλενογλυκόλη, κτλ) που χρησιμεύει ως δότης δεσμού υδρογόνου (HBD) και
 - ένα **οργανικό άλας** (π.χ. χλωριούχο χολίνη, γλυκίνη, L-αλανίνη, οξικό νάτριο, οξικό αμμώνιο, κιτρικό τρινάτριο, κτλ), ως δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA).



Γράφημα 4. Παράδειγμα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου ανάμεσα σε βιομόρια.

Παρασκευή του βαθέως εύτηκτου διαλύτη (DES)

- Η γλυκερίνη (ως δότης δεσμού υδρογόνου, HBD) αναμίχθηκε με γλυκίνη (ως δέκτης δεσμού υδρογόνου, HBA) και νερό σε μοριακή αναλογία 7:1:3.
- Το μίγμα θερμάνθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο σφραγισμένο στους 80-90°C για περίπου 90 λεπτά, υπό ανάδευση, μέχρις ότου σχηματίστηκε ένα τέλεια διαφανές υγρό.



Γράφημα 5. Μόριο γλυκερίνης (HBD) και γλυκίνης (HBA).

Δείγμα φύλλων ελιάς

- Τα φύλλα ελιάς (*Olea europaea*) προέρχονταν από την ποικιλία **Αγριελιά Καλαμών**, και συλλέχτηκαν από φυτεία ελιάς που βρίσκεται στην περιοχή της Αυλίδας (Εύβοια, Στερεά Ελλάδα).



Γράφημα 6. Περιοχή της Αυλίδας.

Επεξεργασία δείγματος



- Προκειμένου να ληφθεί μια ομοιόμορφη ποσότητα φύλλων, τα φύλλα ελιάς συλλέχθηκαν από διάφορα γειτονικά ελαιόδεντρα και από διαφορετικά μέρη κάθε δέντρου, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της έκθεσης στον ήλιο και οι διαφορές που σχετίζονται με διαφορετικά στάδια ωρίμανσης.
- Μετά τη συλλογή, τα φύλλα της ελιάς μεταφέρθηκαν άμεσα στο Εργαστήριο Ενόργανης Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων (ΤΕΙ Θεσσαλίας), συλλέχθηκαν τυχαία και ξηράθηκαν στον αέρα του εργαστηρίου.
- Τα αποξηραμένα και κονιοποιημένα φύλλα ελιάς είχαν μέση διάμετρο σωματιδίων 0,5 mm.

Φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί

- Ολική απόδοση πολυφαινολών (Y_{TP}) – Μέθοδος Folin-Ciocalteu
- Ολική απόδοση φλαβονοειδών (Y_{TFn}) – Μέθοδος Τριχλωριούχου Αργιλίου (ATC)
- Αναγωγική ισχύς (P_R) – Μέθοδος FRAP
- Ικανότητα απόσβεσης ελευθέρων ριζών (A_{AR}) – Μέθοδος DPPH

Γράφημα 7. Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-Vis).



Χρωματογραφική ανάλυση

- Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μια υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και ένα φασματόμετρο μάζας (LC-DAD-MS).
- Ο ανιχνευτής MS χρησιμοποιήθηκε με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI) σε κατάσταση θετικού ιόντος.
- Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια Fortis RP-18.
- Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν με ροή 0,2 mL/min ήταν (A) 1% Οξικό οξύ και (B) Μεθανόλη.



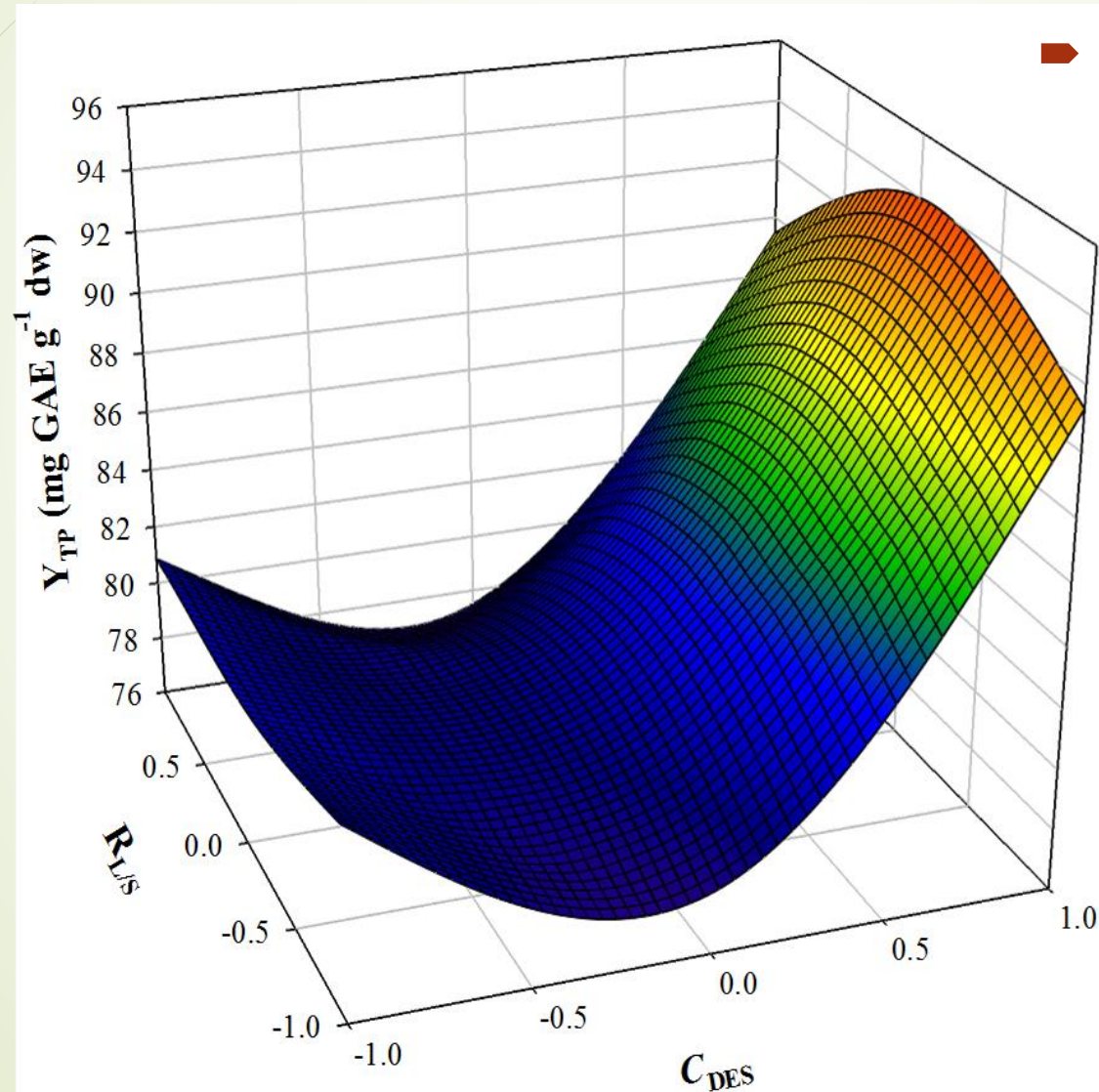
Γράφημα 8. Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και ένα φασματόμετρο μάζας (LC-DAD-MS).

Στατιστική ανάλυση

- Οι εκχυλίσες επαναλήφθηκαν τουλάχιστον δύο φορές και όλοι οι προσδιορισμοί τουλάχιστον εις τριπλούν.
- Οι αναφερόμενες τιμές είναι οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις.
- Γραμμικές και μη γραμμικές παλινδρομήσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SigmaPlot® 12.0.
- Ο κεντρικός σύνθετος πειραματικός σχεδιασμός και όλες οι σχετικές στατιστικές πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα JMP® 10.



Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης



■ Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στους 50°C, υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, για 120 min.

■ $C_{DES} = 80\%$ (w/v),

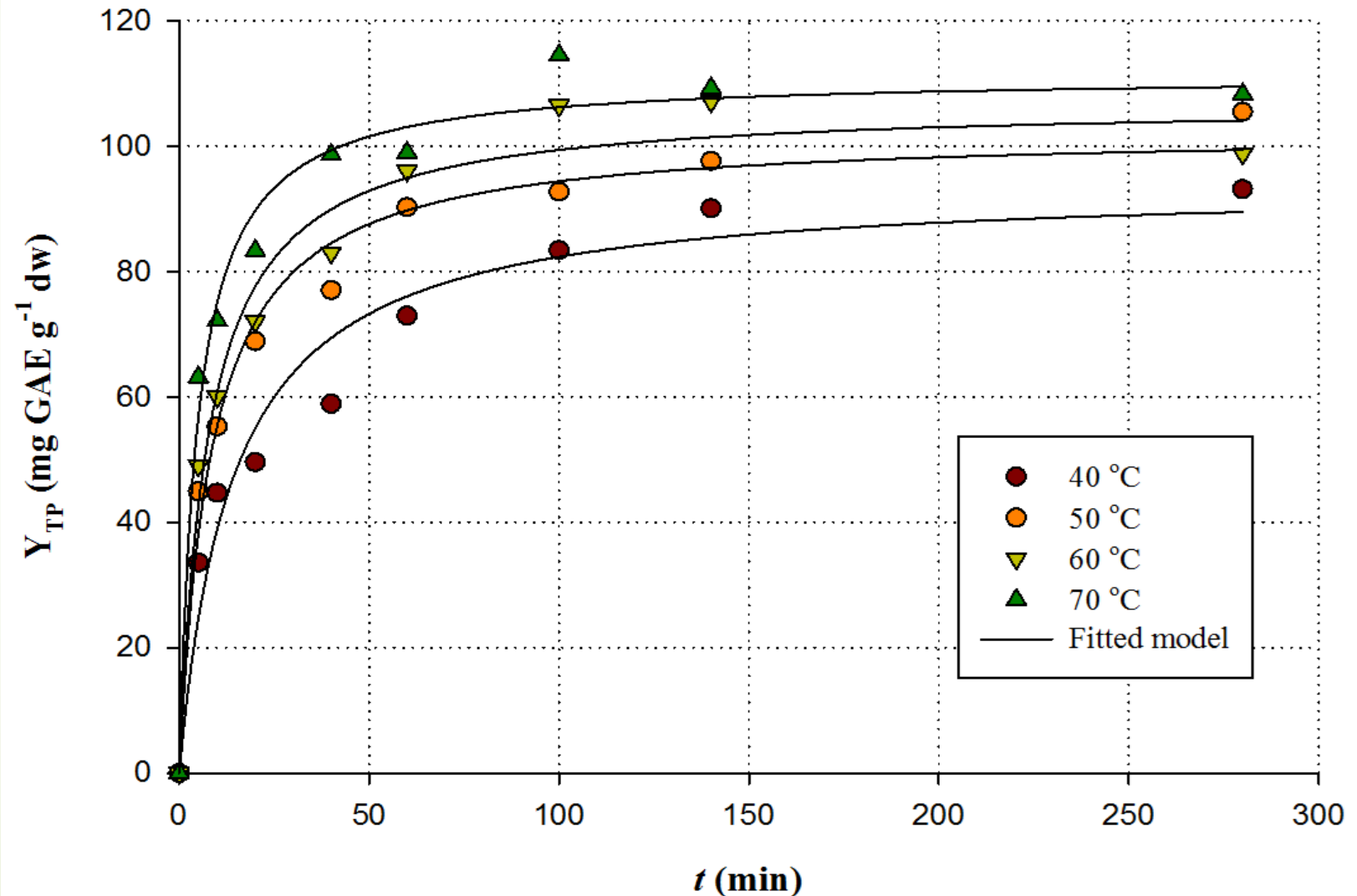
■ $R_{L/S} = 32$ mL/g,

■ $Y_{TP} = 92,94 \pm 3,15$ mg GAE/g dw.

Γράφημα 9. 3D γραφική απεικόνιση του αποτελέσματος της ταυτόχρονης μεταβολής των C_{DES} και $R_{L/S}$ στην Y_{TP} .

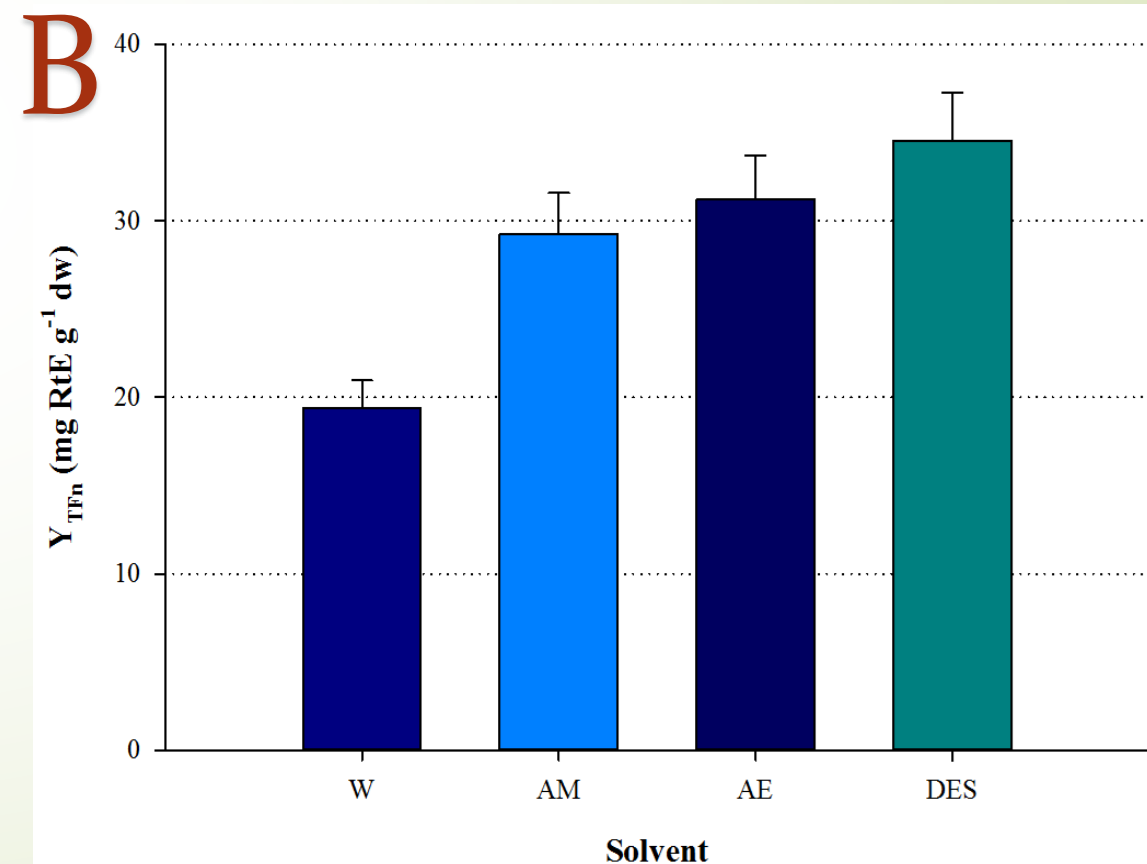
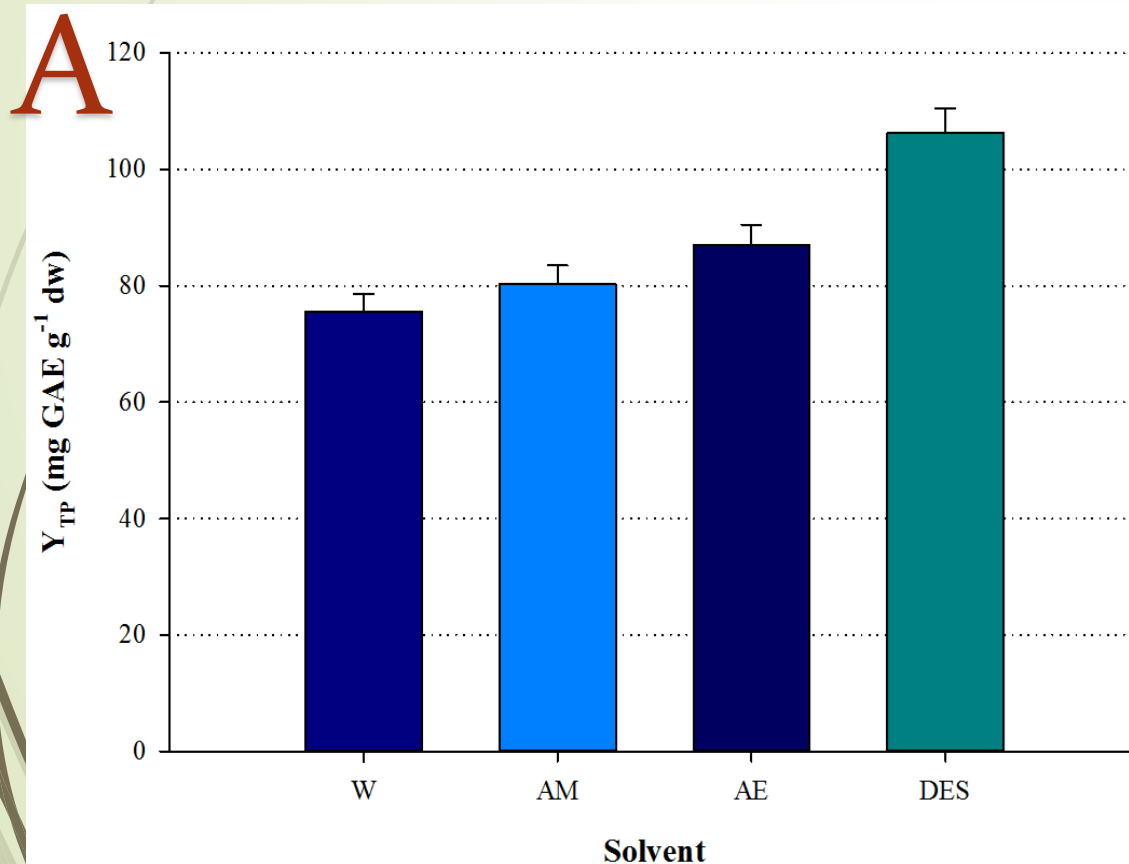
Κινητική εκχύλιση - Επίδραση της θερμοκρασίας

Γράφημα 10. Χρονική πορεία της Y_{TP} κατά την εκχύλιση με το DES, υπό βέλτιστες συνθήκες.



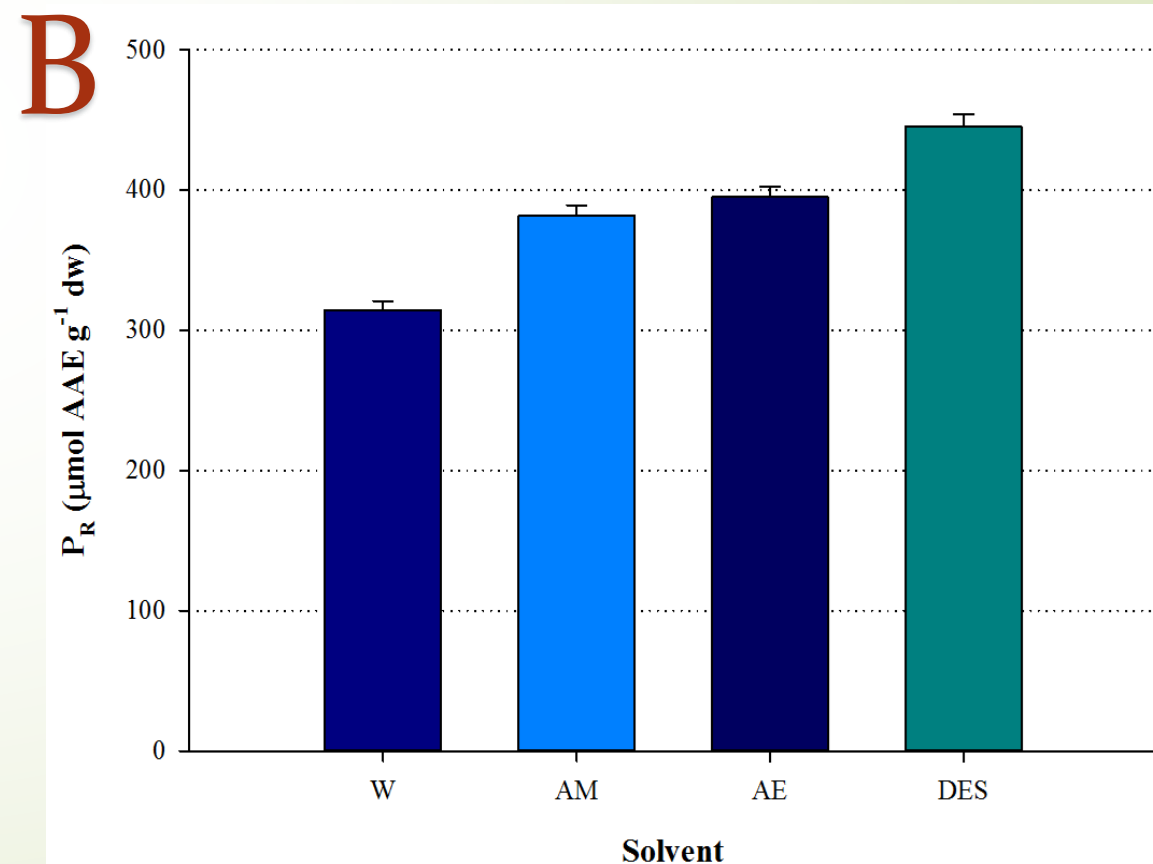
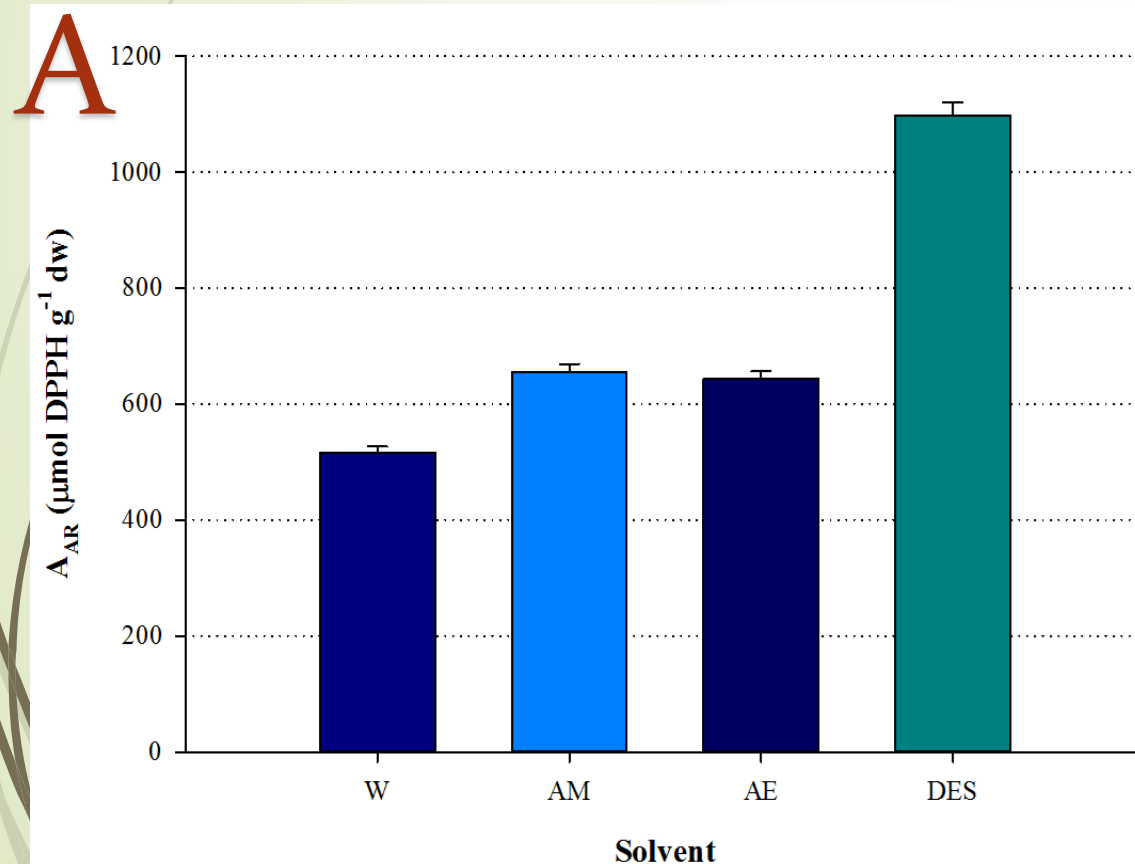
Σύγκριση με άλλους διαλύτες (1)

Γράφημα 11. Συγκριτικό διάγραμμα για (A) Y_{TP} και (B) Y_{TFn} , που ελήφθη με 80% (w/v) DES, 60% υδατική μεθανόλη (AM), 60% υδατική αιθανόλη (AE) και αποσταγμένο νερό (W). Οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν στους 70°C, σε $R_{L/S} = 32$ mL/g, υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, για 280 min.



Σύγκριση με άλλους διαλύτες (2)

Γράφημα 12. Συγκριτικό διάγραμμα για (A) A_{AR} και (B) P_R , που ελήφθη με 80% (w/v) DES, 60% υδατική μεθανόλη (AM), 60% υδατική αιθανόλη (AE) και αποσταγμένο νερό (W). Οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν στους 70°C, σε $R_{L/S} = 32$ mL/g, υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, για 280 min.



Χαρακτηρισμός των κύριων πολυφαινολών

Πίνακας 1. Δεδομένα UV-Vis και φασματοσκοπίας μάζας των κυριότερων πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, που ελήφθησαν με 80% (w/v) DES, στους 70°C.

No	Rt (min)	UV-Vis (nm)	[M + H] ⁺ (m/z)	Other ions (m/z)	Tentative identity
1	14.24	288, 322(s)	391	413 [M + Na] ⁺ , 261	Oleoside
2	18.80	288, 332	391	413 [M + Na] ⁺ , 229	Oleoside
3	22.86	248, 348	765	579, 503, 233	Luteolin derivative
4	23.36	266, 340	611	449, 287	Luteolin di-glycoside
5	24.96	264, 318, 368	603	475, 303	Quercetin derivative
6	25.90	248, 280(s), 356	595	617 [M + Na] ⁺ , 449, 287	Luteolin rutinoside
7	26.39	248, 354	595	617 [M + Na] ⁺ , 449, 287	Luteolin rutinoside
8	26.69	252, 280	541	563, 361, 137	Oleuropein isomer
9	27.30	244, 340	579	271	Apigenin rutinoside
10	28.38	252, 280	541	563, 385, 345	Oleuropein

Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

► Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, για 180 min.

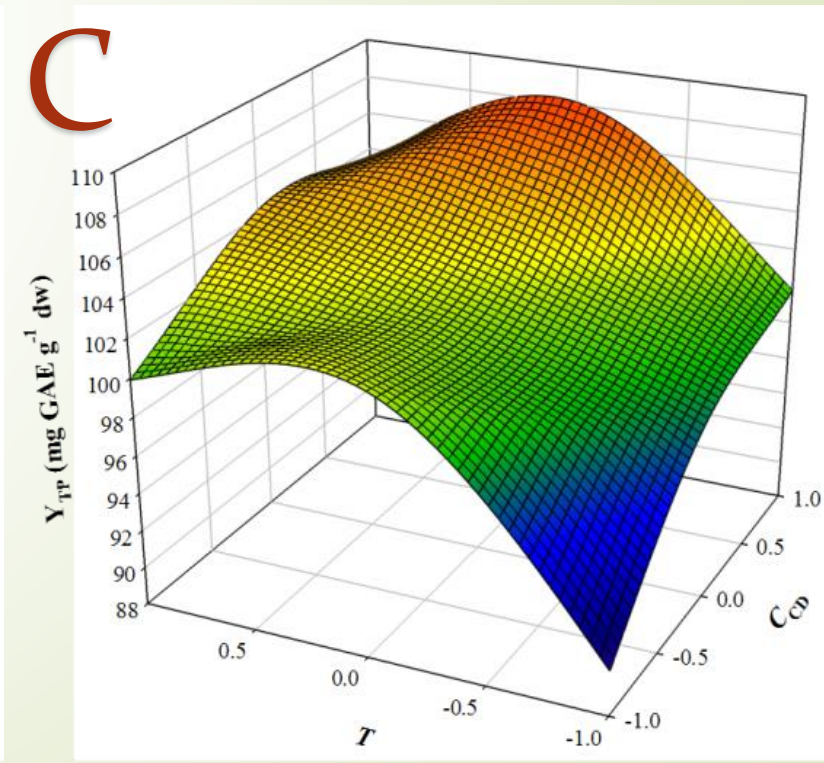
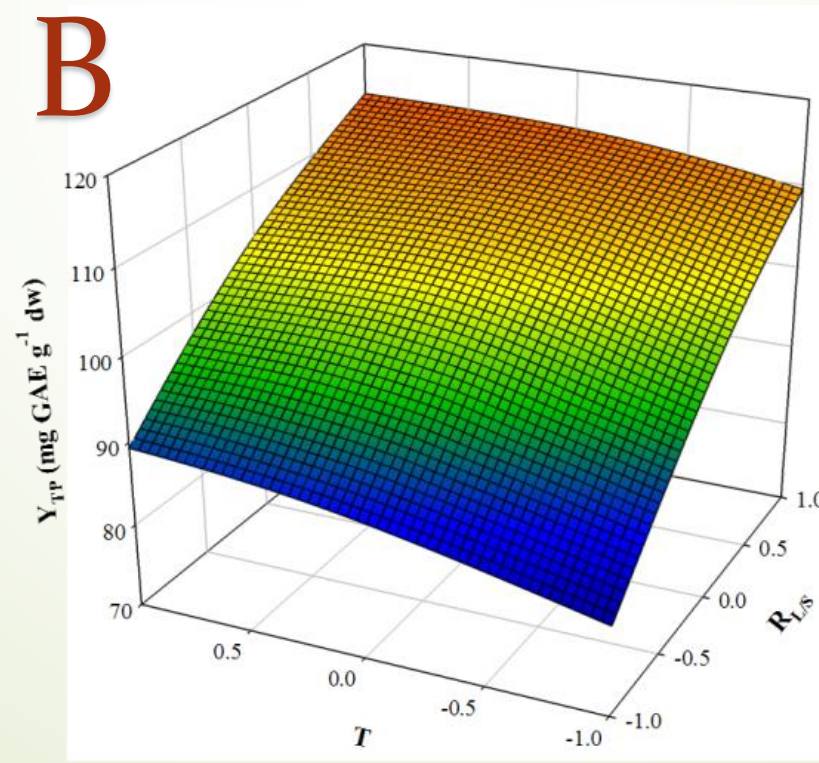
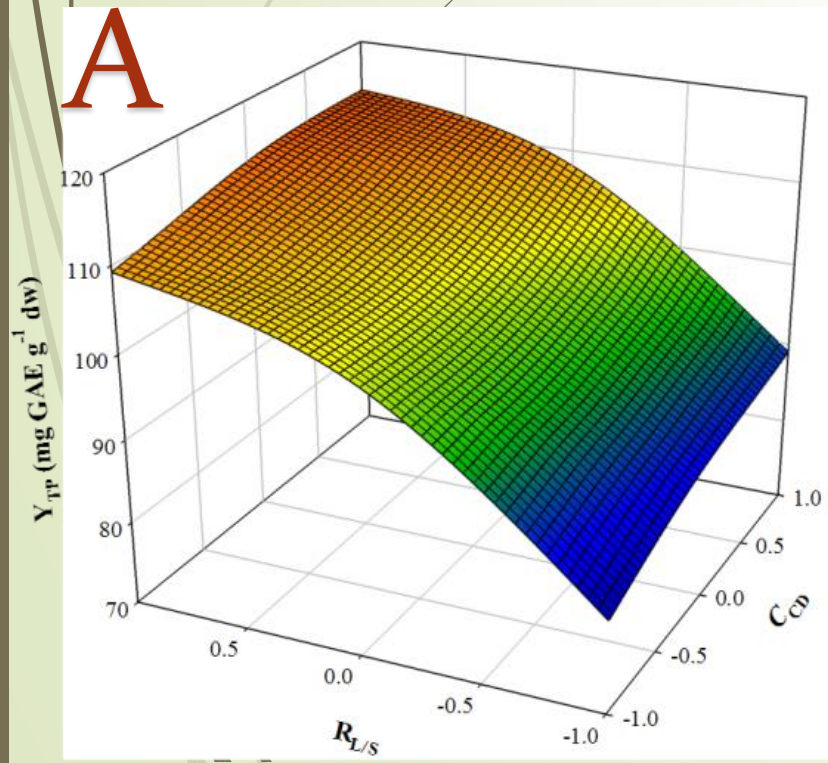
► $C_{m-\beta-CD} = 9\%$ (w/v),

► $R_{L/S} = 40$ mL/g,

► $T = 51^\circ\text{C}$

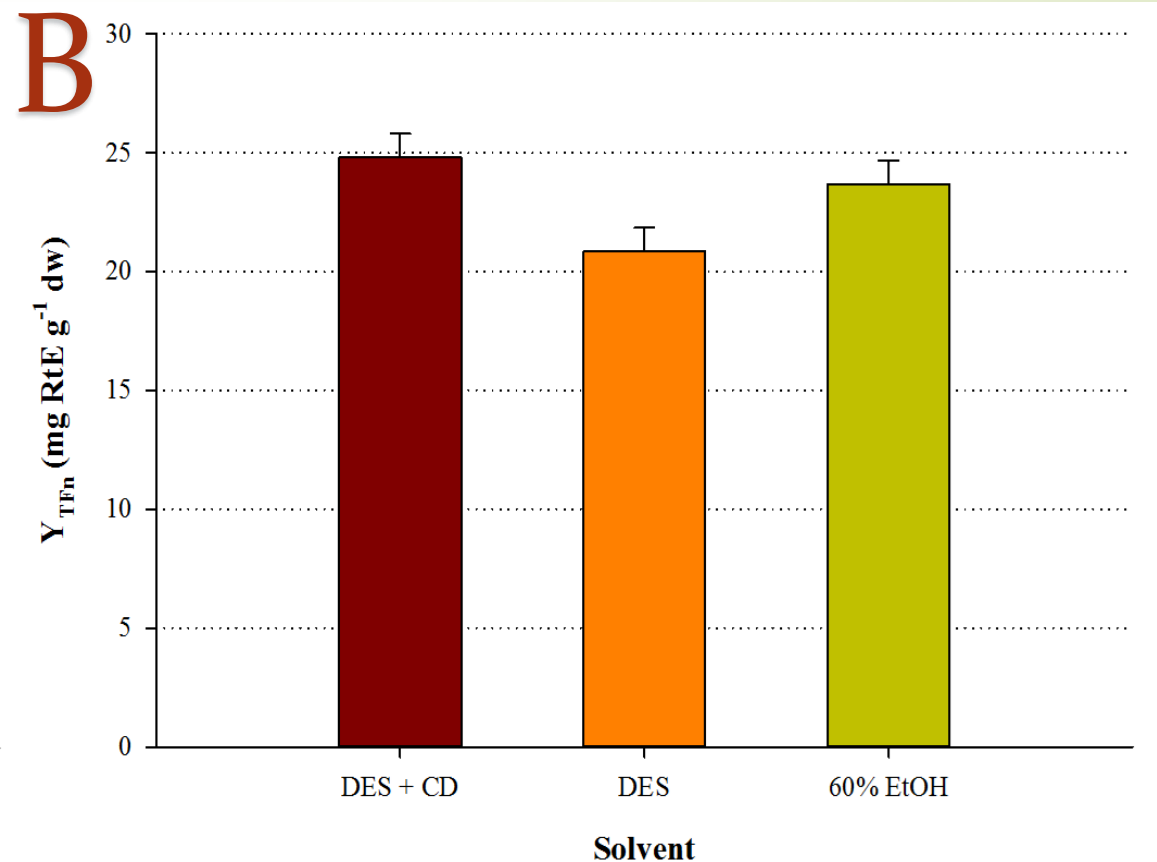
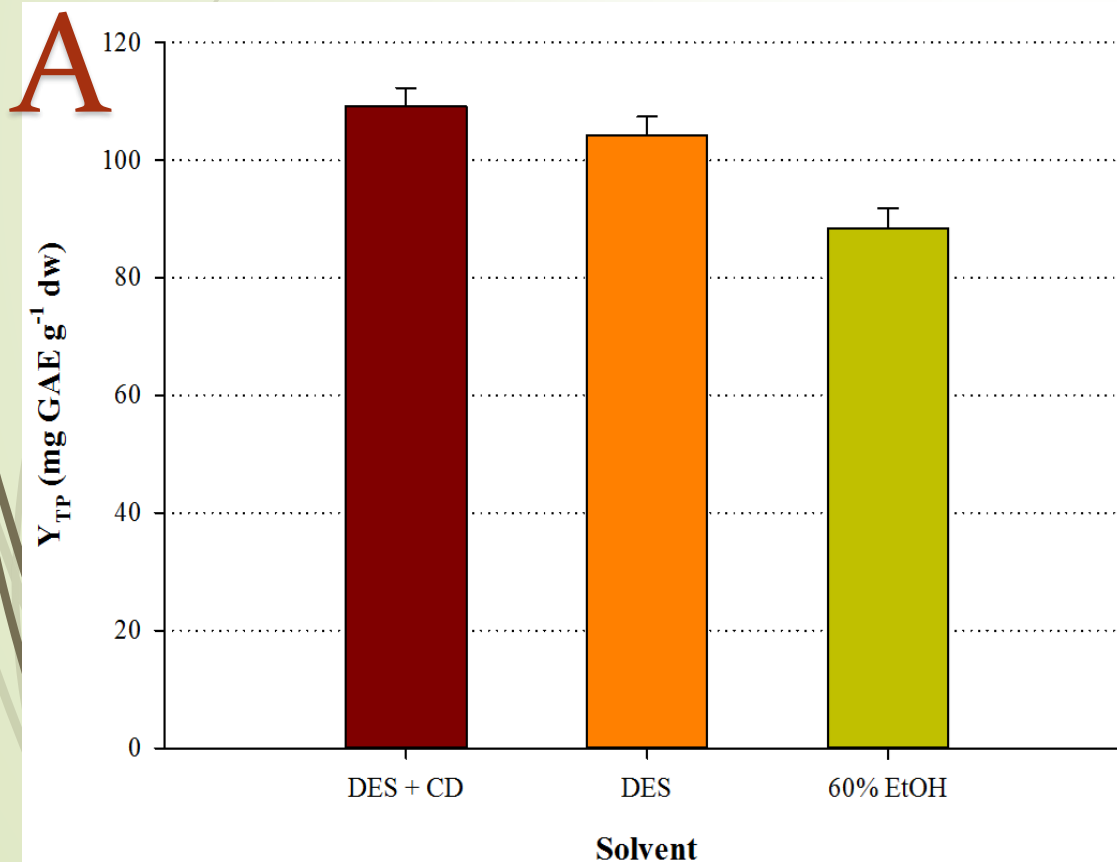
► $Y_{TP} = 116,65 \pm 3,60$ mg GAE/g dw.

Γράφημα 13. 3D γραφική απεικόνιση του αποτελέσματος της ταυτόχρονης μεταβολής των (Α) $C_{m-\beta-CD}$, (Β) $R_{L/S}$ και (Γ) T στην Y_{TP} .



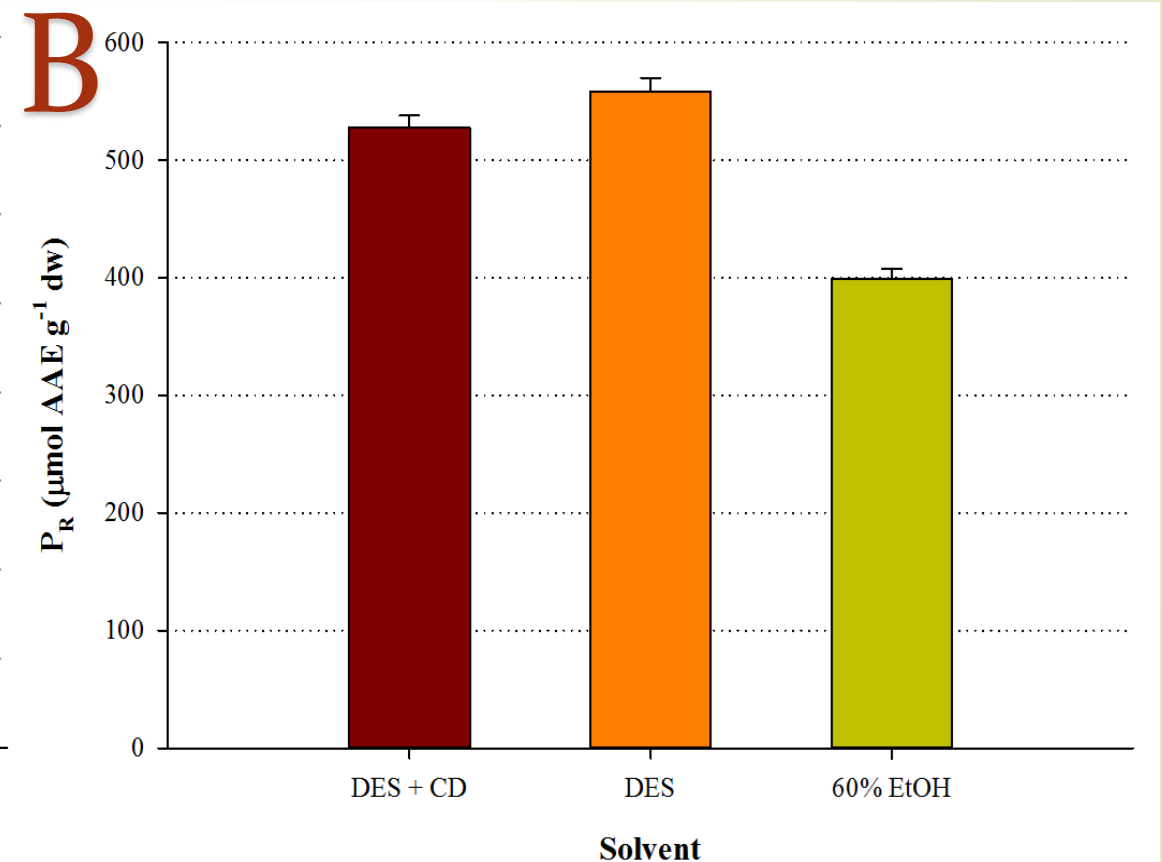
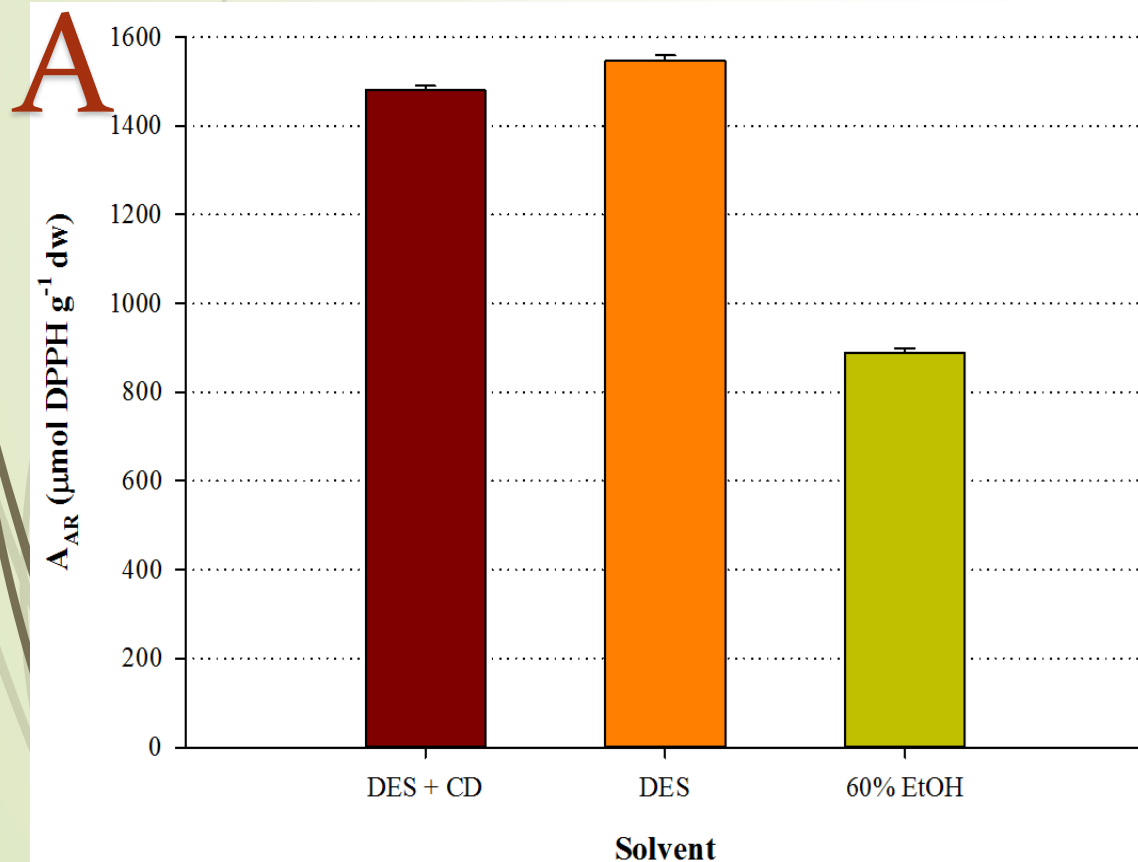
Μοντέλο δοκιμής αξιολόγησης και απόδοσης (1)

Γράφημα 14. Συγκριτικό διάγραμμα για (A) Y_{TP} και (B) Y_{TFn} , που ελήφθη χρησιμοποιώντας DES + m-β-CD, DES και 60% υδατική αιθανόλη. Οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, σε βέλτιστη $C_{m-\beta-CD}$, $R_{L/S}$ και T , για 180 min.



Μοντέλο δοκιμής αξιολόγησης και απόδοσης (2)

Γράφημα 15. Συγκριτικό διάγραμμα για (A) A_{AR} και (B) P_R , που ελήφθη χρησιμοποιώντας DES + m-β-CD, DES και 60% υδατική αιθανόλη. Οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν υπό συνεχή ανάδευση στις 600 rpm, σε βέλτιστη $C_{m-\beta-CD}$, $R_{L/S}$ και T , για 180 min.



Χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων

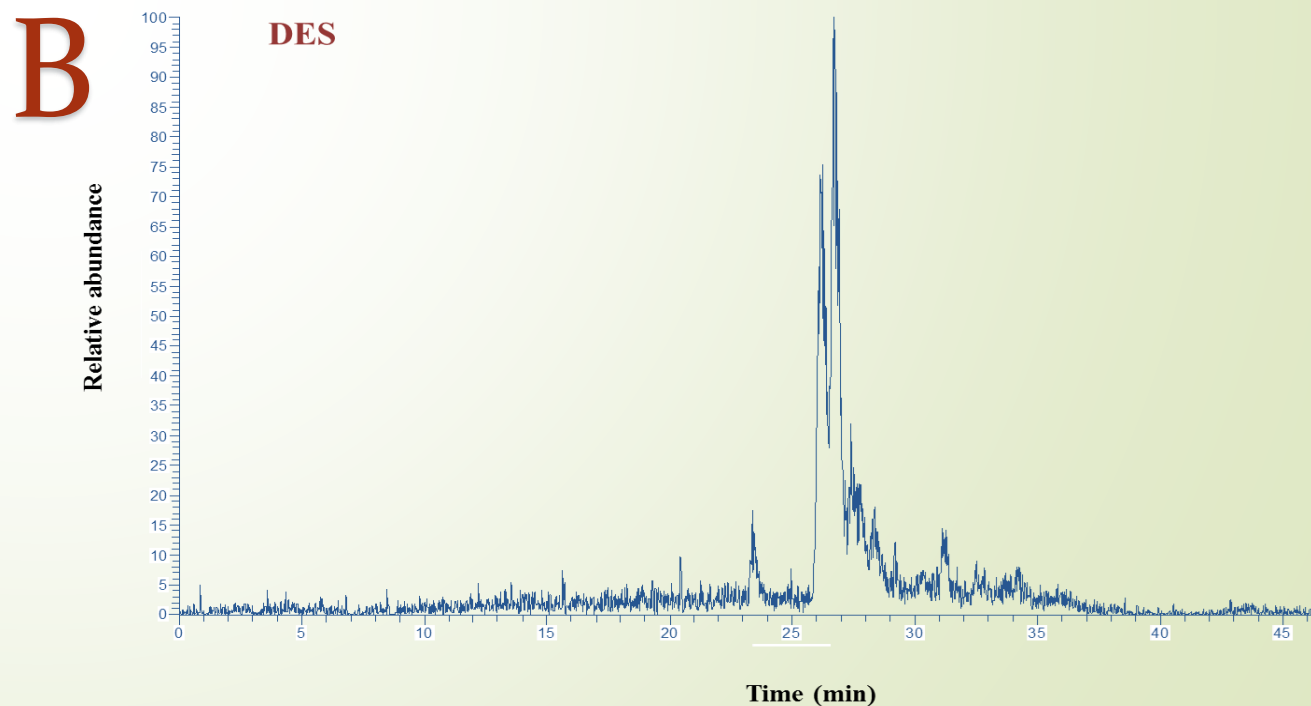
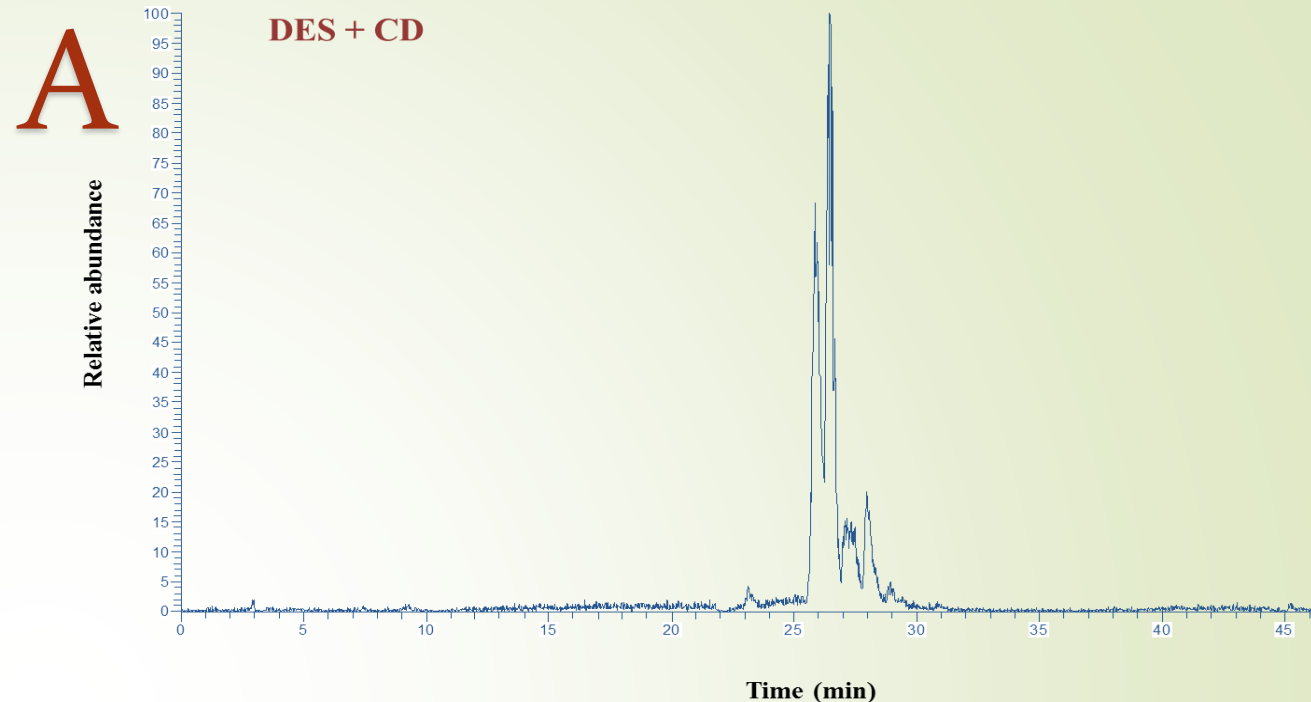
- Ο χαρακτηρισμός διεξήχθη με ανάλυση των εκχυλισμάτων DES/m-β-CD και DES με LC-DAD-MS.

Πίνακας 2. Δεδομένα φασματοσκοπίας μάζας των κυριότερων πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, χρησιμοποιώντας DES/m-β-CD και DES διαλύτη.

Peak	Rt (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Other ions (m/z)	Tentative identity
1	25.85	449	287	Luteolin glucoside
2	26.46	541	563[M + Na] ⁺ , 361, 137	Oleuropein
3	27.14	579	601[M + Na] ⁺ , 271	Apigenin rutinoside
4	27.96	449	471[M + Na] ⁺ , 418, 287	Luteolin glucoside

Χρωματογραφική ανάλυση

Γράφημα 16. Χρωματογραφική
ανάλυση των κύριων πολυφαινολών
των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται
με (A) DES + m-β-CD και (B) DES.





Συμπεράσματα (1)

- Μετά από βελτιστοποιημένες παραμέτρους, ο βαθέως εύτηκτος διαλύτης (DES) αποδείχθηκε ότι είναι αρκετά αποτελεσματικός, δίνοντας σημαντικά αυξημένη απόδοση πολυφαινολών σε σύγκριση με συμβατικούς βιοδιαλύτες, όπως υδατική αιθανόλη και νερό. Το εκχύλισμα DES έδειξε επίσης ισχυρότερες αντιοξειδωτικές επιδράσεις.
- Περαιτέρω μελέτες κατέδειξαν για πρώτη φορά ότι η μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (m-β-CD) μπορεί να συνδυάζεται πολύ αποτελεσματικά με αυτό του DES, ενισχύοντας την εκχύλιση πολυφαινολών από φύλλα ελιάς.
- Παρά τις αναφορές στην βιβλιογραφία που αναφέρονται στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των πολυφαινολών παρουσία διαφόρων κυκλοδεξτρινών, αυτή η μελέτη κατέδειξε ότι η m-β-CD μπορεί να μειώσει τη ικανότητα απόσβεσης ελευθέρων ριζών των πολυφαινολών από φύλλα ελιάς.



Συμπεράσματα (2)

- Η μελέτη χρήσης του DES αυτής της έρευνας προτείνεται ως φιλικό προς το περιβάλλον μέσο για την ανάκτηση πολυφαινολών μέσω της εκχύλισης στερεών-υγρών. Με βάση αυτό, μπορεί να ανοίξει ο δρόμος για την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση άλλων φυτοχημικών, από βιομάζα αποβλήτων τροφίμων φυτικής προέλευσης.
- Δεδομένου ότι ο διαλύτης αποτελείται από μη τοξικές ουσίες που απαντώνται φυσιολογικά σε τρόφιμα, τα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας ως βιοενεργά συστατικά σε τρόφιμα/καλλυντικά/φαρμακευτικά σκευάσματα. Αυτό θα οδηγήσει τελικά σε χαμηλότερο κόστος και κατανάλωση ενέργειας, σύμφωνα με μια βιώσιμη διαδικασία.



Δημοσιευμένο έργο

- Highly efficient extraction of antioxidant polyphenols from *Olea europaea* leaves using an eco-friendly glycerol/glycine deep eutectic solvent. (2017). V. Athanasiadis, S. Grigorakis, S. Lalas and D.P. Makris. *Waste and Biomass Valorization*, doi: 10.1007/s12649-017-9997-7.
- Methyl β -cyclodextrin as a booster for the extraction for *Olea europaea* leaf polyphenols with a bio-based deep eutectic solvent. (2017). V. Athanasiadis, S. Grigorakis, S. Lalas and D.P. Makris. *Biomass Conversion and Biorefinery*, doi: 10.1007/s13399-017-0283-5.
- Effect of methyl β -cyclodextrin on radical scavenging kinetics of olive leaf extracts and interactions with ascorbic acid. (2017). V. Athanasiadis, S. Lalas and D.P. Makris. *ChemEngineering*, 1 (1), 6.



Επίλογος

«Αν αποσυνθέσεις την Ελλάδα, στο τέλος θα δεις να σου απομένουν μια **ελιά**, ένα **αμπέλι** κι ένα **καράβι**. Που σημαίνει: με άλλα τόσα την ξαναφτιάχνεις»

Οδυσσέας Ελύτης

Ευχαριστώ πολύ!

