



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Χαρακτηρισμός υδροκολλοειδών από φυτικές πρώτες ύλες
και παραπροϊόντα»**

**«Characterization of hydrocolloids derived from plant
products and by-products»**

ΚΟΛΙΑΣΤΑΣΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΑΕΜ 17004

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ριζούλης Χρήστος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε σε δύο εργαστήρια: στο εργαστήριο Φυσικής Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΔΠΙΑΕ υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Χρήστου Ριτζούλη και στο εργαστήριο Τεχνολογίας και Ελέγχου Ποιότητας Ελαιόλαδου και λιπαρών υλών υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Ελένη Καλογιάννη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου Καθηγητή κ. Χρήστο Ριτζούλη για την εμπιστοσύνη που επέδειξε ως προς το πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία, αλλά και για την καθοδήγηση, συμπαράσταση και υποστήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής.

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια κ. Ελένη Καλογιάννη, για την πολύτιμη υποστήριξη, καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που έδειξε, καθώς και για τις πολύ χρήσιμες υποδείξεις της και την διάθεση του εργαστηρίου της για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω και τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Πετρίδη για την συνεργασία που είχαμε στην στατιστική ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ θερμά τόσο την κ. Ελένη Καλογιάννη, τον κ. Δημήτριο Πετρίδη όσο και τον κ. Χρήστο Ριτζούλη για τη συνεργασία που είχαμε, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους όσον αφορά στην δημοσίευση των αποτελεσμάτων της παρακάτω έρευνας.

Ευχαριστίες οφείλω βεβαίως και σε όλο το προσωπικό του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΔΠΙΑΕ για την βοήθειά τους σε όλα τα επίπεδα.

Τέλος, οι πιο θερμές ευχαριστίες ανήκουν δικαιωματικά στους γονείς μου που έχουν συμβάλει τόσο ηθικά όσο και υλικά σε όλη μου τη ζωή για να φτάσω σήμερα εδώ. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για την υπομονή τους, αλλά και για την εμπιστοσύνη και την πίστη που επέδειξαν ως προς εμένα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και μη. Η διπλωματική αυτή αφιερώνεται σε εκείνους, καθώς και σε όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την πορεία ως ελάχιστη αναγνώριση της πίστης τους σε εμένα.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε μελέτη υδροκολλοειδών προερχόμενων από φυτικές μήτρες ελιάς. Κύρια πηγή αυτών ήταν τα στερεά υπολείμματα ελαιοτριβείων, δηλαδή παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων με χαμηλή προστιθέμενη αξία τα οποία κομποστοποιήθηκαν μερικώς ή πλήρως πριν χρησιμοποιηθούν για την μελέτη αυτή.

Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων με διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους όπως SEC και FT – IR. Οι μέθοδοι αυτοί έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων είναι υδροκολλοειδή αρνητικά φορτισμένα που περιέχουν πολυσακχαρίτες μεγάλου μοριακού βάρους καθώς και πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν γαλακτώματα O/W με την προσθήκη των εκχυλισμάτων αυτών ως τον βασικό μας γαλακτωματοποιητικό παράγοντα. Η μελέτη αυτών έδειξε ότι μπορούν να δράσουν ως γαλακτωματοποιητές δίνοντας αρκετά σταθερά γαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για χρήση σε πραγματικά προϊόντα γαλακτωμάτων που παρασκευάζονται σε βιομηχανίες, όπως αυτή των τροφίμων, αλλά και των φαρμάκων. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν με μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός, ζ-δυναμικού, διεπιφανειακών φαινομένων καθώς και με τη λήψη μικρογραφημάτων με την χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας λέιζερ (LSCM).

Η ίδια διαδικασία με τις ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκε και στα καθόλου και μερικώς κομποστοποιημένα δείγματα. Στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα από την μελέτη των γαλακτωμάτων έδειξαν προοπτικές αξιοποίησής τους ως γαλακτωματοποιητές σε όξινα τρόφιμα με μικρό χρόνο ζωής, σε αντίθεση με την περίπτωση των πλήρως κομποστοποιημένων αποβλήτων τα οποία εμφάνισαν σταθερότητα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε μελέτη των δειγμάτων σε βάθος χρόνου 6 μηνών, δηλαδή από την έναρξη της κομποστοποίησης μέχρι και την ολοκλήρωση αυτής με σκοπό την διαπίστωση διαφορών τόσο στη σύνθεσή τους όσο και στην γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα. Στην περίπτωση αυτή έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των διεπιφανειακών φαινομένων για τον προσδιορισμό

του βέλτιστου pH εκχυλίσεως, αλλά και του ιδανικού χρόνου κομποστοποίησης. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αναλόγως χρόνου κομποστοποίησης και pH εκχυλίσεως, ωστόσο, στην περίπτωση του χρόνου δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη της υδρόλυσης των πρωτεϊνών για να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην διεπιφανειακή τάση, άρα και στην γαλακτωματοποιητική ικανότητα των δειγμάτων.

Abstract

In the present thesis a study of hydrocolloids derived from olive plant matrices took place. The main source of these raw materials was the solid wastes from olive oil mills, low value by-products of the food industry which were first fully or partially composted before being used in this study.

Those extracts were characterized via various physicochemical methods, such as SEC and FT – IR. The characterization showed that the extracts from composted olive oil mill waste are hydrocolloids negatively charged, comprised mostly of high molecular polysaccharides and some proteins.

Subsequently, in order to assess their capacity to being used as emulsifiers in the food industry, the extracts from olive plant matrices were added as emulsifying agents to prepare O/W emulsions. The study of these emulsion showed that the extracts can be used as emulsifiers providing quite stable emulsions over time with relatively small droplet size distribution. Because of this they could be used in real products for the food industry. All of the above were confirmed by the measurements of static light scattering, zeta potential, interfacial tension phenomena and with laser confocal microscopy (LSCM).

The same procedure with the same measurements was performed on all partially composted samples. In this case, the results of the emulsions study showed prospects of their being used as emulsifiers in acidic foods with a short shelf life, unlike in the case of fully composted waste which were stable for a longer period.

In addition, all of the samples were studied for a period of 6 months, from the beginning of composting until its completion, in order to identify differences in their composition and emulsifying ability. In this case, the results of the interfacial phenomena were statistically analyzed to determine the optimum pH of the extraction as well as the optimum composting time. The results of this analysis showed statistically significant differences between the samples according to composting time and extraction pH, however, in the case of time, no reliable conclusions can be drawn as further study of the hydrolysis of proteins is needed to determine their effect on interfacial tension, and therefore the emulsifying capacity of the samples.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή – Σκοπός – Δημοσιεύσεις	9
1. Υδροκolloειδή	11
1.1 Κolloειδή και κolloειδείς διασπορές.....	11
1.2 Ορισμός των υδροκolloειδών.....	12
1.3 Κατηγοριοποίηση υδροκolloειδών	13
2. Γαλακτώματα	15
2.1 Γενικά.....	15
2.2 Σταθερότητα γαλακτωμάτων.....	17
2.2.1 Συγχώνευση	19
2.2.2 Κροκίδωση.....	20
2.2.3 Αποκορύφωση	20
2.2.4 Άλλοι μηχανισμοί	20
2.3 Γαλακτωματοποιητές και τροποποιητές υφής.....	21
2.4 Επιλογή του σωστού γαλακτωματοποιητή (HLB).....	23
3. Αξιοποίηση υπολειμμάτων της βιομηχανίας τροφίμων	25
3.1 Γενικά.....	25
3.2 Υπολείμματα ελαιοτριβείων	26
3.3 Σύσταση και αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων των ελαιοτριβείων..	28
4. Τεχνικές φυσικοχημικού χαρακτηρισμού	30
4.1 Γενικά.....	30
4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	30
4.2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).....	30
4.3 Φασματοσκοπικές και φασματοφωτομετρικές τεχνικές	31
4.3.1 Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	31
4.3.2 Στατική σκέδαση φωτός (SLS).....	33
4.3.3 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού	35
4.4 Τεχνικές μικροσκοπίας.....	36
4.4.1 Γενικά.....	36
4.4.2 Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM).....	38
4.5 Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων.....	40
5. Πειραματικό μέρος και παρουσίαση αποτελεσμάτων: Μέθοδοι, υλικά και συσκευές χαρακτηρισμού	42

5.1	Εισαγωγή	42
5.2	Μεταχείριση δειγμάτων – παρασκευή γαλακτωμάτων	42
5.3	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων και των γαλακτωμάτων 44	
5.3.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	44
5.3.2	Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	45
5.3.3	Στατική σκέδαση φωτός (SLS)	45
5.3.4	Προσδιορισμός ζ-δυναμικού	46
5.3.5	Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)	46
5.3.6	Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων	46
6.	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού και μελέτη γαλακτωμάτων παρουσία υδροκολλοειδών από πλήρως κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων (Μάιος 2018)	47
6.1	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των γαλακτωμάτων	47
6.1.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	47
6.1.2	Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	51
6.1.3	Στατική σκέδαση φωτός (SLS)	52
6.1.4	Προσδιορισμός ζ-δυναμικού	54
6.1.5	Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)	54
6.1.6	Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων	56
6.2	Συμπεράσματα	57
7.	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού και μελέτη γαλακτωμάτων παρουσία υδροκολλοειδών από μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων (Δεκέμβριος 2018-Ιανουάριος 2019)	59
7.1	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των γαλακτωμάτων	59
7.1.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	59
7.1.2	Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	62
7.1.3	Στατική σκέδαση φωτός (SLS)	63
7.1.4	Προσδιορισμός ζ-δυναμικού	64
7.1.5	Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)	65
7.2	Συμπεράσματα	66
8.	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού επιφανειοδραστικών πολυμερών από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων για τους μήνες Νοέμβριος 2017-Μάιος 2018	67
8.1	Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων	67

8.1.1	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).....	67
8.1.2	Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	74
8.1.3	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των διεπιφανειακών φαινομένων	76
8.2	Συμπεράσματα	79
9.	Συμπεράσματα – Προτάσεις.....	80
9.1	Συμπεράσματα	80
9.2	Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	80
	Βιβλιογραφία	82

Εισαγωγή – Σκοπός – Δημοσιεύσεις

Τα υδροκολλοειδή και ιδιαίτερα οι πολυσακχαρίτες αποτελούν βασικά υλικά των οποίων ο ρόλος είναι εξαιρετικά σημαντικός για τις φυσιολογικές διεργασίες φυτών και ζώων. Λόγω των ιδιοτήτων που διαθέτουν, βρίσκουν ευρεία χρήση, τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και σε άλλες βιομηχανίες όπως των καλλυντικών και των φαρμάκων.

Όσον αφορά στη βιομηχανία τροφίμων οι ιδιότητες τους όπως η σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, η ρύθμιση ιξώδους, ο σχηματισμός πηκτών (gels), η δέσμευση νερού κ.ά. συμβάλλουν στην ευρεία εφαρμογή τους.

Η παραγωγή ελαιολάδου στις Μεσογειακές χώρες αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό παγκοσμίως με την Ελλάδα να κατέχει μία από τις υψηλότερες θέσεις μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Ωστόσο, η βιομηχανία παραγωγής ελαιολάδου παράγει και ένα σημαντικό ποσοστό αποβλήτων τα οποία είναι ιδιαίτερος τοξικά για το περιβάλλον. Λόγω των παραπάνω, η απόρριψη ή αξιοποίηση αυτών είναι πλέον μείζονος σημασίας και για το λόγο αυτό καθώς και για τις λειτουργικές ιδιότητες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, επιλέχθηκαν τα απόβλητα ελαιοτριβείων για περαιτέρω μελέτη αναφορικά με την αξιοποίησή τους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν λοιπόν, η απομόνωση και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός υδροκολλοειδών που προέρχονται από φυτικές μήτρες, ελιάς στην προκειμένη και συγκεκριμένα από στερεά υπολείμματα ελαιουργίας, μέσω εκχύλισης μετά την κομποστοποίηση αυτών των αποβλήτων. Απώτερος σκοπός ήταν να προσδιοριστεί εάν υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής των υλικών αυτών σε πραγματικά προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων.

Η διπλωματική αυτή περιλαμβάνει τρία μέρη. Αρχικά, υπάρχει ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός όλων των εκχυλισμάτων, μη κομποστοποιημένων, μερικώς και πλήρως. Στη συνέχεια, ακολουθεί η μελέτη των γαλακτωματοποιητικών ιδιοτήτων αυτών μέσω της παρασκευής γαλακτωμάτων και της παρακολούθησής τους σε βάθος χρόνου, ενώ στο τέλος μελετάται η μεταβολή των χαρακτηριστικών τους τόσο σε βάθος χρόνου όσο και αναλόγως του pH εκχυλίσεως για να διαπιστωθεί η κατάλληλη στιγμή διακοπής της κομποστοποίησης για να προκύψουν εκχυλίσματα με την

καλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα καθώς και το πώς μεταβάλλεται τόσο η σύσταση αυτών όσο και οι ιδιότητές τους.

Όλα τα παραπάνω λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να προσδιοριστεί επαρκώς ο ιδανικότερος βαθμός κομποστοποίησης των υπολειμμάτων των ελαιοτριβείων έτσι ώστε να προκύψει ένας βιώσιμος τρόπος αξιοποίησης των αποβλήτων αυτών από την βιομηχανία.

Δημοσίευση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής δημοσιεύθηκαν σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά. Οι κατάλογοι των δημοσιεύσεων παρουσιάζονται παρακάτω:

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. **Koliastasi, A.**; Kompothekra, V.; Giotis, C.; Moustakas, A.K.; Scotti, E.P.; Gerakis, A.; Kalogianni, E.P.; Georgiou, D.; Ritzoulis, C. Novel emulsifiers from olive mill compost., “Novel emulsifiers from olive mill compost”, *Food Hydrocolloids* 99 (2020).
2. **Koliastasi, A.**; Kompothekra, V.; Giotis, C.; Moustakas, A.K.; Skotti, E.P.; Gerakis, A.; Kalogianni, E.P.; Ritzoulis, C. “Emulsifiers from Partially Composted Olive Waste.” *Foods* 2019, 8, 271.
3. **Koliastasi, A.**; Kompothekra, V.; Giotis, H.; Kalogianni, E.P.; Petridis, D.; Ritzoulis, C. “Extraction of surface-active polymers from the compost of olive processing waste.”, *Journal of Food Engineering* (under review).

Ανακοινώσεις σε πρακτικά συνεδρίων

1. Kompothekra Vasiliki, Giotis Charilaos*, Moustakas Antonis, K, Skotti, Efstathia P, Gerakis Argyrios, **Koliastasi Aikaterini**, Kalogianni Eleni, Georgiou Despoina, Ritzoulis Christos, Novel emulsifiers from composted olive mill waste, 4th International Conference of Food And Biosystems Engineering, 30 May-2 June 2019, Crete, Greece (**poster**).

1. Υδροκolloειδή

1.1 Κolloειδή και κolloειδείς διασπορές

Τα κolloειδή είναι συστήματα διασποράς με μέγεθος σωματιδίων μεταξύ 1 nm και 0.5 μm. Βρίσκονται ανάμεσα στα ομογενή (μοριακά) διαλύματα και τα ετερογενή συστήματα διασποράς (αιωρήματα). Στα κolloειδή το αντίστοιχο του «διαλύτη» είναι το «μέσο διασποράς» ή «διασπαρμένη ουσία». Η διασπαρμένη ουσία είναι, συνήθως, μεγάλα μόρια ή συσσωματώματα μορίων (μικκύλια).

Τα κolloειδή χαρακτηρίζονται από το μέγεθος των σωματιδίων της διεσπαρμένης ουσίας (1 έως 1000 nm ή 10 έως 10000 Å), που είναι πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των σωματιδίων των διαλυμένων ουσιών στα διαλύματα. Ένας απλός τρόπος να διακρίνουμε ένα κolloειδές από ένα διάλυμα είναι η μέθοδος Tyndall (Ebbing & Gammon, 1999). Παρόλο που εμφανίζεται να είναι ομογενές, επειδή τα διεσπαρμένα σωματίδια είναι πολύ μικρά, όταν μία ακτίνα φωτός διέλθει από ένα κolloειδές, παρατηρείται διάθλαση, κάτι που δεν συμβαίνει με τα διαλύματα. Έχει λοιπόν την ικανότητα να σκεδάζει το φως.

Εκτός από τις οπτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν επιδεικνύουν επίσης κινητικές (υδροδυναμικές) και ηλεκτρικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζουν υψηλό ιξώδες και μικρή ταχύτητα διάχυσης και διαπίδυσης. Οι όροι αυτοί χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της ικανότητας των κolloειδών να κατανεμηθούν σε όλη τη μάζα ενός υγρού ή αερίου (που σε σχέση με άλλα μόρια είναι δυσκολότερο να επιτευχθεί λόγω της διαφοράς στο μέγεθός τους) και να διέλθουν από πορώδη διαφράγματα, αντίστοιχα. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η κίνηση Brown που εκτελούν τα κolloειδή σωματίδια, η οποία είναι μία συνεχής και άτακτη κίνηση που οφείλεται στις προσκρούσεις των σωματιδίων στα μόρια του διαλύτη (Παναγιώτου, 1998).

Αναφορικά με τις ηλεκτρικές ιδιότητες των κolloειδών, αυτές αφορούν στη συμπεριφορά των κolloειδών σωματιδίων όταν βρεθούν σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα, όπου προσροφούν εκλεκτικά το ανιόν ή το κατιόν τους αποκτώντας ομώνυμο φορτίο, το οποίο τα καθιστά ικανά να αιωρούνται. Εάν με κάποιο τρόπο εξουδετερωθεί το φορτίο αυτό, τα κolloειδή συσσωματώνονται και κατακρημνίζονται. Επιπλέον, είναι γνωστό το φαινόμενο της ηλεκτροφόρησης των κolloειδών (ζ - δυναμικό), κατά το οποίο όταν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού τα

σωματίδια μετακινούνται προς το ένα ηλεκτρόδιο, ανάλογα με το φορτίο τους (Παναγιώτου, 1998).

Τα κολλοειδή μπορούν να διακριθούν σε λυόφιλα και λυόφοβα, ανάλογα με τη σχέση που έχουν με το μέσο διασποράς. Η διάκριση αυτή βασίζεται στη σχετική ευκολία με την οποία τα σωματίδια επαναδιασπείρονται στο μέσο διασποράς, όταν έχουν ξηραθεί. Τα λυόφιλα κολλοειδή, όταν προστεθεί το μέσο διασποράς στα ξηραμένα σωματίδια, διογκώνονται αρχικά με την απορρόφηση του υγρού διαλύτη και, στη συνέχεια, σχηματίζεται ένα ομογενές κολλοειδές διάλυμα. Από την άλλη, τα λυόφοβα κολλοειδή διασπείρονται μόνο με την προσφορά ενέργειας από εξωτερική πηγή (π.χ. έντονη ανάδευση, υπέρηχοι κ.λπ.) (Παναγιώτου, 1998).

Τα κολλοειδή, στα οποία το μέσο διασποράς είναι το νερό, διακρίνονται αντίστοιχα σε δύο κύριες κατηγορίες: τα υδρόφιλα και τα υδρόφοβα κολλοειδή. Υδρόφιλο κολλοειδές είναι ένα κολλοειδές στο οποίο υπάρχει μια ισχυρή έλξη μεταξύ της διεσπαρμένης φάσης και του νερού, συνήθως μέσω δυνάμεων London και δεσμών υδρογόνου. Αντίθετα, σε ένα υδρόφοβο κολλοειδές υπάρχει έλλειψη έλξεων μεταξύ διεσπαρμένης φάσης και μορίων νερού (Ebbing & Gammon, 1999).

Τέλος, τα συστήματα διασποράς στα οποία όλα τα σωματίδια έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος ονομάζονται μονοδισπαρμένα (ή ισοδισπαρμένα), ενώ όταν τα σωματίδια έχουν διαφορετικά μεγέθη, τότε τα συστήματα διασποράς ονομάζονται πολυδισπαρμένα (Παναγιώτου, 1998).

1.2 Ορισμός των υδροκολλοειδών

Τα υδροκολλοειδή (ή κόμμεα) είναι ουσίες που αποτελούνται από υδρόφιλα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους και μακράς ανθρακικής αλυσίδας, έχουν κολλοειδείς ιδιότητες και σε συστήματα με βάση το νερό μπορεί να παράξουν πηκτές. Είναι κυρίως ετεροπολυσακχαρίτες, αλλά συμπεριλαμβάνονται σε αυτά και η πρωτεΐνη ζελατίνη, η οποία εμφανίζει ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των πολυσακχαριτών υδροκολλοειδών. Τα υδροκολλοειδή δεν είναι πραγματικά κολλοειδή, καθώς είναι πλήρως διαλυτά σε νερό, αλλά εμφανίζουν ορισμένες από τις κολλοειδείς ιδιότητες, όπως η ικανότητα να παραμένουν αιωρημένα σε νερό υπό την επίδραση της βαρύτητας.

Εκτός της βασικής ιδιότητας που είναι η πάχυνση και/ή η ζελατινοποίηση, τα υδροκολλοειδή συχνά εμφανίζουν συναφείς δευτερεύουσες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα η δημιουργία και σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, ο σχηματισμός εναιωρημάτων και η ενθυλάκωση, δηλαδή ο μικροεγκλεισμός ουσιών. Για το λόγος αυτό βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες, με κυριότερη αυτή στη βιομηχανία τροφίμων (Hoefler, 2004).

1.3 Κατηγοριοποίηση υδροκολλοειδών

Όπως τα διαλύματα, έτσι και τα κολλοειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει της φυσικής κατάστασης, τόσο του μέσου διασποράς όσο και της διεσπαρμένης ουσίας. Επιπλέον, ταξινομούνται και σύμφωνα με τις χημικές και λειτουργικές τους ιδιότητες. Στον Πίνακα 1 Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε. παρουσιάζονται κατηγορίες κολλοειδών με βάση τη φυσική κατάσταση.

Μέσο Διασποράς	Διασπαρμένη Ουσία	Τύπος Κολλοειδούς	Παράδειγμα
Αέριο	Υγρό	Αερολύματα	Εντομοκτόνα
Αέριο	Στερεό		Καπνός
Υγρό	Αέριο	Αφροί	Σαντιγί
Υγρό	Υγρό	Γαλακτώματα	Μαγιονέζα
Υγρό	Στερεό	Στερεολύματα	Πλαστικό Χρώμα
Στερεό	Αέριο	Αφροί	Ελαφρόπετρα
Στερεό	Υγρό	Πηκτές	Κρέμες Ζελέ
Στερεό	Στερεό	Στερεολύματα	Έγχρωμο Γυαλί

Πίνακας 1 Κατηγορίες Κολλοειδών βάσει της φυσικής τους κατάστασης

Η δομή των μορίων των υδροκολλοειδών μπορεί να είναι είτε γραμμική (π.χ. κυτταρίνη, αμυλόζη, πηκτίνη, αλγινικά άλατα), είτε διακλαδισμένη (π.χ. αμυλοπηκτίνη, αραβικό κόμμι). Η γραμμική μορφή είναι η πλέον διαδεδομένη στη φύση και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες απλών σακχάρων, με πλευρικές διακλαδώσεις, οι οποίες μπορεί να είναι σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, μεθυλεστέρες, θεικές ομάδες ή καρβοξυλομάδες. Από τις πλευρικές αυτές ομάδες εξαρτώνται και οι ιδιότητες των υδροκολλοειδών.

Τα περισσότερα υδροκολλοειδή είναι φυσικής προέλευσης, αλλά υπάρχουν επίσης αρκετά υδροκολλοειδή που έχουν τροποποιηθεί χημικά, όπως για παράδειγμα η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC-CarboxyMethyl Cellulose), επίσης γνωστή και ως κόμμι κυτταρίνης, καθώς και η αλγινική προπυλενογλυκόλη. Τέλος, με εξαίρεση την ξανθάνη, τη γελλάνη και την πουλλουλάνη που παράγονται από μικροοργανισμούς, τα περισσότερα φυσικά υδροκολλοειδή προέρχονται από χερσαίους ή θαλάσσιους φυτικούς οργανισμούς ή μύκητες (Hoefler, 2004).

Τρόποι ταξινόμησης	Υδροκολλοειδή
<i>Πηγή προέλευσης</i>	
Καρποί	Κόμμι γκουάρ, κόμμι τάρα, κόμμι χαρουπιού
Ρίζες	Κόνγιακ
Εκκρίματα	Τραγάκανθα, κόμμι καράγια, αραβικό κόμμι
Εκχυλίσματα φυκιών Ερυθροφύκη Καφέ φύκια	Άγαρ, καραγεννάνη Αλγινικό νάτριο, αλγινική προπυλενογλυκόλη
Εκχυλίσματα φυτών	Αμυλόζη, πηκτίνη
Ζωικά εκχυλίσματα	Ζελατίνη
Εκκρίσεις μικροοργανισμών	Ξανθάνη, γελλάνη, πουλλουλάνη
Παράγωγα κυτταρίνης	Κόμμι κυτταρίνης, μεθυλοκυτταρίνη, υδροξυπροπυλοκυτταρίνη, μεθυλοδωροξυπροπυλοκυτταρίνη, μικροκρυσταλλική κυτταρίνη
Άλλα παράγωγα	Αλγινική προπυλενογλυκόλη
<i>Δομή</i>	
Γραμμική Χωρίς φορτίο Με φορτίο	Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, μεθυλοκυτταρίνη, υδροξυπροπυλοκυτταρίνη, αμυλόζη, γκουάρ, κόμμι χαρουπιού, τάρα, κόνγιακ Πηκτίνη, αλγινικά άλατα και αλγινική προπυλενογλυκόλη, καραγεννάνη, κόμμι κυτταρίνης, άγαρ, ξανθάνη, γελλάνη
Διακλαδισμένη	

Χωρίς φορτίο	Αμυλοπηκτίνη
Με φορτίο	Αραβικό κόμμι, τραγάκανθα, καράγια

Πίνακας 2 Ταξινόμηση υδροκολλοειδών με βάση την προέλευσή τους και τα χαρακτηριστικά δομής τους και ηλεκτρικού φορτίου (Hoefler, 2004)

2. Γαλακτώματα

2.1 Γενικά

Τα γαλακτώματα αποτελούνται από δύο μη μιγνυόμενα υγρά (συνήθως λάδι και νερό), από τα οποία το ένα από τα δύο υγρά διασπείρεται ως μικρή σταγόνα στο άλλο. Στα περισσότερα τρόφιμα η διάμετρος της σταγόνας βρίσκεται συνήθως ανάμεσα σε 0.1 και 100μm (McClements, 2005).

Τα συστήματα αυτά αν και θερμοδυναμικά ασταθή λόγω της υψηλής επιφανειακής ενέργειας, παρουσιάζουν μία ελάχιστη κινητική σταθερότητα, η οποία μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη κατάλληλων ουσιών, όπως για παράδειγμα τασιενεργών υλικών (surfactants), τα οποία καταλαμβάνουν στην ουσία την διεπιφάνεια που δημιουργείται μεταξύ των δύο φάσεων. Το ρόλο αυτό μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να παίξουν τα υδροκολλοειδή και άλλα βιομόρια. Η παρασκευή, η σταθεροποίηση και η χρήση γαλακτωμάτων συνυπάρχει σε σχεδόν όλους τους τομείς της καθημερινής ζωής, από τα τρόφιμα, μέχρι τα φαρμακευτικά σκευάσματα ή τα καλλυντικά (Παναγιώτου, 1998).

Η ουσία που σχηματίζει σταγονίδια σε ένα γαλάκτωμα αναφέρεται ως διεσπαρμένη, ασυνεχής ή εσωτερική φάση, ενώ η ουσία που αποτελεί το υγρό περιβάλλον ονομάζεται συνεχής ή εξωτερική φάση. Η κατ' όγκο αναλογία συγκέντρωσης των σταγονιδίων σε ένα γαλάκτωμα περιγράφεται συνήθως ως κλάσμα όγκου της διεσπαρμένης φάσης (φ) το οποίο είναι ίσο με τον όγκο σταγονιδίων του γαλακτώματος, V_D , διαιρούμενο με τον συνολικό όγκο του γαλακτώματος, V_E (McClements, 2005):

$$\varphi = \frac{V_D}{V_E}$$

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι γαλακτώματος που είναι σημαντικοί, ιδιαίτερα για την βιομηχανία τροφίμων, ενώ και στις τρεις περιπτώσεις, τουλάχιστον η μία υγρή φάση

είναι το νερό. Στα γαλακτώματα ελαίου-σε-νερό (oil-in-water ή O/W) σταγονίδια ελαίου αιωρούνται σε υδατική συνεχή φάση. Αυτοί είναι οι πιο ευέλικτοι τύποι γαλακτώματος και οι ιδιότητές τους μπορούν να ελεγχθούν μεταβάλλοντας τόσο τα επιφανειοδραστικά που χρησιμοποιούνται όσο και τα συστατικά που υπάρχουν στην υδατική φάση. Χαρακτηριστικά γαλακτώματα O/W που εντοπίζονται στην βιομηχανία τροφίμων είναι το γάλα, οι κρέμες γάλακτος, οι μαγιονέζες και τα μίγματα παγωτού (Friberg, Larsson, & Sjoblom, 2003).

Στα γαλακτώματα νερού-σε-έλαιο (water-in-oil ή W/O) σταγονίδια νερού είναι διεσπαρμένα μέσα σε μία φάση ελαίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των γαλακτωμάτων είναι διασπορές με βάση το λίπος, όπως για παράδειγμα το βούτυρο και η μαργαρίνη. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η σταθερότητα των γαλακτωμάτων W/O εξαρτάται περισσότερο από τις ιδιότητες του λίπους ή του ελαίου και από το χρησιμοποιούμενο επιφανειοδραστικό υλικό, παρά από τις ιδιότητες της υδατικής φάσης, υπάρχουν λιγότεροι παράμετροι οι οποίες μπορούν να μεταβληθούν προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η σταθερότητα (Friberg, Larsson, & Sjoblom, 2003). Περιοριστικός παράγοντας στη χρήση τους σε τρόφιμα είναι η απουσία τους, εν γένει, βρώσιμων λιπόφιλων γαλακτωματοποιητών.

Ο τρίτος τύπος γαλακτώματος είναι το σύνθετο γαλάκτωμα τύπου νερό-σε-έλαιο-σε-νερό (water-oil-water ή W/O/W), το οποίο είναι στην πραγματικότητα ένα γαλάκτωμα O/W του οποίου τα ίδια τα σταγονίδια περιέχουν σταγονίδια νερού (είναι δηλαδή γαλακτώματα W/O). Υπάρχει επίσης η δυνατότητα να παρασκευασθούν γαλακτώματα O/W/O. Επειδή τόσο τα σταγονίδια νερού που περιέχονται στα σταγονίδια ελαίου όσο και τα σταγονίδια ελαίου που περιέχονται στη συνεχή υδατική φάση πρέπει να είναι σταθερά, τα σύνθετα γαλακτώματα θεωρούνται τα δυσκολότερα όσον αφορά στην παρασκευή και τον έλεγχο της σταθερότητάς τους (Friberg, Larsson, & Sjoblom, 2003). Συνήθως, τέτοιου τύπου γαλακτώματα χρησιμοποιούνται για την προστασία ευαίσθητων συστατικών και για την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους ή για την Παρασκευή τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Garti & Bisperink, 1998).

Τα γαλακτώματα όπως ορίστηκαν, αναφέρονται συχνά ως μακρογαλακτώματα για να διακριθούν από τα μικρογαλακτώματα, των οποίων οι διάμετροι των διεσπαρμένων μικροφάσεων είναι συνήθως μεταξύ 0,000 και 0,1 μm

και σε αντίθεση με τα μακρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά σταθερά και μπορούν, ως εκ τούτου, να σχηματισθούν αυθόρμητα. Τυπικά πρόκειται για μικκύλια, λιποσώματα και άλλες μορφές αυτό-οργάνωσης των τασιενεργών μορίων.

Όπως όλες οι κολλοειδείς διασπορές, τα γαλακτώματα οπτικώς εξεταζόμενα εμφανίζονται, ανάλογα με το μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων, γαλακτώδη-λευκά-θολά (όταν τα σταγονίδια είναι μεγάλα) ή κυανίζοντα-λευκά-γκρι-ημιδιαφανή (όταν τα σταγονίδια είναι κολλοειδών διαστάσεων) ή διαφανή (μικρογαλακτώματα) (Παναγιώτου, 1998).

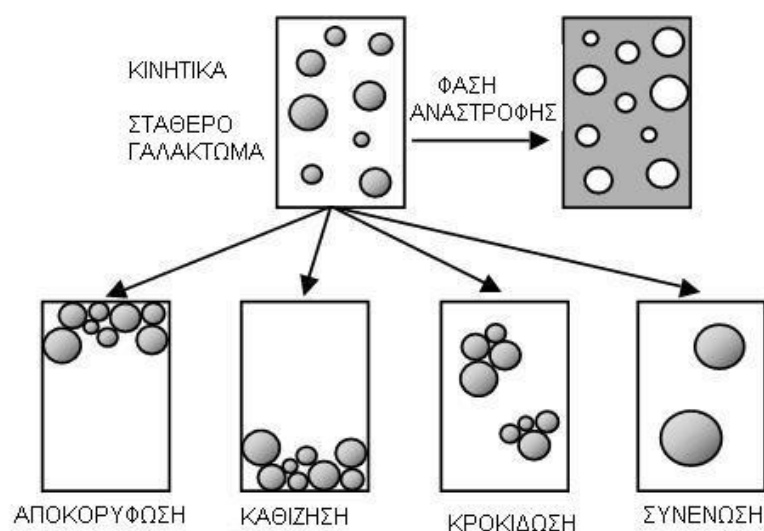
2.2 Σταθερότητα γαλακτωμάτων

Η διαδικασία μετατροπής των δύο μη αναμιξιμων υγρών σε ένα γαλάκτωμα ή η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα προϋπάρχον γαλάκτωμα είναι γνωστή ως ομογενοποίηση. Στη βιομηχανία τροφίμων, η διαδικασία αυτή διεξάγεται συνήθως χρησιμοποιώντας συσκευές γνωστές ως ομογενοποιητές, οι οποίες συνήθως υποβάλουν τα υγρά σε έντονη μηχανική ανάδευση. Παραδείγματα τέτοιων συσκευών είναι αναμικτήρες υψηλής ταχύτητας, ομογενοποιητές βαλβίδων υψηλής πίεσης και οι κολλοειδείς μύλοι (McClements, 2005).

Με ομογενοποίηση είναι δυνατόν να σχηματιστεί ένα «γαλάκτωμα» καθαρού ελαίου και καθαρού νερού, αλλά οι δύο φάσεις διαχωρίζονται γρήγορα δημιουργώντας ένα σύστημα που αποτελείται από ένα στρώμα ελαίου (χαμηλότερης πυκνότητας) πάνω από ένα στρώμα νερού (υψηλότερης πυκνότητας). Αυτό συμβαίνει επειδή τα σταγονίδια τείνουν να συγχωνεύονται με τα γειτονικά τους σταγονίδια όταν συγκρούονται με αυτά, πράγμα που οδηγεί τελικά σε πλήρη διαχωρισμό φάσεων. Η κινητήρια δύναμη αυτής της διαδικασίας είναι το γεγονός ότι η επαφή μεταξύ των μορίων ελαίου και νερού είναι θερμοδυναμικά δυσμενής, συνεπώς και τα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν, καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων παίζει και η κινητική. Είναι δυνατό να παρασκευασθούν γαλακτώματα που είναι σταθερά (μετασταθή) για αποδεκτό χρονικό διάστημα (μερικές ημέρες, εβδομάδες, μήνες ή χρόνια), μέσω τέτοιων δρόμων της κινητικής. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη των επονομαζόμενων σταθεροποιητών ή/και γαλακτωματοποιητών. Η θερμοδυναμική ωστόσο, είναι αδήριτη και μακροχρόνια το γαλάκτωμα θα καταστραφεί (Παναγιώτου, 1998).

Συνοψίζοντας, ο όρος «σταθερότητα των γαλακτώματων» αναφέρεται στην ικανότητα που έχουν τα γαλακτώματα να αντιστέκονται στις αλλαγές των ιδιοτήτων τους με την πάροδο του χρόνου: πιο σταθερά γαλακτώματα συνεπάγεται με την πιο αργή αλλαγή των ιδιοτήτων τους. Ένα γαλάκτωμα μπορεί να καταστεί ασταθές λόγω διαφόρων τύπων φυσικών και χημικών διαδικασιών. Στη φυσική αστάθεια επακολουθεί μια μεταβολή της κατανομής του χώρου ή οργάνωση της δομής των μορίων. Παραδείγματα φυσικών ασταθειών είναι η αποβουτύρωση, η κροκίδωση, η συνένωση ενώ η οξείδωση και η υδρόλυση είναι κοινά παραδείγματα της χημικής αστάθειας.

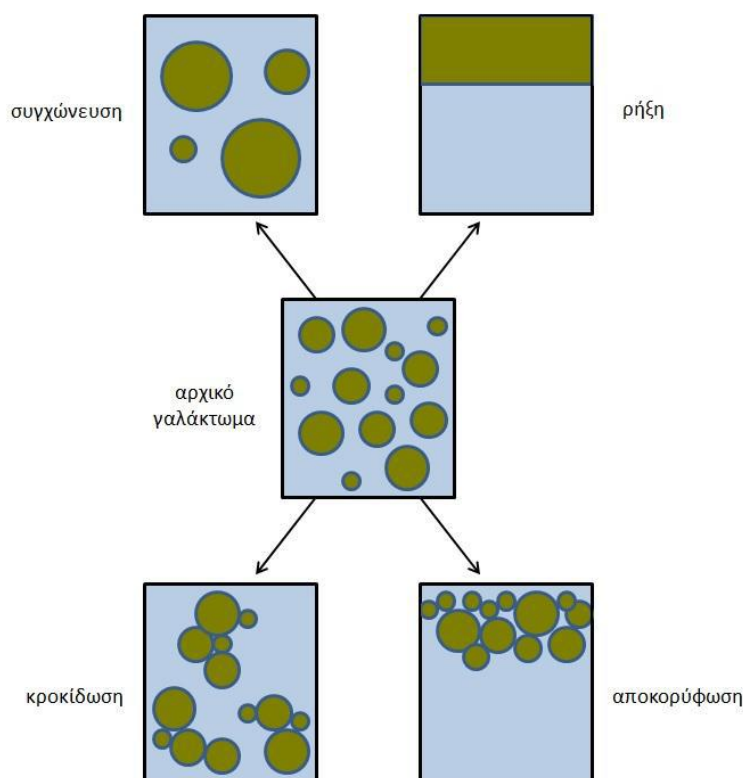


Εικόνα 1 - Φυσικοί μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να αποσταθεροποιήσουν ένα γαλάκτωμα συμπεριλαμβάνουν την αποκορύφωση, την καθίζηση, την κροκίδωση, τη συνένωση και την αναστροφή φάσεων (Απόδοση από (McClements, 2005)).

Κατά την εξέταση της σταθερότητας του γαλακτώματος είναι σημαντικό να αναφερθεί η διάκριση μεταξύ της θερμοδυναμικής σταθερότητας και της κινητικής σταθερότητας. Η θερμοδυναμική μας λέει την συγκεκριμένη διαδικασία που θα προκύψει. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοδυναμική αστάθεια του γαλακτώματος εύκολα αποδεικνύεται αν κάποιος ταράξει ένα κλειστό δοχείο με καθαρό νερό και καθαρό λάδι, και στην συνέχεια θα παρατήρηση την αλλαγή στην εμφάνιση του συστήματος με την πάροδο του χρόνου. Ενώ η κινητική μας λέει τον ρυθμό με τον οποίο θα προχωρήσει και τη εξάρτηση της σταθερότητας με το χρόνο. Όλα τα γαλακτώματα τροφίμων είναι θερμοδυναμικά ασταθές και αν αφεθούν για αρκετό καιρό

καταρρέουν. Για το λόγο αυτό σε μεγάλο βαθμό η κινητική σταθερότητα είναι υπεύθυνη για τη μεγάλη ποικιλία των ιδιοτήτων που εμφανίζονται σε διαφορετικά γαλακτώματα τροφίμων (McClements, 2005).

Πριν εξετασθούν οι γαλακτωματοποιητικές και σταθεροποιητικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γαλακτωμάτων σε διάφορες βιομηχανίες με κυριότερη εκείνη των τροφίμων, αξίζει να αναλυθούν οι βασικοί όροι που σχετίζονται με την σταθερότητα των γαλακτωμάτων και περιγράφουν στην ουσία τους φυσικοχημικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην καταστροφή αυτών. Αυτοί είναι η ρήξη (breaking), η συγχώνευση (coalescence), η αποκορύφωση (creaming) και η κροκίδωση (flocculation) (Παναγιώτου, 1998).



Εικόνα 2 - Οι τέσσερις φυσικοχημικοί μηχανισμοί καταστροφής ενός γαλακτώματος

2.2.1 Συγχώνευση

Συγχώνευση είναι η διαδικασία της συνένωσης δύο σταγονιδίων σε ένα μεγαλύτερο σε όγκο, αλλά μικρότερο σε επιφάνεια. Με την συγχώνευση τα αρχικά σταγονίδια χάνουν την ταυτότητά τους. Αν και η συγχώνευση αλλοιώνει τα χαρακτηριστικά του γαλακτώματος (π.χ. τον αριθμό ή την κατανομή μεγεθών των

δισπαρμένων σταγονιδίων) μπορεί να μη γίνεται μακροσκοπικά αισθητή, παρά μόνο στα τελευταία στάδια, όταν οδηγεί στην ρήξη του γαλακτώματος. Η ρήξη ενός γαλακτώματος είναι ο σαφής διαχωρισμός του σε δύο ογκώδεις φάσεις.

2.2.2 Κροκίδωση

Η κροκίδωση αναφέρεται στην συσσώρευση σταγονιδίων με σχηματισμό χαλαρών δομών τύπου «τσαμπιού σταφυλιού». Κατά την κροκίδωση τα αρχικά σταγονίδια διατηρούν την ταυτότητά τους, με συνέπεια η κροκίδωση να είναι πολλές φορές μία αντιστρεπτή διαδικασία. Ωστόσο, τόσο η κροκίδωση όσο και η συγχώνευση θεωρούνται μηχανισμοί συσσώρευσης σταγονιδίων.

2.2.3 Αποκορύφωση

Η αποκορύφωση παρατηρείται με την πάροδο του χρόνου σχεδόν σε όλα τα γαλακτώματα, στα οποία υπάρχει μία διαφορά πυκνοτήτων στις δύο φάσεις. Η αποκορύφωση περιγράφει την προς τα πάνω κίνηση των σταγονιδίων λόγω του γεγονότος ότι έχουν χαμηλότερη πυκνότητα από το περιβάλλον υγρό (η αντίστροφη πορεία τους όταν έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το περιβάλλον υγρό ονομάζεται αντιστοίχως καθίζηση). Το ιξώδες του περιβάλλοντος υγρού, δηλαδή του μέσου διασποράς, παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό αποκορύφωσης των γαλακτωμάτων. Επίσης, η αποκορύφωση σχετίζεται με την κροκίδωση κατά το ότι τα αρχικά σταγονίδια διατηρούν την ταυτότητά τους και θεωρείται όπως και αυτή, αντιστρεπτή διεργασία, δηλαδή το σύστημα μπορεί να επαναγαλακτωματοποιηθεί με την χρήση ελάχιστης ενέργειας.

2.2.4 Άλλοι μηχανισμοί

Στα γαλακτώματα που απαντώνται στον τομέα των τροφίμων παρατηρούνται ακόμα δύο μηχανισμοί αποσταθεροποίησης και πιο συγκεκριμένα η ωρίμανση κατά Ostwald (Ostwald ripening) και η αναστροφή φάσης (phase inversion). Η ωρίμανση κατά Ostwald συνεπάγεται την ανάπτυξη μεγάλων σταγονιδίων εις βάρος των μικρότερων λόγω της διάχυσης της δισπαρμένης φάσης μέσω της συνεχούς φάσης. Η κινητήρια δύναμη για αυτή τη διαδικασία είναι το γεγονός ότι η διαλυτότητα μιας ουσίας εντός ενός σταγονιδίου στη συνεχή φάση που την περιβάλλει, αυξάνει με τη μείωση της ακτίνας των σταγονιδίων. Η αναστροφή φάσης είναι η διαδικασία με την οποία το γαλάκτωμα W/O μετατρέπεται σε γαλάκτωμα O/W ή αντίστροφα. Η αναστροφή φάσης συνήθως προκαλείται από κάποια μεταβολή στη σύνθεση ή τις

περιβαλλοντικές συνθήκες ενός γαλακτώματος (π.χ. του κλάσματος όγκου της διεσπαρμένης φάσης, του τύπου ή της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή, της θερμοκρασίας κ.ά.).

2.3 Γαλακτωματοποιητές και τροποποιητές υφής

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση κατάλληλων προσθέτων. Τα πρόσθετα αυτά συστατικά ονομάζονται σταθεροποιητές και ταξινομούνται είτε ως γαλακτωματοποιητές είτε ως τροποποιητές υφής, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους.

Οι γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειακά ενεργά μόρια τα οποία απορροφούνται στην επιφάνεια των προσφάτως σχηματισμένων σταγονιδίων κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, σχηματίζοντας μια προστατευτική μεμβράνη που εμποδίζει τα σταγονίδια να έλθουν αρκετά κοντά για να συσσωματωθούν. Ο τρόπος με τον οποίο αποτρέπεται αυτή η συγχώνευση μπορεί να εξηγηθεί με αρκετούς τρόπους και ένα πλήθος θεωριών. Οι βασικότεροι μηχανισμοί είναι δύο (Ritzoulis C. , Introduction to the physical chemistry of foods, 2013):

- i. Τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται στερεοχημικά, οπότε ένα στρώμα προσροφημένων στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού ουσιών, σε κάθε ένα από τα προσεγγίζοντα σταγονίδια, αποτρέπει την τελική συγχώνευσή τους, λόγω ανάπτυξης αμοιβαίων απώσεων. Ο μηχανισμός αυτός απαντάται συνήθως με τη χρήση μορίων μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. πολυσακχαρίτες).
- ii. Τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται ηλεκτροστατικά, οπότε αυξάνεται στιγμιαία η πυκνότητα των φορτισμένων γαλακτωματοποιητών μικρού μοριακού βάρους σε δύο προσεγγίζοντα σωματίδια, με αποτέλεσμα την αμοιβαία άπωση (φαινόμενο Gibbs-Marangoni). Ο μηχανισμός αυτός απαντάται συνήθως με τη χρήση μορίων μικρού μοριακού βάρους.

Οι περισσότεροι γαλακτωματοποιητές είναι αμφίφιλα μόρια, δηλαδή, έχουν πολικές και μη πολικές περιοχές στο ίδιο μόριο, ενώ μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, τα μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους, τα λεπτομερώς καταμερισμένα σταθερά και τα επιφανειοδραστικά ή τασιενεργά υλικά με μικρό μοριακό βάρος. Οι συνηθέστεροι γαλακτωματοποιητές που

χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων είναι μικρά επιφανειοδραστικά μόρια, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (McClements, 2005).

Τόσο στα φυσικά όσο και στα τεχνητά γαλακτώματα, οι μακρομοριακοί γαλακτωματοποιητές παίζουν ένα σημαντικό ρόλο, τόσο στην παρασκευή, όσο και στην σταθεροποίηση του γαλακτώματος. Μακρομόρια φυσικής προέλευσης, όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο) και διάφορα κόμμεα, αλλά και συνθετικά μακρομόρια, όπως οι πολύ-βινυλικές αλκοόλες, το πολύ-ακρυλικό οξύ και η πολύ-βινυλο πυροδιλόνη, έχουν διάφορα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμα στην τεχνολογία των γαλακτωμάτων. Με κατάλληλη επιλογή της σύστασής τους, τα μακρομόρια αυτά μπορούν να προσροφώνται εκλεκτικά στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού μειώνοντας την τάση προς συγχώνευση, τόσο με τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης, όσο και με τον σχηματισμό «μηχανικών φραγμάτων» μεταξύ των σταγονιδίων. Ο πολυμερικός χαρακτήρας αυτών των ουσιών συνεπάγεται ότι κάθε μόριο μπορεί να προσροφάται στην διεπιφάνεια πολλαπλά, μέσω των διάφορων δομικών μονάδων κατά μήκος της μακροαλύσου του. Συνέπεια αυτού είναι η δραστική μείωση της πιθανότητας εκρόφησης του μακρομορίου από τη διεπιφάνεια κατά τη σύγκρουση δύο σταγονιδίων και η δημιουργία ενός ισχυρού προστατευτικού «στρώματος» γύρω από τα σταγονίδια. Επιπλέον, η παρουσία των μακρομορίων αυτών μπορεί να αυξήσει το ιξώδες της συνεχούς φάσης επιβραδύνοντας έτσι τις διεργασίες καταστροφής του γαλακτώματος (Παναγιώτου, 1998).

Μια δεύτερη κατηγορία αποτελεσματικών γαλακτωματοποιητών είναι τα λεπτομερώς καταμερισμένα στερεά, τα οποία είναι στερεά σωματίδια κολλοειδών διαστάσεων που διαβρέχονται τόσο από την ελαιώδη, όσο και από την υδατική φάση, σχηματίζοντας έτσι «σταθεροποιητικά στρώματα» και δημιουργούν σταθερά γαλακτώματα τύπου είτε O/W ή W/O. Η σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων σε αυτή την περίπτωση, η οποία ονομάζεται και σταθεροποίηση κατά Pickering, στηρίζεται στην ειδική τοποθέτηση των στερεών σωματιδίων στην διεπιφάνεια ώστε να σχηματίζεται ένα ανθεκτικό φράγμα, το οποίο εμποδίζει τη συγχώνευση των σταγονιδίων. Θα πρέπει το μέγεθος των στερεών σωματιδίων να είναι μικρό σε σχέση με το μέγεθος των διεσπαρμένων σταγονιδίων, ενώ επιπλέον, δε θα πρέπει να σχηματίζουν τα ίδια μία σταθερή κολλοειδή διασπορά. Αντίθετα, θα πρέπει να βρίσκονται σε μία κατάσταση κροκίδωσης. Επίσης, θα πρέπει να διαβρέχονται περισσότερο από τη φάση διασποράς (Παναγιώτου, 1998).

Η τρίτη μεγάλη κατηγορία των γαλακτωματοποιητών είναι οι τασιενεργές ή επιφανειοδραστικές ουσίες, οι οποίες προσροφούμενες στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού, εκτός από την μείωση της διεπιφανειακής ενέργειας, δημιουργούν ηλεκτρικά, μηχανικά και στερεοχημικά «φράγματα» έναντι της συγχώνευσης των σταγονιδίων. Γενικά τα προσροφημένα τασιενεργά μόρια δρουν προστατευτικά στην διεπιφάνεια ελαίου-νερού με τους εξής τρόπους (Παναγιώτου, 1998):

- i. Μειώνουν την διεπιφανειακή ενέργεια του συστήματος.
- ii. Δημιουργούν ένα ανθεκτικό φράγμα υψηλού ιξώδους στην διεπιφάνεια το οποίο εμποδίζει την συγχώνευση κατά τη σύγκρουση των σταγονιδίων, λόγω της κίνησης Brown.
- iii. Τα ιονικά τασιενεργά μόρια προσδίδουν ένα φορτίο στην διεπιφάνεια και συνεπώς τα σταγονίδια, ως ομόνυμα φορτισμένα, αποθούνται ενισχύοντας έτσι την σταθερότητα του γαλακτώματος.

Οι τροποποιητές υφής μπορούν από την άλλη μεριά να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τους παχυντές (thickeners) και τους πηκτωματοποιητές (gelling agents), ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους και τα ρεολογικά χαρακτηριστικά των διαλυμάτων τους. Οι παχυντές είναι συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσεως των γαλακτωμάτων, ενώ οι πηκτωματοποιητές για να σχηματίσουν ένα πήκτωμα ή γέλη στη συνεχή φάση των γαλακτωμάτων. Κατά συνέπεια, οι τροποποιητές υφής βελτιώνουν την σταθερότητα του γαλακτώματος καθυστερώντας την κίνηση των σταγονιδίων. Στη βιομηχανία τροφίμων, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι παχυντές και γαλακτωματοποιητές είναι πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες σε γαλακτώματα O/W και κρύσταλλοι λίπους (fat crystals) σε γαλακτώματα W/O, αντίστοιχα. Οι τελευταίοι, εκμεταλλεύονται ουσιαστικά ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των λιπών και των ελαίων, που είναι η ικανότητά τους να υποβάλλονται σε μετάβασης στερεάς-υγρής φάσης σε θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και χειρισμό των γαλακτωμάτων της βιομηχανίας τροφίμων (McClements, 2005).

2.4 Επιλογή του σωστού γαλακτωματοποιητή (HLB)

Η επιλογή του κατάλληλου γαλακτωματοποιητή γίνεται κατά κύριο λόγο με την χρήση του συστήματος υδρόφιλης-υδρόφοβης ισορροπίας, γνωστό και ως HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) και προτάθηκε πρώτη φορά το 1949 από τον

Griffin. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται μία διαβάθμιση από το 0 έως το 20, για να γίνει κατάταξη των γαλακτωματοποιητών βάσει της διαλυτότητάς τους στο νερό και στα έλαια. Χαμηλή τιμή HLB (μικρότερη από 10) υποδηλώνει γαλακτωματοποιητή με υδρόφοβο (λιπόφιλο) χαρακτήρα, ενώ τιμή HLB (μεγαλύτερη από 10) υποδηλώνει υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή. Επομένως, ο τύπος του γαλακτώματος που θα σχηματιστεί εξαρτάται από την τιμή HLB του γαλακτωματοποιητή. Γενικά, γαλακτωματοποιητές με τιμές HLB 3-8 έχουν την τάση να σχηματίζουν γαλακτώματα W/O, ενώ γαλακτωματοποιητές με τιμές 10-20 γαλακτώματα O/W.

Ο υπολογισμός της τιμής HLB πραγματοποιείται πειραματικά, αλλά υπάρχουν δημοσιευμένοι στη βιβλιογραφία και σχετικοί πίνακες. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που το συγκεκριμένο σύστημα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο του γαλακτώματος που πρόκειται να παραχθεί, δεν μας δίνει καμία πληροφορία αναφορικά με τις συγκεντρώσεις των φάσεων που απαιτούνται (Ασημοπούλου, 2008).

3. Αξιοποίηση υπολειμμάτων της βιομηχανίας τροφίμων

3.1 Γενικά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα υδροκολλοειδή βρίσκουν εδώ και πολλά χρόνια ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και σε άλλες βιομηχανίες, όπως εκείνες των φαρμάκων και των καλλυντικών. Λόγω αυτού, η ερευνητική κοινότητα σε συνεργασία με τη βιομηχανία βρίσκονται σε διαρκή αναζήτηση νέων υδροκολλοειδών και ένας τομέας στον οποίο έχουν στραφεί είναι τα απόβλητα (υπολείμματα) πρωτογενών και δευτερογενών διεργασιών παραγωγής τροφίμων. Εκτός αυτού, η αξιοποίηση των αποβλήτων των βιομηχανιών τροφίμων έχει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας της οικονομικής αποδοτικότητάς του, καθώς αυτά τα υπολείμματα μπορεί να είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες, ενώ η αποκομιδή και απόρριψή τους είναι τις περισσότερες φορές δυσανάλογα δαπανηρή.

Εκτός όμως των ερευνητών και των βιομηχανιών που βρίσκονται σε μια διαρκή αναζήτηση αξιοποιήσιμων υλικών, υπάρχει φυσικά και το καταναλωτικό κοινό, το οποίο τα τελευταία χρόνια έχει αυξήσει το ενδιαφέρον του ως προς την ασφάλεια των προϊόντων που αντί για φυσικής προέλευσης υλικά περιέχουν ενδεχομένως συνθετικές χημικές ουσίες, ύποπτες ότι προκαλούν ή προάγουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (Djilas, Canadanovix-Brunet, & Cetkovic, 2009), αλλά έχει πλέον εστιαστεί και στο γεγονός πως ακόμα και πολλά από τα φυσικής προέλευσης υλικά που χρησιμοποιούνται είναι ζωικής αντί φυτικής προέλευσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της ζελατίνης, ενός υδροκολλοειδούς που όπως αναφέρθηκε παραπάνω χρησιμοποιείται στην γαλακτοβιομηχανία, καθώς και σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών των βιομηχανιών τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών (Karim & Bhat, 2008).

Η ζελατίνη είναι ένα υλικό που λαμβάνεται με μερική υδρόλυση κολλαγόνου, το οποίο προέρχεται από ζωικό δέρμα, λευκό συνδετικό ιστό και οστά. Μέχρι στιγμής, οι κύριες πηγές εμπορικής ζελατίνης περιορίζονται σε δέρματα και οστά χοίρων ή αγελάδων, ίσως λόγω και του σχετικά χαμηλού κόστους για την ανάκτησή τους. Λόγω ακριβώς της ζωικής προέλευσης αυτού του παραπροϊόντος της βιομηχανίας τροφίμων, υπάρχουν από συγκεκριμένες κοινωνικές (χορτοφάγοι καταναλωτές) και θρησκευτικές (καταναλωτές χαλάλ και κοσέρ) ομάδες, εδώ και πολλά χρόνια, ενστάσεις για την ενσωμάτωσή του σε εδώδιμα, κυρίως προϊόντα. Επιπλέον,

ιδιαίτερα στην Ευρώπη, με την εμφάνιση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών («ασθένεια των τρελών αγελάδων» ή νόσος Creutzfeldt-Jacobs) προέκυψαν και υγειονομικά θέματα με τη χρήση της ζελατίνης και κατά πόσο αυτή είναι ασφαλής (Morrison, Clark, Chen, Talashek, & Sworn, 1999).

Μία από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες τροφίμων στην Ελλάδα, αλλά και σε άλλες Μεσογειακές χώρες, είναι η ελαιουργία. Τα στερεά υπολείμματα αυτής είναι πλούσια σε διάφορα συστατικά, μεταξύ άλλων και μη τοξικών, φυσικών βιοπολυμερών, που μπορούν εν γένει να καταστούν εκμεταλλεύσιμα, δίνοντας προστιθέμενη αξία σε μέχρι σήμερα μη αξιοποιήσιμα υλικά.

3.2 Υπολείμματα ελαιοτριβείων

Η βιομηχανία ελαιολάδου και η ελαιοκαλλιέργεια αποτελούν έναν από τους βασικούς πυλώνες της οικονομίας και της κοινωνίας τόσο της Ελλάδας, όσο και των υπολοίπων μεσογειακών χωρών όπου παράγεται περισσότερο από 98% του παγκόσμιου ελαιολάδου (υπολογίζεται ότι είναι 2,5 εκατομμύρια τόνοι ετησίως), ενώ οι μεγαλύτεροι παραγωγοί ελαιολάδου είναι η Ισπανία, η Ιταλία, η Ελλάδα και η Πορτογαλία. Το ελαιόλαδο έχει εξαιρετικές θρεπτικές ιδιότητες και η κατανάλωσή του, που παραδοσιακά περιοριζόταν στην περιοχή της Μεσογείου αγγίζοντας το 77% της παγκόσμιας παραγωγής, αυξάνεται μέσω των εξαγωγών σε παγκόσμια κλίμακα, ωθώντας χώρες όπως η Αργεντινή, η Αυστραλία, οι ΗΠΑ και η Νότια Αφρική να αναδειχθούν ως παραγωγοί προωθώντας την εντατική καλλιέργεια ελαιόδεντρων. Αυτό είχε ως συνέπεια, την τελευταία δεκαετία, η παραγωγή ελαιολάδου να αυξηθεί παγκοσμίως κατά περίπου 40% (Dermeche, Nadour, Larroche, Moulti-Mati, & Michaud, 2013).

Παρόλα αυτά, η βιομηχανία ελαιολάδου παράγει μεγάλες ποσότητες δύο παραπροϊόντων, ένα στερεό υπόλειμμα και ένα υγρό που είναι γνωστό ως «κατσίγαρος». Μάλιστα, η συγκεκριμένη βιομηχανία θεωρείται ως μία από τις πιο ρυπογόνες μεταξύ των βιομηχανιών τροφίμων (Arvanitoyiannis, Kassaveti, & Stefanatos, 2007), καθώς και τα δύο παραπροϊόντα είναι επιβλαβή για το περιβάλλον. Ειδικά για τον κατσίγαρο, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει τις αρνητικές του επιπτώσεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους (Paredes, Moreno, Ramos-Cormenzana, & Martinez, 1987), στα υδρόβια οικοσυστήματα (DellaGreca, Monaco,

Pinto, Pollio, Previtiera, & Temusi, 2001) και στον αέρα μέσω των εκπομπών φαινόλης και διοξειδίου του θείου (Rana, Rinaldi, & Introna, 2003).

Η σύνθεση του κατσίγαρου ποικίλλει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές πρακτικές, τον χρόνο αποθήκευσης του ελαιολάδου και τη διαδικασία εξαγωγής αυτού (πρεσάρισμα, διφασική ή τριφασική μέθοδος). Εκτός του νερού, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό του σε ποσοστό 83-92%, αποτελείται επίσης από φαινολικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες και διάφορα οργανικά οξέα, ενώ περιέχει και πολύτιμα υλικά, όπως μεταλλικά θρεπτικά συστατικά (π.χ. κάλιο) που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επαναχρησιμοποιηθούν ως λίπασμα, αφού όμως απομακρυνθούν τα προαναφερόμενα φαινολικά που έχουν αποδεδειγμένα τοξική και αντιμικροβιακή δράση (Mekki, Dhoub, & Sayadi, 2009) (Piotrowska, Rao, Scotti, & Gianfreda, 2011). Παρόλα αυτά, και ιδιαίτερα στην Ελλάδα, η συνήθης πρακτική που ακολουθείται για τον κατσίγαρο είναι η απόρριψή του στη θάλασσα, σε ποτάμια ή στο έδαφος, ενώ στην καλύτερη περίπτωση πραγματοποιείται εξουδετέρωσή του με ασβέστη και στη συνέχεια η διάθεσή του σε δεξαμενές εξάτμισης. Όμως, ακόμα και η κατασκευή των δεξαμενών εξάτμισης σπάνια πληροί τα κατάλληλα τεχνικά κριτήρια για την σταθερή και ασφαλή αποθήκευση των υγρών υπολειμμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο κατσίγαρος να καταλήγει σε γειτονικά συστήματα (γεωργικά εδάφη, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα) είτε επειδή η βάση των δεξαμενών είναι διαπερατή, είτε λόγω υπερχειλίσης από αυτήν (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006) (Kavvadias, Doula, Komnitsas, & Liakopoulou, 2010).

Όσον αφορά στα στερεά υπολείμματα των ελαιοτριβείων, τα οποία είναι και η πρώτη ύλη των βιοπολυμερών που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική διατριβή, περιέχουν θραύσματα φλοιού, πούλπα, κομμάτια πυρήνων (κουκουτσιών) και λίγο λάδι. Το εναπομένον λάδι ανακτάται συνήθως με χρήση διαλυτών ή με δεύτερη φυγοκέντρωση, οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής ελαιολάδου (Dermeche, Nadour, Larroche, Moulti-Mati, & Michaud, 2013), ενώ μέσω εκχυλίσεων των πυρήνων των στερεών υπολειμμάτων λαμβάνεται το «πυρηνέλαιο», που βρίσκεται εφαρμογές κυρίως στη σαπωνοποιία ή πωλείται για βρώση μετά τον εξευγενισμό του. Τέλος, τα στερεά υπολείμματα συμπιέζονται σε μπρικέτες για τη χρήση τους ως καύσιμα (Vitolo, Petarca, & Bresci, 1999) ή οδηγούνται σε δεξαμενές

κομποστοποίησης, για την μετέπειτα εναπόθεσή τους στο έδαφος ως λίπασμα (Chandra & Sathivelu, 2009).

3.3 Σύσταση και αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων των ελαιοτριβείων

Μέχρι σήμερα το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας σχετικά με την ανάκτηση δυνητικά χρήσιμων προϊόντων το έχουν προσελκύσει τα υγρά υπολείμματα της ελαιουργίας, με την έρευνα να εστιάζει στην ανάκτηση πολυφαινολών και συναφών αντιοξειδωτικών ενώσεων (Visioli, et al., 1999). Τα κύρια συστατικά του στερεού υπολείμματος ελαιουργίας είναι πολυσακχαρίτες (ημικυτταρίνες, λιγνίνες, κυτταρίνες, πηκτίνες, κ. ά.), πρωτεΐνες και διάφορα λιπαρά οξέα, καθώς και πολυφαινολικές ενώσεις και άλλες χρωστικές ουσίες. Από τα στερεά υπολείμματα διάφοροι ερευνητές έχουν καταφέρει να απομονώσουν εκτός από πολυφαινολικές ενώσεις (Lozano-Sanchez, Giambanelli, Quirantes-Pine, Bendini, Segura-Carretero, & Fernandez-Gutierrez, 2011) και τα πολυσακχαρικά μόρια που περιέχονται σε αυτά. Εκτός της αδιάλυτης κυτταρίνης, η οποία είναι ο κύριος πολυσακχαρίτης της ελιάς, υπάρχουν όπως προαναφέρθηκε και άλλοι πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά και άλλων βιομηχανιών (Gil-Serrano & Tejero-Matero, 1988), σαν γαλακτωματοποιητές ή τροποποιητές υφής. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αναφερθεί ότι οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες των στερεών υπολειμμάτων διάφορων ποικιλιών ελιάς προέρχονται κυρίως από τα τοιχώματα των καρπών και αποτελούνται κατά κύριο λόγο από αραβινόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαννόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και γαλακτουρονικό οξύ (Cardoso, Coimbra, & Da Silva, 2003) (Vierhuis, Korver, Schols, & Voragen, 2003). Αυτό υποδηλώνει ότι τα στερεά υπολείμματα ελιάς μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμη πηγή βιοπολυμερών.

Τα βιοπολυμερή αυτά, για να ανακτηθούν, μπορούν να διαλυθούν με διαδοχικές εκχυλίσεις σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και να απομονωθούν από το υπόλοιπο αδιάλυτο κυτταρινικό υπόλειμμα μέσω καθίζησης μετά την προσθήκη αιθανόλης στην οποία είναι αδιάλυτα (Coimbra, Waldron, & Selvendran, 1994), για αυτό το λόγο και πολλές φορές ονομάζονται αδιάλυτα σε αλκοόλη στερεά (AIS-Alcohol Insoluble Solids). Επιπλέον, έχει ήδη καταγραφεί στη βιβλιογραφία η απομόνωση υδροκολλοειδών από φρέσκους καρπούς ελιάς, μέσω διαδοχικών

εκχυλίσεων με υψηλές αποδόσεις ανάκτησης υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών (Vierhuis, Korver, Schols, & Voragen, 2003), μέθοδος που θα μπορούσε να βρει εφαρμογή και στα στερεά υπολείμματα ελαιουργίας.

4. Τεχνικές φυσικοχημικού χαρακτηρισμού

4.1 Γενικά

Τα υδροκολλοειδή που ελήφθησαν κατόπιν κομποστοποίησης των υπολειμμάτων ελαιοτριβείων, υπεβλήθησαν σε διάφορες τεχνικές με σκοπό τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τους. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR- Fourier Transform Infra Red spectroscopy), καθώς και η τεχνική χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC – Size Exclusion Chromatography). Ο προσδιορισμός του φορτίου των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση του ζ-δυναμικού, ενώ η ενεργή διάμετρος των σωματιδίων των εκχυλισμάτων έγινε μέσω της τεχνικής της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS – Dynamic Light Scattering). Τέλος, τα γαλακτώματα μελετήθηκαν και με τις τεχνικές της κρεμάμενης και επικαθήμενης σταγόνας για να προσδιοριστούν όλα τα διεπιφανειακά φαινόμενα, ενώ έγινε και χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για την μελέτη των λιποσφαιρίων και των πρωτεϊνών των γαλακτωμάτων.

4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

4.2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC – Size Exclusion Chromatography) ή χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (GPC – Gel Permeation Chromatography) είναι μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας σύμφωνα με την οποία διάλυμα πολυμερούς διαβιβάζεται μέσω μιας χρωματογραφικής στήλης περιέχουσας έντονα διασταυρωμένη πηκτή, η οποία έχει μια κατανομή διάφορων μεγεθών μικροπόρων. Καθώς τα μεγαλύτερα μακρομόρια του πολυμερούς αποκλείονται από τους περισσότερους μικροπόρους, εξέρχονται ταχύτερα από το άκρο της στήλης, χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής. Στη συνέχεια, ακολουθούν τα υπόλοιπα κλάσματα με διαρκώς μειούμενο μοριακό βάρος. Τα μικρότερα μόρια μπορούν να εισέλθουν σε περισσότερους μικροπόρους και επομένως δαπανούν περισσότερο χρόνο μετακινούμενα από μικροπόρο σε μικροπόρο κατά μήκος της στήλης. Έτσι, τα μόρια διαχωρίζονται βάσει μεγέθους, με τα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους να εξέρχονται πρώτα. Παρακολουθώντας με κατάλληλους ανιχνευτές (π.χ. ανιχνευτή διάθλασης RI ή ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας UV) την σχετική συγκέντρωση των εξερχόμενων κλασμάτων λαμβάνεται χρωματογράφημα.

Για να μετατραπεί το χρωματογράφημα αυτό σε κατανομή μοριακών βαρών, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα μονοδιάσπαρτα δείγματα ενός πολυμερούς με γνωστό μοριακό βάρος (π.χ. πολυστυρένιο ή δεξτράνη). Με αυτόν τον τρόπο, θα είναι γνωστός ο χρόνος συγκράτησης στη στήλη μορίων συγκεκριμένου μοριακού βάρους και ως εκ τούτου, ο άξονας του χρόνου έκλουσης μπορεί να μετατραπεί σε ισοδύναμο άξονα μοριακών βαρών. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι με την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών δεν μετράται πραγματικά η μοριακή μάζα, αλλά ο υδροδυναμικός όγκος του πολυμερούς, ο οποίος εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από την ποιότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη (Παναγιώτου, 2006).

Πρέπει να αναφερθεί ότι η σύγκριση του χρόνου έκλουσης των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα πολυμερούς με εκείνου των πρότυπων δειγμάτων (π.χ. πολυστυρενίου ή δεξτρανών) μπορεί να παρέχει μόνο μία ένδειξη της τάξης μεγέθους για τις εκλούμενες κορυφές και επομένως όχι ακριβή προσδιορισμό του μοριακού βάρους (Gaborieau & Castignolles, 2011). Αυτό συμβαίνει διότι η διακλάδωση και η σύσταση δύναται να έχουν μια κυρίαρχη επίδραση στη δομή του πολυμερούς και στις φυσικές του διαστάσεις (Ritzoulis C. , Introduction to the physical chemistry of foods, 2013).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των υδροκολλοειδών που εκχυλίστηκαν από υπολείμματα ελαιοτριβείων.

4.3 Φασματοσκοπικές και φασματοφωτομετρικές τεχνικές

4.3.1 Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η φασματοφωτομετρία υπερύθρου (IR – Infrared Spectroscopy) είναι μία από τις καλύτερες τεχνικές για τη διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και ταυτοποίησης οργανικών ενώσεων, με ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική χημεία, στην Φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.λπ.

Η απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή του υπερύθρου προκαλεί διεγέρσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών σταθμών δονήσεως και περιστροφής του μορίου, ενώ το μόριο παραμένει στη θεμελιώδη ηλεκτρονική κατάσταση. Τα λαμβανόμενα

φάσματα υπερύθρου χαρακτηρίζονται από ταινίες απορρόφησης μικρού εύρους, σε αντίθεση με τα φάσματα υπεριώδους – ορατού, που προκαλούνται από ηλεκτρονικές μεταπτώσεις και χαρακτηρίζονται από ταινίες απορρόφησης μεγάλου εύρους.

Ένα μόριο θα απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Ο θεωρητικός αριθμός των βασικών δονήσεων ενός μορίου είναι συνάρτηση του αριθμού των ατόμων και της γεωμετρίας του.

Οι δονήσεις διακρίνονται σε δονήσεις τάσης ή εκτατικές δονήσεις (stretching vibrations) και δονήσεις κάμψης (bending vibrations). Στις δονήσεις τάσης, που συμβολίζονται με ν , η δόνηση γίνεται κατά μήκος του χημικού δεσμού, που συνδέει τα δονούμενα άτομα και αλλάζει η απόσταση μεταξύ τους και η δόνηση μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη. Στις δονήσεις κάμψης, που συμβολίζονται με δ , αλλάζει η γωνία μεταξύ δύο δεσμών, και η δόνηση μπορεί να είναι ψαλιδοειδής (scissoring) ή λικνιζόμενη (rocking) ή παλλόμενη (wagging) ή συστρεφόμενη (twisting).

Σε πολλές από τις βασικές δονήσεις συμμετέχουν κυρίως δύο άτομα και ο χημικός δεσμός του, π.χ. A-B. οι συχνότητες τέτοιων δονήσεων εξαρτώνται κυρίως από τις μάζες των δονούμενων ατόμων A και B (τα άτομα A και B εκτελούν ταλάντωση, σαν να επρόκειτο για δύο σφαίρες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με ελατήριο) και από την ισχύ του δεσμού A-B, και επηρεάζονται σε μικρό βαθμό από άλλα άτομα που συνδέονται μαζί τους.

Στη φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT – IR – Fourier Transform Infra-Red spectroscopy), το συμβολόγραμμα (interferogram) μετασχηματίζεται κατά Fourier με τη βοήθεια υπολογιστή σε ένα τυπικό φάσμα IR (%T συναρτήσει $\bar{\nu}$). Πλεονεκτήματα της τεχνικής FT – IR είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησής της στο άπω IR, όπου η ενέργεια των φωτονίων είναι μικρή (μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί και σε όλη την περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας), ο αυξημένος λόγος σήματος προς θόρυβο, η μεγάλη διακριτική ικανότητα και η ταχεία σάρωση και καταγραφή του φάσματος (Χατζηϊωάννου, 2003).

Για την μη επεμβατική μέτρηση με IR, χρησιμοποιείται η τεχνική της αποσβεσθείσας ολικής ανάκλασης (ATR – Attenuated Total Reflectance). Στην περίπτωση αυτή, η δέσμη IR διέρχεται διαμέσου ενός κρυστάλλου ATR με τρόπο που ανακλάται από την εσωτερική επιφάνεια του κρυστάλλου και δημιουργεί αποσβεσμένο κύμα, το οποίο προεκβάλλει κάθετα πάνω στο δείγμα, σε άμεση επαφή με τον κρύσταλλο. Μέρος της ενέργειας του κύματος αυτού απορροφάται από το δείγμα και το υπόλοιπο, που είναι η ανακλώμενη ακτινοβολία, επιστρέφεται στον ανιχνευτή. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης, το οποίο λαμβάνει χώρα όταν μια δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας σε ένα μέσο χαμηλότερης. Το βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι το δείγμα χρειάζεται πολύ μικρή ή και καθόλου προετοιμασία με ελάχιστη ή και καθόλου απώλεια αυτού, ενώ παρέχει τη δυνατότητα να εξεταστούν τόσο στερεά δείγματα, όσο και υγρά (Δημοπούλου, 2017).

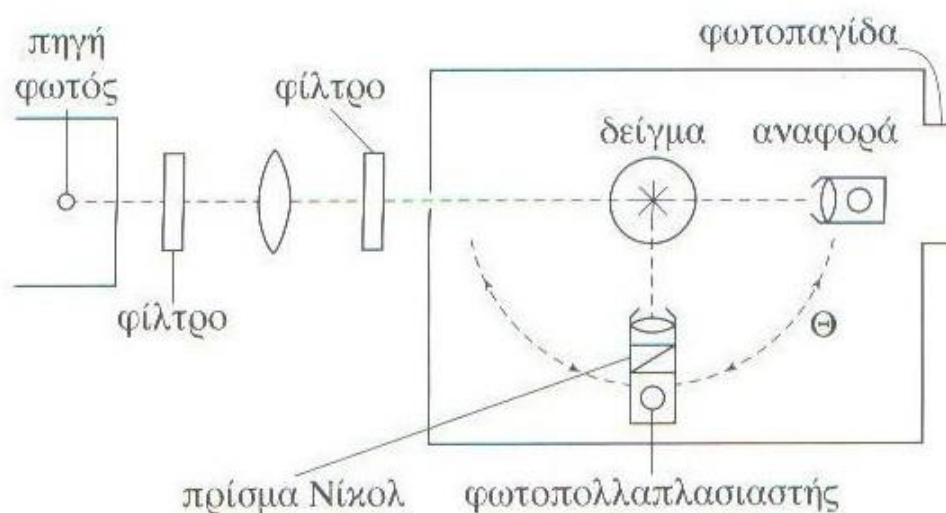
Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή η φασματοσκοπία FT – IR χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των υδροκολλοειδών που εκχυλίστηκαν από υπολείμματα ελαιοτριβείων.

4.3.2 Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

Η σκέδαση του φωτός (light scattering) θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες πειραματικές τεχνικές στον τομέα των κολλοειδών και ιδιαίτερα των διαλυμάτων πολυμερών, καθώς συμβάλλει στον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων μεταξύ 0,01 έως 1000μm κι έτσι καθίσταται επαρκής μέθοδος για τον χαρακτηρισμό των περισσοτέρων σταγονιδίων που βρίσκονται στα γαλακτώματα των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίζονται το μοριακό βάρος MW, η γυροσκοπική ακτίνα R_g και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής (virial) B. Ο Faraday ήταν αυτός που πρώτος προσπάθησε να μελετήσει συστηματικά τις οπτικές ιδιότητες των κολλοειδών κατά τον περασμένο αιώνα. Ο Faraday θεώρησε τη σκέδαση λεπτής δέσμης φωτός από τα παρασκευάσματά του με το χρυσό ως ένδειξη ότι ο χρυσός βρίσκεται υπό μορφή λεπτών αόρατων σωματιδίων στο σύστημά του. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι έκανε την παρατήρηση αυτή κατ' αναλογία με την παρατήρηση της σκέδασης του φωτός από τη σκόνη σε ένα σκοτεινό δωμάτιο, όπου επιτρέπεται να εισέλθει λεπτή ακτίνα φωτός. Στη συνέχεια, τις μελέτες αυτές συνέχισε ο Tyndall και για αυτό το λόγο το παραπάνω φαινόμενο έμεινε γνωστό ως φαινόμενο Tyndall (Παναγιώτου, 1998).

Κατά το φαινόμενο Tyndall, όταν δέσμη φωτός προσπίπτει σε κolloειδές διάλυμα, ένα μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας διέρχεται δια του διαλύματος και το υπόλοιπο σκεδάζεται (διαχέεται) προς όλες τις κατευθύνσεις. Μία πάρα πολύ μικρή σκέδαση του φωτός λαμβάνει χώρο και από καθαρά υγρά, ενώ στην περίπτωση διαλυμάτων μακρομορίων, το ποσοστό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των διαλυμάτων «μικρών» μορίων.

Όλη η τεχνική της σκέδασης του φωτός βασίζεται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις, σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Μια τυπική διάταξη της σκέδασης του φωτός παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 (Παναγιώτου, 1998).



Εικόνα 3 - Σχηματική παράσταση μια διάταξης σκέδασης φωτός (Παναγιώτου, 1998)

Ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι μετακινούμενος και επιτρέπει τη μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (I_{θ}) σε διάφορες κατευθύνσεις (γωνίες θ).

Η στατική σκέδαση φωτός χρησιμοποιείται λοιπόν για τη μελέτη κάθε είδους κolloειδούς διασποράς. Μία από τις κύριες εφαρμογές της που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στη βιομηχανία τροφίμων, είναι ο προσδιορισμός των κατανομών μεγέθους των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων (Coupland & McClements, 2001). Η γνώση της αρχικής κατανομής μεγέθους σωματιδίων ενός γαλακτώματος είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη της μακροχρόνιας σταθερότητάς του ως προς την αποκορύφωση, την κροκίδωση, τη συγχώνευση και την ωρίμανση κατά Ostwald, που μπορεί να συμβεί όταν λόγω της αύξησης της πίεσης Laplace εντός ενός σφαιρικού σώματος η ακτίνα του αυξάνεται τόσο, ώστε να ξεπεράσει ένα ορισμένο όριο

(threshold) (Cosgrove, 2010), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις προκύπτει όταν η διεσπαρμένη ελαιώδης φάση έχει κάποια διαλυτότητα στη συνεχή φάση (Agboola & Dalgeish, 1996). Τα αναλυτικά όργανα που βασίζονται στην στατική σκέδαση φωτός είναι εμπορικά διαθέσιμα εδώ και πολλά χρόνια και χρησιμοποιούνται ευρέως για σκοπούς έρευνας, ανάπτυξης και ποιοτικού ελέγχου. Πολλά από αυτά είναι πλήρως αυτοματοποιημένα, εύχρηστα και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την πλήρη κατανομή μεγέθους των σωματιδίων ενός γαλακτώματος μέσα σε λίγα λεπτά (McClements, 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός των κατανομών του μεγέθους που πραγματοποιείται από τα συγκεκριμένα όργανα γίνεται βάσει της θεωρίας Mie, η οποία βασίζεται στις εξής παραδοχές (Van de Hulst, 1982):

- i. Το σωματίδιο είναι σφαιρικό. Αυτό είναι σημαντικό επειδή λίγα σωματίδια είναι πραγματικά σφαιρικά. Η σκέδαση του φωτός είναι ευαίσθητη ως προς τον όγκο του σωματιδίου και ως εκ τούτου οι διάμετροι των σωματιδίων υπολογίζονται από τη μέτρηση του όγκου του σωματιδίου και θεωρείται ότι ισοδυναμούν με μία σφαίρα αντίστοιχου όγκου.
- ii. Το αιώρημα είναι αραιό. Η συγκέντρωση των σωματιδίων θεωρείται ότι είναι τόσο χαμηλή, που η σκέδαση της ακτινοβολίας μετράται απευθείας από τον ανιχνευτή, και ότι δεν υπάρχει εκ νέου σκέδαση από άλλα σωματίδια πριν φτάσει στον ανιχνευτή.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτικής στατικής σκέδασης φωτός που ήταν συζευγμένος σε σειρά μετά την χρωματογραφική στήλη αποκλεισμού μεγεθών SEC, για την μελέτη υδροκολλοειδών που εκχυλίστηκαν από υπολείμματα ελαιοτριβείων, ενώ με τη βοήθεια μίας ακόμα συσκευής SLS (Mastersizer) μελετήθηκαν τα γαλακτώματα O/W που παρασκευάστηκαν με την προσθήκη υδροκολλοειδών από τα κομποστοποιημένα υπολείμματα των ελαιοτριβείων.

4.3.3 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

Το ζ-δυναμικό (zeta potential) ή ηλεκτροκινητικό δυναμικό είναι το δυναμικό μεταξύ μιας φορτισμένης επιφάνειας και ενός υδατικού ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Ουσιαστικά, χρησιμοποιείται ως μέτρο του ηλεκτρικού φορτίου των σωματιδίων που

είναι διεσπαρμένα σε ένα υγρό και εκφράζει την διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται ανάμεσα στα όρια των φάσεων αυτών (Παναγιώτου, 1998).

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού γίνεται σε mV και μπορεί να προσφέρει μια εικόνα για την σταθερότητα ενός κολλοειδούς διαλύματος. Τυπικά, όσο υψηλότερη (σε απόλυτη τιμή) είναι η τιμή του, τόσο πιο σταθερό θα είναι το κολλοειδές. Πιο συγκεκριμένα, όταν το ζ-δυναμικό ισούται με το μηδέν, το κολλοειδές θα καθιζάνει σε ένα στερεό, ενώ τιμές μικρότερες από 15mV αντιπροσωπεύουν την αρχή της συσσωμάτωσης των σωματιδίων που είναι διεσπαρμένα στο υπό μέτρηση κολλοειδές διάλυμα.

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού σε ένα αιώρημα φορισμένων σωματιδίων πραγματοποιείται εφαρμόζοντας σε αυτό ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τότε τα φορισμένα σωματίδια κατευθύνονται προς το αντίστοιχο ηλεκτρόδιο και διαπιστώνεται κατά αυτόν τον τρόπο το είδος του φορτίου του, ενώ παράλληλα η ταχύτητα με την οποία κινούνται και η οποία εξαρτάται από την πυκνότητα του φορτίου τους, ανιχνεύεται μέσω της σκέδασης μιας ακτίνας laser που διέρχεται από το διάλυμα (διάταξη συσκευής παρόμοια με αυτήν της τεχνικής DLS). Μέσω της μέτρησης της ταχύτητας των σωματιδίων υπολογίζεται η κινητικότητά τους (mobility) και στη συνέχεια μέσω αυτής υπολογίζεται η τιμή του ζ-δυναμικού. Ο υπολογισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση δύο διαφορετικών θεωρητικών μοντέλων, ενώ η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου γίνεται με βάση το μέγεθος των υπό μελέτη σωματιδίων. Τα μοντέλα αυτά είναι το μοντέλο Huckel και το μοντέλο Smoluchowski (Cosgrove, 2010).

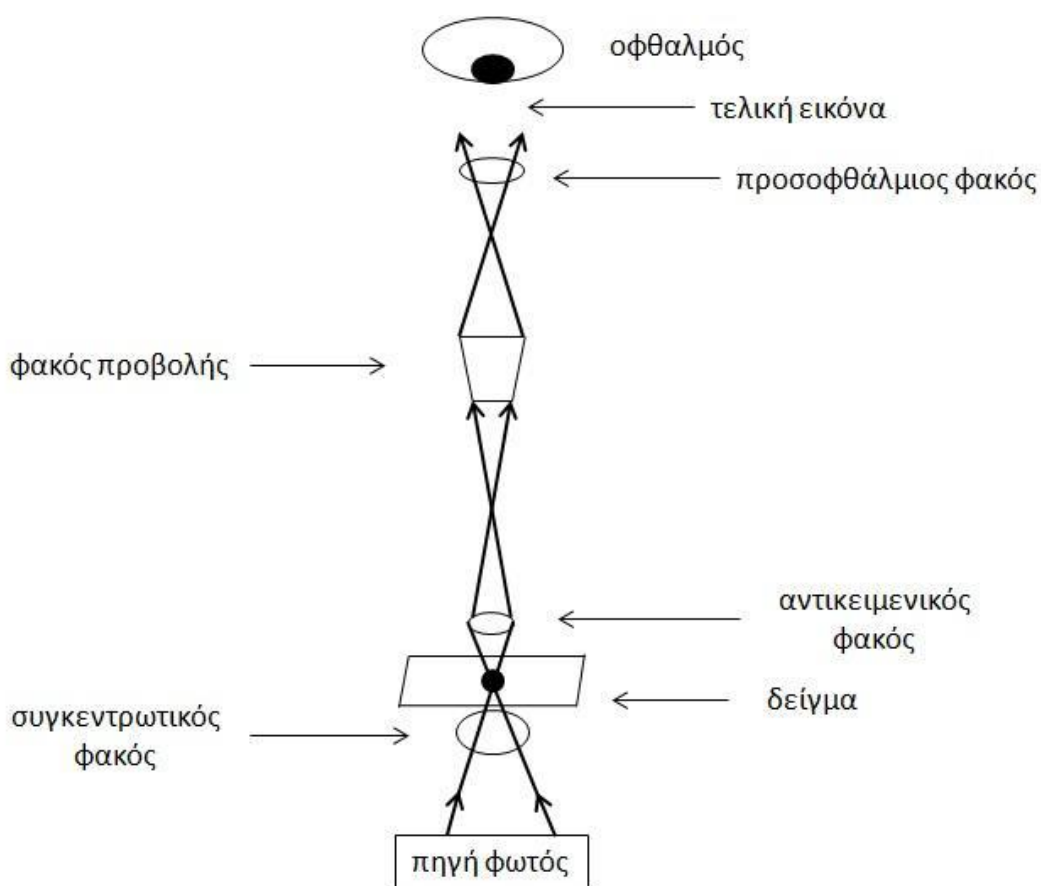
4.4 Τεχνικές μικροσκοπίας

4.4.1 Γενικά

Αν και η οπτική μικροσκοπία αναπτύχθηκε πριν από αιώνες, εξακολουθεί να είναι ένα από τα πιο πολύτιμα εργαλεία για την παρατήρηση αντικειμένων που είναι μικρότερα από 0,1mm (100μm), δηλαδή διαστάσεις που μπορεί να αντιληφθεί χωρίς βοήθεια το ανθρώπινο μάτι. Το οπτικό μικροσκόπιο είναι ένα όργανο το οποίο χρησιμοποιεί ορατό φως προκειμένου να παράγει μια μεγεθυμένη εικόνα τόσο μικρών αντικειμένων. Προκειμένου να γίνει αυτό, το οπτικό μικροσκόπιο δημιουργεί

αρχικά μια μεγεθυμένη εικόνα του δείγματος προσφέροντας υψηλή ανάλυση της εικόνας αυτής, έτσι ώστε να είναι ορατά τα στοιχεία της. Τέλος, καθιστά ορατά αυτά τα στοιχεία στο ανθρώπινο μάτι ή την κάμερα (Murphy, 2002).

Στις αρχές του 17^{ου} αιώνα, οι αδελφοί Janssen στις Κάτω Χώρες και ο Γαλιλαίος στην Ιταλία, έφτιαξαν το πρώτο σύνθετο μικροσκόπιο συνδυάζοντας δύο κυρτούς φακούς, τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο (ή οφθαλμικό), οι οποίοι συνεργάζονται για να παράξουν την τελική μεγέθυνση μιας εικόνας. Το σύνθετο μικροσκόπιο επιτυγχάνει μεγέθυνση δύο σταδίων. Ο αντικειμενικός φακός προβάλλει μια μεγεθυμένη εικόνα στον σωλήνα του μικροσκοπίου και ο προσοφθάλμιος φακός μεγεθύνει περαιτέρω την εικόνα που προβάλλεται από το αντικείμενο. Έτσι, όταν ο παρατηρητής κοιτάζει σε ένα μικροσκόπιο κοιτάζει μόνο μια εικόνα του δείγματος και όχι το ίδιο το δείγμα. Η παρατηρούμενη εικόνα δεν είναι απτή. Είναι απλώς ακριβής σε λεπτομέρεια και σχήμα αναπαράσταση του δείγματος (Abramowitz, 2003).

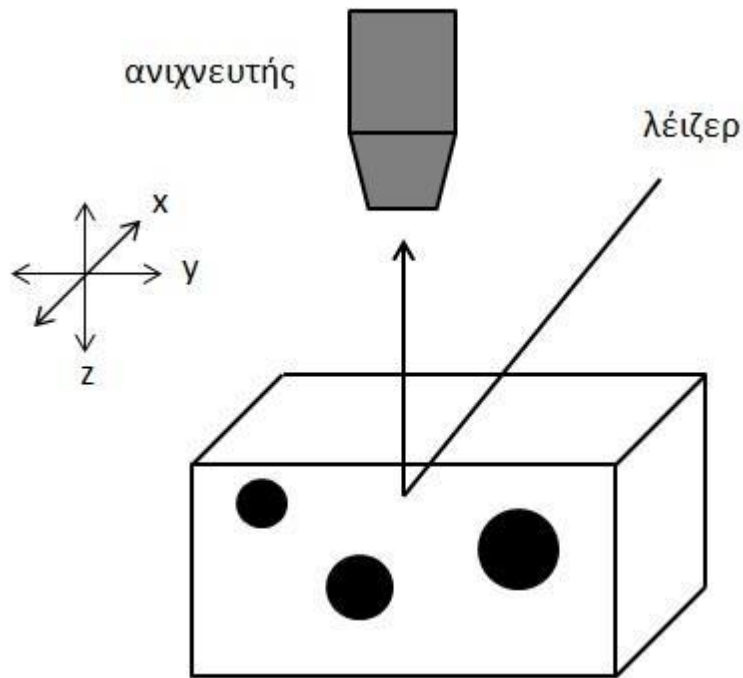


Εικόνα 4 - Αρχή λειτουργίας οπτικού μικροσκοπίου

Τα πιο σημαντικά στοιχεία του μικροσκοπίου είναι ο αντικειμενικός φακός και ο προσοφθάλμιος φακός. Το φως περνάει μέσα από τον συγκεντρωτικό φακό και στη συνέχεια μέσα από το δείγμα. Η βασική λειτουργία του αντικειμενικού φακού είναι να συγκεντρώσει το φως το οποίο διέρχεται μέσω του δείγματος και στη συνέχεια να προβάλλει μια ακριβή ανεστραμμένη εικόνα του δείγματος στο μικροσκόπιο. Ο αντικειμενικός φακός πρέπει να έχει την ικανότητα να ανασυνθέσει τα διάφορα στοιχεία του δείγματος στα διάφορα αντίστοιχα σημεία της εικόνα. Η βασική λειτουργία του προσοφθάλμιου φακού είναι να εξετάσει την εστιασμένη μεγεθυμένη πραγματική εικόνα η οποία προβάλλεται από τον αντικειμενικό φακό και να τη μεγεθύνει για δεύτερη φορά ως εικόνα την οποία βλέπει ο παρατηρητής σε απόσταση περίπου 250mm από το μάτι. Ο προσοφθάλμιος φακός περιλαμβάνει ένα σταθερό διάφραγμα. Στο τελικό στάδιο, ο προσοφθάλμιος φακός, σε συνεργασία με τον κερατοειδή του ματιού και τον φακό του οφθαλμού, εστιάζει την εικόνα στον αμφιβληστροειδή του ματιού του παρατηρητή (Murphy, 2002).

4.4.2 Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)

Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) ή συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM – Laser Scanning Confocal Microscopy) είναι μια τεχνική οπτικής μικροσκοπίας που χρησιμοποιείται για την αύξηση της ευκρίνειας και της αντίθεσης του οπτικού μικροσκοπίου με την τοποθέτηση πολύ μικρού διαφράγματος στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού για την εξάλειψη του φωτός από τα μη εστιασμένα σημεία του αντικειμένου. Αυτή η τεχνική παρέχει εικόνες μεγαλύτερης ευκρίνειας σε σχέση με την συμβατική οπτική μικροσκοπία και συχνά επιτρέπει τη δημιουργία τρισδιάστατων εικόνων δομών χωρίς την ανάγκη φυσικής τομής του δείγματος. Το συνεστιακό μικροσκόπιο εστιάζει μια εξαιρετικά στενή δέσμη λέιζερ σε ένα συγκεκριμένο σημείο του υπό ανάλυση δείγματος και ένας ανιχνευτής μετρά την ένταση του προκύπτοντος σήματος (McClements, 2005).



Εικόνα 5 - Απεικόνιση της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης λέιζερ (LSCM)

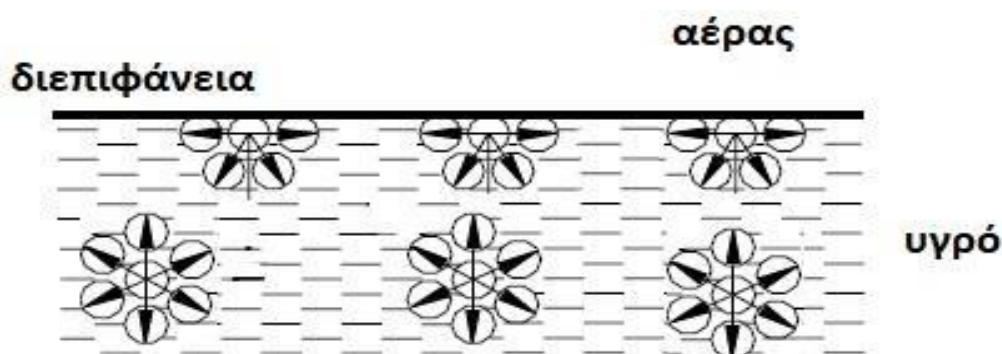
Με ένα συνεστιακό μικροσκόπιο λαμβάνεται μία δισδιάστατη εικόνα πραγματοποιώντας μετρήσεις σε διαφορετικά σημεία στο επίπεδο x-y, είτε με τη μετακίνηση του δείγματος (κρατώντας ακίνητη τη δέσμη ακτίνας λέιζερ) είτε μετακινώντας τη δέσμη λέιζερ (κρατώντας ακίνητο το δείγμα). Η εικόνα δημιουργείται συνδυάζοντας τις μετρήσεις από κάθε μεμονωμένο σημείο. Επίσης, μπορούν να ληφθούν τρισδιάστατες εικόνες εστιάζοντας τη δέσμη λέιζερ σε διαφορετικά κατακόρυφα βάθη (επίπεδο z) του δείγματος και σαρώνοντας στη συνέχεια στην οριζόντια κατεύθυνση (επίπεδο x-y).

Η παρατήρηση της μικροδομής πολυσύνθετων συστημάτων, όπως είναι για παράδειγμα τα γαλακτώματα, διευκολύνεται συχνά με τη χρήση του φυσικού φθορισμού ορισμένων συστατικών ή με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που είτε δεσμεύονται επιλεκτικά με συγκεκριμένα συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες), είτε είναι πιο διαλυτές σε μία φάση από μία άλλη (π.χ. έλαιο έναντι νερού) (Haugland, 1992).

Στην παρούσα διπλωματική διατριβή η συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των γαλακτωμάτων O/W που παρασκευάστηκαν με τα υδροκολλοειδή που εκχυλίστηκαν από υπολείμματα ελαιοτριβείων.

4.5 Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων

Οι διεπιφάνειες που δημιουργούνται μεταξύ δύο φάσεων μπορούν να μελετηθούν ως ξεχωριστά συστήματα, καθώς οι συνθήκες που επικρατούν σε αυτές δεν είναι όμοιες με αυτές που επικρατούν μέσα στις δύο φάσεις. Για παράδειγμα, η επιφάνεια ενός υγρού (διεπιφάνεια υγρού – αέρα) παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά από ότι το εσωτερικό του υγρού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως οι ελκτικές δυνάμεις (van der Waals), που ασκούνται μεταξύ των μορίων του υγρού, δεν είναι εξισορροπημένες. Στο εσωτερικό της υγρής φάσης κάθε μόριο υφίσταται την επίδραση ελκτικών δυνάμεων από τα περιβάλλοντα μόρια, οι οποίες εξισορροπούνται. Αντίθετα, στα επιφανειακά μόρια επιδρούν μονόπλευρα οι ελκτικές δυνάμεις των μορίων του εσωτερικού του υγρού, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας συνισταμένης δύναμης που δρα σε κάθε μόριο της επιφάνειας και τείνει να ελαχιστοποιήσει την επιφάνεια (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 - Δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων στο εσωτερικό ενός υγρού και την διεπιφάνεια μεταξύ του υγρού και του αέρα

Η επιφανειακή τάση γ , αποτελεί μέτρο των ελκτικών δυνάμεων που ασκούνται στα μόρια της επιφάνειας και ορίζεται ως η δύναμη ανά μονάδα μήκους F , που δρα στην επιφάνεια με κατεύθυνση προς το εσωτερικό, σε ένα στοιχείο, δx , μιας φανταστικής γραμμής που τραβιέται στην επιφάνεια.

Οι διαστάσεις της επιφανειακής τάσης είναι [δύναμη/ μήκος].

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την μέτρηση της επιφανειακής τάσης, όπως για παράδειγμα ο ζυγός Du Nouy, η ειδική πλάκα του Wilhelmy (Wilhelmy plate), το σταλαγμόμετρο Traube η πτώση της σταγόνας με τη μορφή νήματος (spinning drop). Από τις μεθόδους αυτές, το σταλαγμόμετρο Traube ενδείκνυται για σχετικά μεγάλες

τιμές του ιξώδους, αλλά και για λεπτόρρευστα υγρά, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ειδικούς σωλήνες. Η δημιουργία σταγόνας με χρήση σύριγγας προς μέτρηση της επιφανειακής τάσης πραγματοποιείται είτε με διατήρηση της σταγόνας σε συνεχή επαφή με τη σύριγγα (pendant drop) είτε ασκώντας συνεχή πίεση στο υγρό (bubble pressure drop).

Τέλος, η πιο διαδεδομένη μέθοδος μέτρησης της επιφανειακής τάσης είναι ο προσδιορισμός της με το όργανο που ονομάζεται τασίμετρο. Το τασίμετρο είναι μία διάταξη που περιλαμβάνει ένα δακτύλιο, ο οποίος επιπλέει στην επιφάνεια του δείγματος ενός υγρού και συνδέεται κατάλληλα με ζυγό ακριβείας. Συνεπώς, ο υπολογισμός της επιφανειακής τάσης γίνεται με τη μέτρηση της δύναμης που απαιτείται για την απόσπαση του δακτυλίου από την εν λόγω επιφάνεια (Παναγιώτου, 1998).

5. Πειραματικό μέρος και παρουσίαση αποτελεσμάτων: Μέθοδοι, υλικά και συσκευές χαρακτηρισμού

5.1 Εισαγωγή

5.2 Μεταχείριση δειγμάτων – παρασκευή γαλακτωμάτων

Τα δείγματα παραλήφθηκαν μετά την κομποστοποίηση και την εκχύλιση των αποβλήτων ελαιοτριβείων της Κεφαλονιάς και μεταχειρίστηκαν αναλόγως της μεθόδου χαρακτηρισμού. Τα δείγματα προς μελέτη διέφεραν μεταξύ τους ως προς το χρονικό διάστημα της κομποστοποίησης, αλλά και την σύσταση του αρχικού δείγματος των αποβλήτων. Πιο συγκεκριμένα, πρώτα εξετάστηκαν πλήρως κομποστοποιημένα απόβλητα τα οποία εκχυλίστηκαν τον Μάιο του 2018, στη συνέχεια μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα της περιόδου Δεκέμβριος του 2018 και Ιανουάριος 2019 και τέλος, παρατηρήθηκε η μεταβολή της σύστασης των δειγμάτων μιας περιόδου έξι μηνών ξεκινώντας από τον Νοέμβριο του 2017 έως και τον Μάιο του 2018.

Τα γαλακτώματα στην περίπτωση των δειγμάτων του Μαΐου 2018 παρασκευάστηκαν με ανάμιξη και ομογενοποίηση υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα, τον γαλακτωματοποιητή προς εξέταση και δεκαεξάνιο ως λιπαρή φάση. Πιο συγκεκριμένα, το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 10mM Trizma, 1mM νατραζίδιο (NaN_3) και απιονισμένο νερό, ενώ το pH του είχε ρυθμιστεί στο 7.0 με προσθήκη 0.1M HCl ή 0.1M NaOH, αναλόγως. Στη συνέχεια, ποσότητα 0.04g του εκάστοτε εκχυλίσματος προστέθηκε σε 4mL του υδατικού διαλύματος και αναμίχθηκε μέχρις ότου να διαλυθεί πλήρως. Κατόπιν, ακολούθησε φιλτράρισμα αυτών με φίλτρο 1μm και 100μL αυτού χρησιμοποιήθηκαν για τον χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Έπειτα, προστέθηκε 1mL δεκαεξάνιο και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του διαλύματος με την χρήση ενός υπερηχητικού αναδευτήρα (Hielscher UP-100H, Germany) για ακριβώς 30 δευτερόλεπτα. Τη στιγμή που τα τελικά δείγματα ήταν έτοιμα, έγινε μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων τους με την χρήση στατικής σκέδασης φωτός (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), ενώ 1mL αυτών απομακρύνθηκε, τοποθετήθηκε σε Eppendorf, φυγοκεντρήθηκε για 6 λεπτά σε 13000rcf και κατόπιν, αφαιρέθηκε ο ορός, προστέθηκε SDS συγκέντρωσης 1% w/v, παρέμεινε στους 45°C για 2 ώρες και στο τέλος έγινε χαρακτηρισμός αυτής της ποσότητας με τη χρήση

χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Επιπλέον, μετρήθηκε το ζ-δυναμικό των γαλακτωμάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους, ενώ πάρθηκαν μικρογραφίες αυτών με την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (Carl Zeiss, CZ Microscopy GmbH, Jena, Germany) με εστίαση x20. Για να γίνει αυτό, 10μL συγκέντρωσης 0.01% w/v Nile Red και 10μL συγκέντρωσης 0.01% Nile Blue προστέθηκαν σε κάθε γαλάκτωμα. Τέλος, τα γαλακτώματα μεταφέρθηκαν σε δοχεία σφραγισμένα με παραφίλμ και αποθηκεύτηκαν στους 25°C σε σκοτεινό χώρο. Η ίδια διαδικασία παρασκευής γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση των μερικώς κομποστοποιημένων αποβλήτων ελαιοτριβείου για την περίοδο Δεκέμβριος 2018 με Ιανουάριος 2019, με την διαφορά ότι ως λιπαρή φάση χρησιμοποιήθηκε μιγλύλλη και το pH τους ρυθμίστηκε σε 3 και 7 για να προσομοιωθούν οι συνθήκες τόσο ενός όξινου όσο και ενός ουδέτερου τροφίμου, αντίστοιχα.

Αναφορικά με την φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην αρχική τους μορφή στο ATR χωρίς κάποια επιπρόσθετη μεταχείριση αυτών.

Στην περίπτωση μελέτης των διεπιφανειακών φαινομένων, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 0.1% w/v με την χρήση 5mL υπερκάθαρου νερού, το οποίο παραλήφθηκε από την συσκευή Ultraclear Ro DI 30 (Evoqua Lab, Pittsburgh, USA) με αγωγιμότητα 18.2 ΜΩ. Έγινε ανάδευση των διαλυμάτων για 30' και στη συνέχεια ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρα 1μm. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 20±1°C για 45', σε δεκαεξάνιο και ακολούθησαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις αυτές ήταν απαλλαγμένα από κάθε είδους εξωτερικούς παράγοντες και καθαριστικά μετά την πλύση τους με θειϊκό οξύ για τρεις ώρες και σχολαστικό ξέπλυμα με υπερκάθαρο νερό. Αντίστοιχα, οι σύριγγες μετά την χρήση παρέμειναν σε προπανόλη ενώ ξεπλένονταν σε εξάνιο-προπανόλη-υπερκάθαρο με τη σειρά και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στην ξηραντήρα. Τέλος, οι κυψελίδες μετά την χρήση τους τοποθετούνταν για δύο ώρες σε καθαριστικό Thelmanex περιεκτικότητας 1% w/v και ξεπλένονταν επίσης με υπερκάθαρο νερό και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στον ξηραντήρα. Τέλος, όπως και προηγουμένως η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση μελέτης των δειγμάτων Νοέμβριος 2017-Μάιος 2018 με την διαφορά ότι ως λιπαρή φάση χρησιμοποιήθηκε μιγλύλλη (Miglyol 812N, Cremer Oleo GmbH & Co, Hamburg, Germany).

5.3 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων και των γαλακτωμάτων

5.3.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφική μέθοδος αποκλεισμού μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων είναι μία μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Η τεχνική αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο και ο προσδιορισμός της κατανομής του μοριακού βάρους μεγαλομορίων πραγματοποιείται με μέτρηση του σκεδασμένου φωτός από ένα φωτόμετρο πολλαπλών γωνιών (MALLS – Multiple Angle Laser Light Scattering). Για αυτό το λόγο συναντάται συχνά στη βιβλιογραφία ο όρος MALLS-SEC ή SEC-MALLS.

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για φυσικοχημικό χαρακτηρισμό περιελάμβανε έναν απαερωτή SpectraSystem SCM 1000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA), μια αντλία χρωματογραφίας SpectraSystem P 2000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA), μία φρίτα (frit) 2 μ m (IDEX, Oak Harbor, WA), μία προστήλη GPC/SEC PL-Aquagel-OH 50 x 7.5 mm (8 μ m) (Varian Inc, Palo Alto, CA) και δύο χρωματογραφικές στήλες GPC/SEC PL-Aquagel-OH 300 x 7.5 mm columns (Varian Inc, Palo Alto, CA), όλες συνδεδεμένες σε σειρά και εγκλεισμένες σε ειδικό φούρνο στηλών Model 605 (Scientific Systems Incorporated, State College, PA), ρυθμισμένο στους 30°C. Η διάταξη των ανιχνευτών ήταν σε σειρά και περιελάμβανε έναν ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Rigas Labs, Thessaloniki, Greece) ρυθμισμένο στα 280nm, έναν διαφορικό δείκτη διάθλασης (RI) BI-DNDC (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY) ρυθμισμένο στους 30 °C και έναν ανιχνευτή στατικής σκέδασης φωτός (SLS) πολλαπλών γωνιών BI-MwA (MALLS) (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY). Ο βρόγχος δείγματος (sample loop) είχε ενέσιμο όγκο 100 μ L. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τη βοήθεια του λογισμικού ParSEC (ParSec, Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY).

Ο ανιχνευτής SLS είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στους μοριακούς πληθυσμούς μεγαλύτερων μεγεθών, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες, ενώ ο ανιχνευτής του δείκτη διάθλασης (RI) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής γενικής χρήσης ώστε να παρέχει ένδειξη της σχετικής συγκέντρωσης των διάφορων συστατικών που έχουν

διαχωριστεί από την χρωματογραφική στήλη. Τέλος, ο ανιχνευτής υπεριώδους φωτός (UV) ρυθμίστηκε στα 280nm με σκοπό τον εντοπισμό πρωτεϊνών, καθώς η απορρόφηση στο εγγύς υπεριώδες φάσμα είναι συνηθισμένη όταν υπάρχουν πρωτεϊνικά μόρια, κυρίως λόγω της σχετικής απορρόφησης της Τρυπτοφάνης (Trp) και της Τυροσίνης (Tyr) και των δισουλφιδικών δεσμών (Aitken & Learmont, 2009).

5.3.2 Φασματοφωτομετρία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Η φασματοφωτομετρία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της χημικής σύστασης των εκχυλισμάτων λόγω των απορροφήσεων που συμβαίνουν κατά τον συντονισμό των δεσμών τους. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 380 IR εξοπλισμένο με ένα αδαμάντινο εξάρτημα ανάκλασης Smart Orbit accessory (Thermo Electron Corporation, Madison, WI). Η συγκεκριμένη συσκευή διαθέτει την τεχνολογία αποσβεσθείσας ολικής ανάκλασης (ATR – Attenuated Total Reflection) που επιτρέπει τη μη-επεμβατική μελέτη των στερεών δειγμάτων, χωρίς να προηγηθεί κάποια ιδιαίτερη προετοιμασία τους.

5.3.3 Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

Για την στατική σκέδαση φωτός (SLS) χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instrument, Malvern, Worcestershire, UK), η οποία είναι εξοπλισμένη με έναν υποδοχέα υγρών δειγμάτων Hydro MU (Malvern Instrument, Malvern, Worcestershire, UK). Στον υποδοχέα αυτόν προστέθηκε μικρή ποσότητα του γαλακτώματος και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκε από διπλή δέσμη φωτός. Μια δέσμη laser χαμηλής συχνότητας («κόκκινη δέσμη») και μία υψηλότερης συχνότητας («μπλε δέσμη»), ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια. Οι δέσμες φωτός, εστιάζονται, φιλτράρονται και στη συνέχεια προσπίπτουν πάνω στα σωματίδια του υλικού και σκεδάζονται (ή ακόμα και οπισθοσκεδάζονται) σε γωνίες αντιστρόφως ανάλογες του μεγέθους των σωματιδίων. Οι σκεδαζόμενες δέσμες ανιχνεύονται με κατάλληλα γωνιακά τοποθετημένους φωτοευαίσθητους ανιχνευτές προκειμένου να επιτυγχάνεται βέλτιστη ανάλυση σε μεγάλο εύρος μεγεθών.

Η πληροφορία της γωνιακής κατανομής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι η κύρια πηγή για τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων. Το μοντέλο σκέδασης του Mie, που προβλέπει με ακρίβεια τη σκέδαση σε συνάρτηση με το μέγεθος

σφαιρικών σωματιδίων, χρησιμοποιείται από το συνοδευμένο λογισμικό προκειμένου το Mastersizer να εξάγει ακριβή αποτελέσματα στο μεγαλύτερο δυνατό εύρος.

5.3.4 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού έγινε με την συσκευή Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Brookhaven, Holtsville, NY). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C. Αραιώθηκαν δέκα φορές στο αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα για να εξαλειφθεί η πιθανότητα πολλαπλής σκέδασης.

5.3.5 Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM) πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός συνεστιακού μικροσκοπίου Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, CZ Microscopy GmbH, Jena, Germany), το οποίο λειτουργούσε με φακούς εστίασης x20. Μετά την προσθήκη των χρωστικών όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5.2, μια σταγόνα από κάθε γαλάκτωμα τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και στη συνέχεια καλύφθηκε με καλυπτρίδα έτσι ώστε να τοποθετηθεί στο μικροσκόπιο για περαιτέρω ανάλυση.

5.3.6 Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων

Η μελέτη των διεπιφανειακών φαινομένων έγινε με την χρήση της μεθόδου κρεμάμενης σταγόνας (pendant drop) με την βοήθεια της συσκευής KSV CAM 200 (Biolin Scientific, Stockholm, Sweden) και στη συνέχεια με την χρήση του λογισμικού ανάλυσης του συμμετρικού άξονα σχήματος της σταγόνας (Attension Theta Software, V. 4.1.9.8, Biolin Scientific, Stockholm, Sweden). Με τα παραπάνω μετρήθηκε η δυναμική διεπιφανειακή τάση του νερού με το δεκαεξάνιο, την μιγλυόλη και των εκχυλισμένων υδροκολλοειδών στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Οι συνθήκες μέτρησης αναφέρθηκαν προηγουμένως στην ενότητα 5.2. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, τόσο στη διεπιφάνεια νερού-αέρα, όσο και στη διεπιφάνεια νερού-ελαίου, με εξαιρετική ένδειξη επαναληψιμότητας.

6. Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού και μελέτη γαλακτωμάτων παρουσία υδροκολλοειδών από πλήρως κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων (Μάιος 2018)

6.1 Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των γαλακτωμάτων

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των υδροκολλοειδών από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων και των γαλακτωμάτων τους.

6.1.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (Εικόνα 7) που προέκυψαν από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Σε όλα τα διαγράμματα απεικονίζεται μία από τις επτά διαφορετικές γωνίες του MALLS (SLS), εκείνη των 90°. Επιπλέον, οι γκρίζες περιοχές είναι εκείνες στις οποίες υπήρχε έντονη απορρόφηση στο φάσμα του υπεριώδους φωτός UV στα 280nm. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα γραφήματα των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων μετά το φιλτράρισμά τους, ενώ στη δεύτερη στήλη απεικονίζονται εκείνα της κρέμας μετά την επεξεργασία τους με SDS 1% και κατόπιν φυγοκέντρησης, με σειρά εμφάνισης αντιστοίχως OC5, OC7 και OC9.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την διαπίστωση της δομής και σύστασης των μεγαλομοριακών πληθυσμών που συνθέτουν τα κομποστοποιημένα εκχυλίσματα. Με τον τρόπο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα πρώτα πραγματοποιείται η έκλυση των μεγαλύτερων σε μέγεθος μορίων, ακολουθούμενα από μικρότερα μέχρι και τα πιο μικρά από όλα στο τέλος. Ο ρυθμός έκλυσης ήταν 0.8 mL min⁻¹ σε όλες τις μετρήσεις.

Παρατηρώντας τα γραφήματα διαπιστώνεται η ύπαρξη τεσσάρων πληθυσμών διαφορετικών μεγεθών. Ο πρώτος εκλύεται στα 7-12mL χωρίς να απορροφά στα 280nm, ο επόμενος στα 20mL εμφανίζοντας έντονη απορρόφηση στα 280nm, ενώ η κορυφή του συστήματος (system peak) παρουσιάζεται στα 27-28mL, επίσης απορροφώντας έντονα στα 280nm.

Αρχικά, στο δείγμα OC5 παρατηρούμε κορυφές στα 7.5-11.5mL (SLS) που σχετίζονται με την ύπαρξη πολυσακχαριτών δεδομένου ότι δεν απορροφούν στα 280nm. Ακολούθως, προκύπτουν κορυφές με απορρόφηση στα 280nm στα 12.5-

14.5mL, 19-20mL και 26.5-27mL με τις δύο τελευταίες να εμφανίζουν και μικρές κορυφές στο SLS. Ξεκινώντας από την πρώτη, θα πρέπει να αποδοθούν σε πρωτεΐνες, πεπτίδια και μικρότερες πρωτεΐνες, αντίστοιχα, ενώ στις δύο τελευταίες υπάρχουν και πολυφαινολικά στοιχεία που οφείλονται στην ταυτόχρονη εκχύλιση τους στο υδατικό κλάσμα.

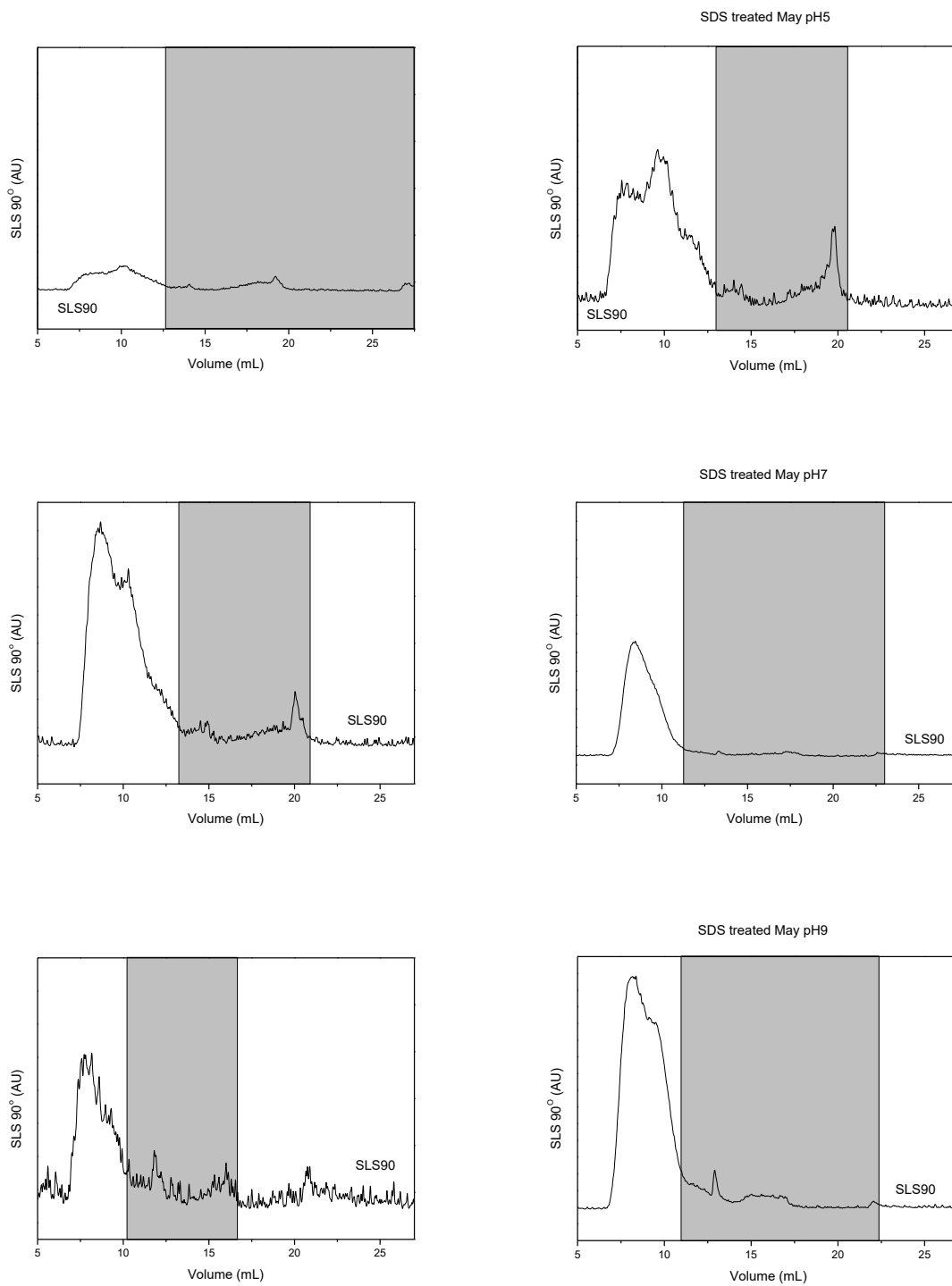
Στην περίπτωση του δείγματος OC7 διακρίνουμε κορυφές στα 7.5-12.5mL (SLS) που υποδηλώνουν την ύπαρξη μεγάλων μακρομορίων τα οποία δεν απορροφούν στα 280nm επομένως μπορεί με ασφάλεια να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι πρόκειται για πολυσακχαρίτες. Στη συνέχεια, ακολουθεί μία κορυφή στα 13-15mL η οποία απορροφά στα 280nm και μετά μία στα 20mL που επίσης απορροφά στα 280nm, αλλά παράλληλα εμφανίζει κορυφή και στο SLS. Αυτές σχετίζονται με την ύπαρξη πεπτιδίων και φαινολικών δομών με τον πληθυσμό των μεγαλύτερων μορίων να είναι πρωτεΐνες ενώ τα μικρότερα μόρια προϊόντα διάσπασης πρωτεϊνών και συνεκχυλισμένες πολυφαινόλες.

Στο δείγμα OC9 παρατηρείται επίσης μία ισχυρή κορυφή στο SLS στα 7.5-10mL χωρίς απορρόφηση στα 280nm που αποδίδεται σε πολυσακχαρίτες όπως συμβαίνει και στα προηγούμενα εκχυλίσματα (OC5, OC7). Η κορυφή αυτή ακολουθείται από μία στα 11-12.5mL με απορρόφηση στα 280nm που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες. Άλλη μία κορυφή εμφανίζεται στα 16mL, επίσης ανιχνεύσιμη στα 280nm και μια ασθενής κορυφή στο SLS. Αυτή θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε πεπτίδια και μικρότερες πρωτεΐνες καθώς και σε πολυφαινολικά στοιχεία τα οποία συνεκχυλίζονται στο υδατικό κλάσμα.

Όλα τα παραπάνω μπορούν να συνοψιστούν ως εξής: αφαιρώντας τις κορυφές του συστήματος (system peaks), τα εκχυλίσματα περιέχουν τρεις βασικές κατηγορίες πληθυσμών βάσει μεγέθους. Η μία αποτελείται από μεγάλα μακρομόρια που εκλύονται σε μικρές ποσότητες όγκου και αποτελούν έναν πολυσακχαριτικό πληθυσμό, ο οποίος αν συγκριθεί με τον όγκο έκλυσης γνωστών δεξτρανών, αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου 2 MDa. Ο δεύτερος πληθυσμός απορροφά στα 280nm και μπορεί να αναγνωριστεί ως πρωτεΐνες. Ο χρόνος έκλυσης αυτών αντιστοιχεί σε εκείνον των δεξτρανών μοριακού βάρους 15000 Da. Τέλος, ο τρίτος πληθυσμός αναλυτών με κορυφές που απορροφούν στα 280nm αντιστοιχεί βάσει του

χρόνου έκλυσης σε δεξτράνες μοριακού βάρους κάτω των 5000 Da και σχετίζεται με προϊόντα διάσπασης πρωτεϊνών και πολυφαινολικούς πληθυσμούς.

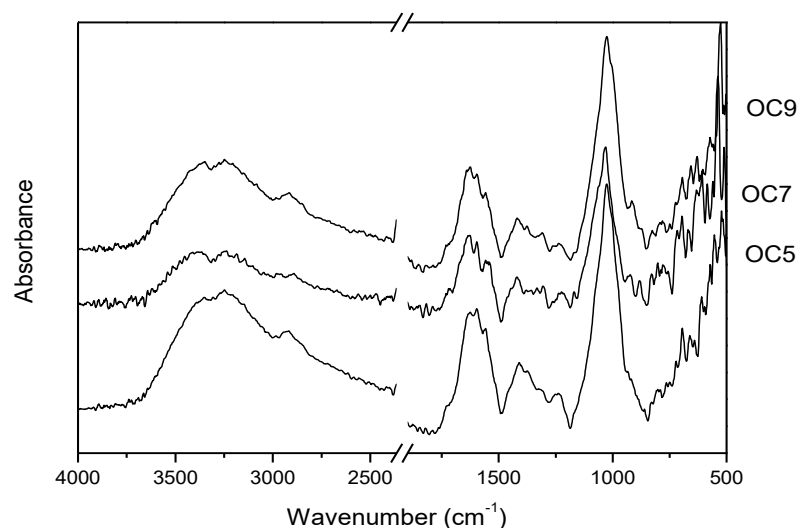
Η γαλακτωματοποίηση και η σταθερότητα των γαλακτώματων σχετίζεται με την διεπιφανειακή απορρόφηση όλων ή μέρους των συστατικών των εκχυλισμάτων έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα σταθεροποιητικό στρώμα το οποίο θα μπορούσε να παρέχει στο γαλάκτωμα κάποια είδους προστασία εναντίον της συγχώνευσης των σταγονιδίων μέσω ηλεκτροστατικής ή/και στερεοχημικής συνέργειας. Για να εξετάσουμε τον σχηματισμό αυτού του στρώματος, τα γαλακτώματα που παράχθηκαν με την χρήση των εκχυλισμάτων OC5, OC7 και OC9 σε pH7, φυγοκεντρήθηκαν ελαφρώς για 6 λεπτά στις 13000gcf. Στη συνέχεια συλλέχθηκε ο ορός, τοποθετήθηκε σε erendorff όπου προστέθηκε ποσότητα SDS 1% w/v (sodium dodecyl sulphate) έτσι ώστε να μετατοπίσει τις πρωτεΐνες της διεπιφάνειας. Κατόπιν, τα διαλύματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 6 λεπτά στις 13000gcf και το τελικό δείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 45°C για 2 ώρες προτού αναλυθεί με την τεχνική χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Η δεύτερη στήλη στην **Εικόνα 7** απεικονίζει τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης με την αντίστοιχη σειρά που εμφανίζονται και στην πρώτη στήλη (OC5, OC7, OC9). Συγκρίνοντάς τα με τα πρώτα γραφήματα των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων αναφορικά με την αναλογία των σχετικών κορυφών (ακριβής σύγκριση της περιοχής δεν συνιστάται, καθώς οι συγκεντρώσεις δεν είναι ίδιες), μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι και οι τρεις πληθυσμοί που αναφέρθηκαν προηγουμένως (μεγάλοι πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και πεπτίδια/φαινολικά) είναι μέρος της διεπιφάνειας σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτό αποδεικνύει μία πρόσθετη δράση των συστατικών του σύνθετου αυτού μείγματος που είναι το εκχύλισμα κομποστοποιημένων αποβλήτων ελαιοτριβείων και συμβάλλει στην περαιτέρω σταθεροποίηση του γαλακτώματος



Εικόνα 7 - Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) των εκχυλισμάτων OC5, OC7, OC9 σε pH7 και της κρέμας μετά την φυγοκέντρωση και προσθήκη SDS. Οι γκρι περιοχές αντιστοιχούν σε σημαντική απορρόφηση του υπεριώδους (UV) στα 280nm

6.1.2 Φασματοφωτομετρία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Στο διάγραμμα (Εικόνα 8) παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν από την μελέτη των εκχυλισμάτων με την τεχνική FT-IR.



Εικόνα 8 - Φάσμα FT-IR των εκχυλισμάτων OC5, OC7 και OC9 (αποξηραμένα δείγματα)

Είναι εμφανές ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν βασικές δομικές ομοιότητες μεταξύ τους, με ελάχιστες διαφορές. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης δεν διαφοροποιούν σημαντικά τα συστατικά των υδροκολλοειδών που απομονώνονται στο τέλος.

Βάσει βιβλιογραφίας η έντονη κορυφή στα 1026cm^{-1} μπορεί να σχετιστεί με την ύπαρξη πολυσακχαριτών και πιο συγκεκριμένα σε δονήσεις δακτυλίου C-OH και C-O-C (Kacurakova & Ebringerova, 2000; Oliveira, 2010; Sun & Baird, 2005).

Στη συνέχεια, οι ευρείες, πολλαπλές κορυφές που εμφανίζονται μεταξύ 1490cm^{-1} και 1220cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στην ύπαρξη ζώνης αμιδίων II, δηλαδή σε μόρια πρωτεϊνικής φύσεως ή αλλιώς σε δονήσεις κάμψης N-H, καθώς και εκείνες στα 1624cm^{-1} και στα 1413cm^{-1} (Kong & Yu, 2007).

Επιπλέον, όλα τα συστήματα παρουσιάζουν μία ευρεία κορυφή με ένα μέγιστο περίπου στα 3250cm^{-1} η οποία σχετίζεται με την ύπαρξη υδροξυλικών δονήσεων.

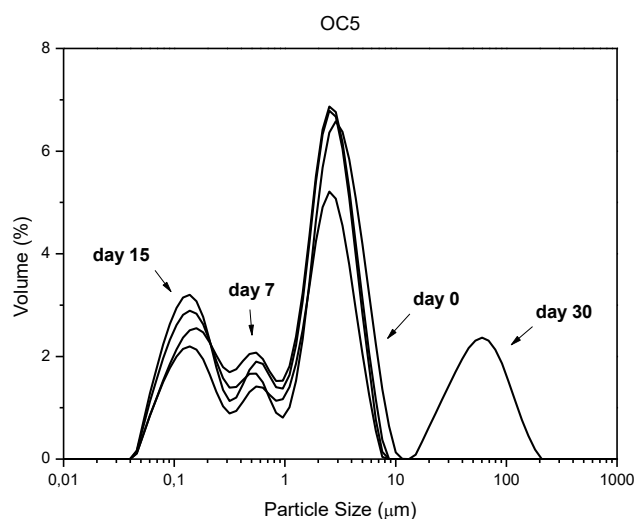
Τέλος, η κορυφή στα 2918cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις μεθυλενίου ($-\text{CH}_2$ και $-\text{CH}_3$), παρουσιάζεται στα εκχυλίσματα OC5 και OC9, αλλά όχι στο OC7.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται ξεκάθαρο ότι τα εκχυλίσματα από την κομποστοποίηση υπολειμμάτων ελαιοτριβείων αποτελούνται από πολυσακχαρικούς και πρωτεϊνικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) που αναφέρθηκε προηγουμένως.

6.1.3 Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν ως προς την γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα, δηλαδή την ιδιότητά τους να παράγουν σταθερά γαλακτώματα διατηρώντας σταθερό το μέγεθος των λιποσφαιρίων αυτών για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα.

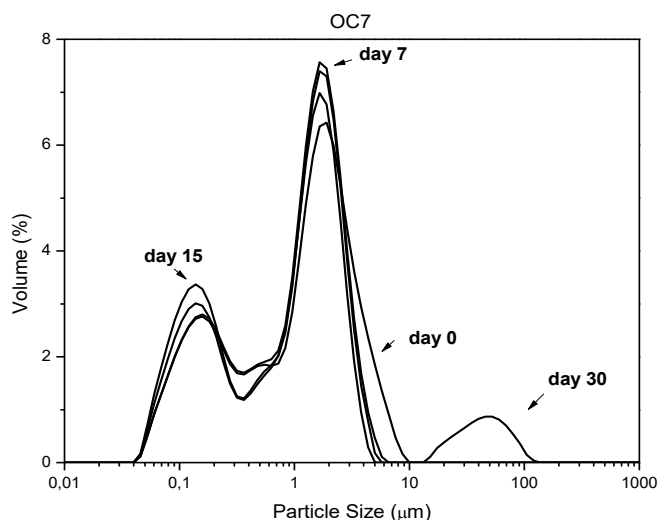
Τα γαλακτώματα παράχθηκαν βάσει της διαδικασίας που αναφέρθηκε στην ενότητα 5.2. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται το μέγεθος των λιποσφαιρίων στην περίπτωση του OC5 σε διάστημα 30 ημερών. Όπως είναι εμφανές, το δείγμα OC5 αποτελεί έναν καλό γαλακτωματοποιητή σε ουδέτερο pH, σχηματίζοντας λιποσφαιρίδια μέσου μεγέθους περίπου τα 3μm και αρκετά μικρότερα, ακόμα και κάτω από 1μm. Η κατανομή μεγέθους των λιποσφαιριδίων παραμένει σταθερή για 15 ημέρες.



Εικόνα 9 - Κατανομή μεγέθους λιποσφαιρίων σε γαλάκτωμα OC5/δεκαεξάνιο 0.8% w/v σε pH7

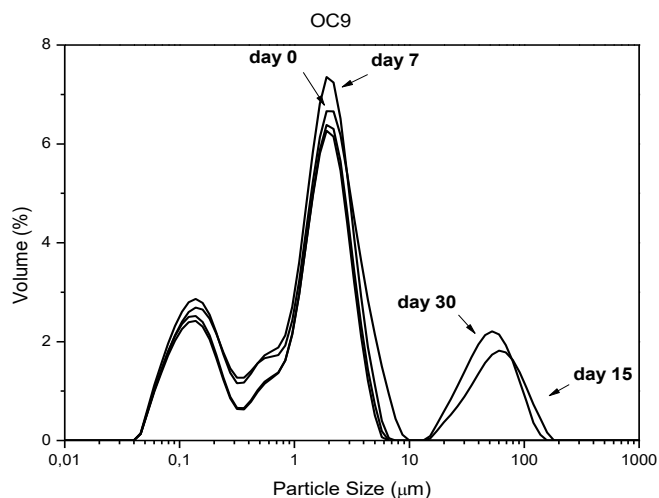
Στην περίπτωση του OC7 (**Εικόνα 10**) παρατηρούμε ότι παράγονται ακόμη μικρότερα λιποσφαιρίδια μεγέθους περίπου 2μm. Όπως και το OC5, έτσι και αυτό

παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα σε βάθος χρόνου με μία πιο ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους και μεγαλύτερα σωματίδια εμφανίζονται μετά τις 21 ημέρες.



Εικόνα 10 - Κατανομή μεγέθους λιποσφαιρίων σε γαλάκτωμα OC7/δεκαεξάνιο 0.8% w/v σε pH7

Τέλος, το δείγμα OC9 (Εικόνα 11) εμφανίζει μέγεθος λιποσφαιρίων γύρω στα 2 με 3 μm, αλλά εμφανίζονται μεγαλύτερα σωματίδια νωρίτερα σε σχέση με τα δείγματα OC5 και OC9. Παραμένει σταθερό για 7 ημέρες και μετά τις 15 αρχίζουν να εμφανίζονται μεγάλα λιποσφαιρίδια (50-100 μm).



Εικόνα 11 - Κατανομή μεγέθους λιποσφαιρίων σε γαλάκτωμα OC9/δεκαεξάνιο 0.8% w/v σε pH7

Σύμφωνα με τα παραπάνω εξάγεται με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα των κομποστοποιημένων αποβλήτων ελαιοτριβείων θα μπορούσαν να αποτελέσουν αρκετά ικανούς γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα ουδέτερου pH, με μεγαλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα να παρουσιάζει το δείγμα OC7.

6.1.4 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

Τα γαλακτώματα που προέκυψαν από τα τρία εκχυλίσματα ήταν όλα αρνητικά φορτισμένα σε pH7. Οι απόλυτες μετρημένες τιμές για το ζ-δυναμικό ήταν -3.6 ± 3.4 mV για το OC5, -11.5 ± 1.3 mV για το OC7 και -10.02 ± 5.5 mV για το OC9. Η εκχύλιση ενός μακρομορίου ενσωματωμένου σε μια φυτική μήτρα σχετίζεται με την διαβροχή αυτής και την αλληλεπίδραση μεταξύ των μακρομορίων υπό εκχύλιση και των μορίων του διαλύτη (Ritzoulis C. , 2017). Καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι πλησίον του ΙΣ τους σε pH 5, η έκλυση μακρομορίων σε αυτό το pH δεν οδηγείται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, καθώς κάτι τέτοιο δεν μπορεί να συμβεί μεταξύ διαλύτη και πολυμερούς. Επομένως, είναι λογικό να υπάρχουν οντότητες με λιγότερες ιονιζόμενες ομάδες στο OC5. Από την άλλη πλευρά, σε τιμές pH 7 ή 9, θα περίμενε κανείς ότι οι αρνητικά φορτισμένες μονάδες θα αλληλεπιδρούσαν έντονα με το νερό, ώστε να προκληθεί η εκχύλιση πολυμερών πλούσιων σε ιονιζόμενες ομάδες. Αυτό εκδηλώνεται ως υψηλότερες απόλυτες (αρνητικές) τιμές ζ-δυναμικού για τα δείγματα OC7 και OC9.

Δείγμα	ζ-δυναμικό	Τυπική απόκλιση
OC5 (pH5)	-3.6	3.4
OC7 (pH7)	-11.5	1.3
OC9 (pH9)	-10.02	5.5

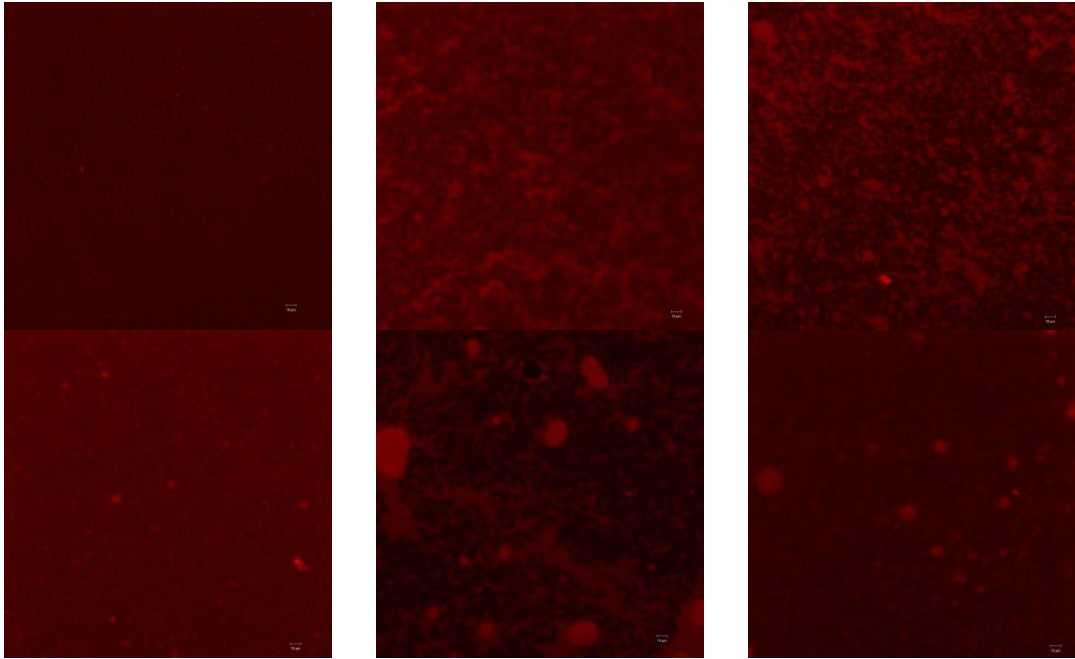
Πίνακας 3 - Μετρήσεις ζ-δυναμικού για τα OC5, OC7 και OC9

6.1.5 Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)

Παρακάτω παρατίθενται μικρογραφήματα (Εικόνα 12) των παρασκευασμένων γαλακτωμάτων που ελήφθησαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο με τη χρήση χρωστικής Nile Red, αμέσως μετά και με το πέρας 15 ημερών από την γαλακτωματοποίησή τους. Σύμφωνα με αυτά επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της μελέτης των γαλακτωμάτων που προέκυψαν με την τεχνική της στατικής σκέδασης φωτός για τον προσδιορισμό του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται με σειρά τα εκχυλίσματα OC5, OC7 και OC9, αντίστοιχα. Οι

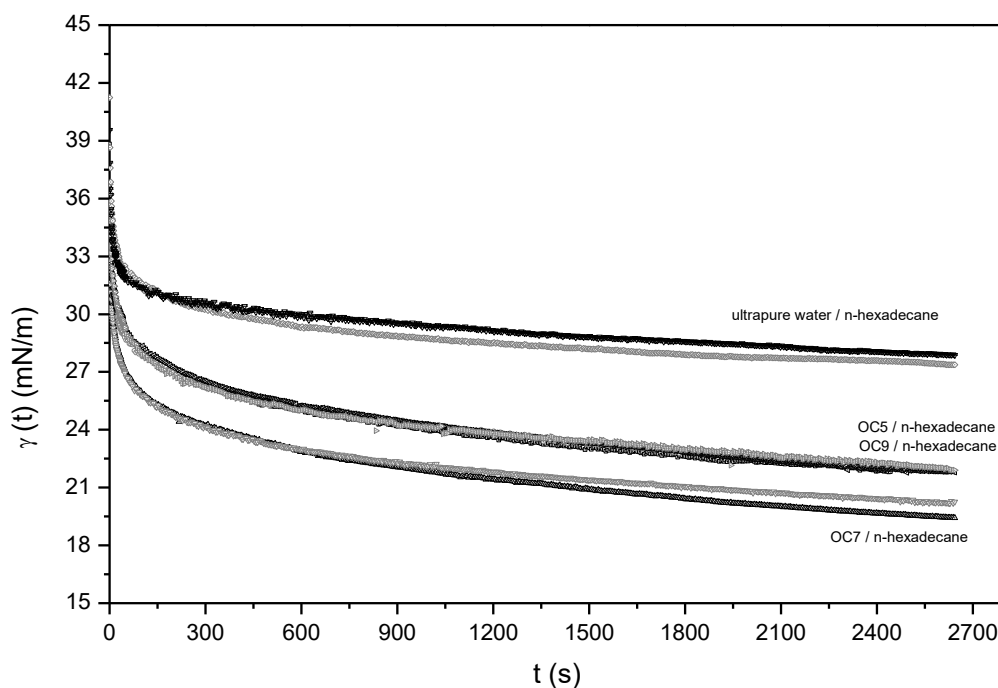
πρώτες μικρογραφίες είναι την ημέρα παρασκευής των γαλακτωμάτων ενώ οι δεύτερες μετά από 15 ημέρες.

Είναι εμφανές ότι τα γαλακτώματα εμφανίζουν σημαντικά μικρά λιποσφαιρίδια και παραμένουν αρκετά σταθερά με το πέρασ του χρόνου παρουσιάζοντας μικρή αύξηση, αλλά αξιοσημείωτη μετά τις 15 ημέρες. Όλα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 6.1.3.



Εικόνα 12 - Μικρογραφήματα των γαλακτωμάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους και 15 ημέρες αργότερα

6.1.6 Προσδιορισμός διεπιφανειακών φαινομένων



Εικόνα 13 - Δυναμική διεπιφανειακή τάση $\gamma(t)$ στη διεπιφάνεια νερού/δεκαεξάνιου για διαλύματα 0.1% w/v των εκχυλισμάτων και του υπερκάθαρου νερού

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της δυναμικής διεπιφανειακής τάσης στη διεπιφάνεια νερού/δεκαεξάνιου για τα διαλύματα 0.1% w/v των εκχυλισμάτων, καθώς και για το υπερκάθαρο νερό (Εικόνα 13). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις με σκοπό την διαπίστωση επαναληψιμότητας για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων αναφορικά με την συμπεριφορά των συστημάτων αυτών.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του υπερκάθαρου νερού με το δεκαεξάνιο έδειξαν ότι το δεκαεξάνιο περιείχε τασιενεργές ουσίες (το υπερκάθαρο νερό καθώς και οι σύριγγες μετρήθηκαν πριν από κάθε χρήση) και για το λόγο αυτό οι τιμές που ελήφθησαν διαφέρουν από τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας (Aveyard & Haydon, 1965). Παρόλα αυτά είναι εφικτή η σύγκριση των συστημάτων υπερκάθαρου νερού/δεκαεξάνιου με τα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα των εκχυλισμάτων μας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 τα δείγματα OC5 και OC9 επιδεικνύουν παρόμοια διεπιφανειακή συμπεριφορά ως προς την ελαιώδη φάση. Από την άλλη, το δείγμα OC7 παρουσιάζει μεγαλύτερη επιφανειακή δραστηριότητα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των μετρήσεων κατανομής μεγέθους των λιποσφαιρίων και με τα μικρογραφήματα που ελήφθησαν από τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα, τόσο αναφορικά με το μέγεθος των σωματιδίων με το πέρασ του χρόνου όσο και με την αποσταθεροποίηση των γαλακτωμάτων.

6.2 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, τα εκχυλίσματα των κομποστοποιημένων αποβλήτων ελαιοτριβείων ελέγχθηκαν ως προς την γαλακτωματοποιητική τους ιδιότητα, δηλαδή την ικανότητα παραγωγής ισχυρών γαλακτωμάτων O/W, ενώ στα αρχικά δείγματα πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός αυτών.

Ξεκινώντας από τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων με την χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα περιέχουν τρεις βασικές κατηγορίες πληθυσμών βάσει μεγέθους. Η μία αποτελείται από μεγάλα μακρομόρια που εκλύονται σε μικρές ποσότητες όγκου και αποτελούν έναν πολυσακχαριτικό πληθυσμό, ο οποίος αν συγκριθεί με τον όγκο έκλυσης γνωστών δεξτρανών, αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος περίπου 2 MDa. Ο δεύτερος πληθυσμός απορροφά στα 280nm και μπορεί να αναγνωριστεί ως πρωτεΐνες. Ο χρόνος έκλυσης αυτών αντιστοιχεί σε εκείνον των δεξτρανών μοριακού βάρους 15000 Da. Τέλος, ο τρίτος πληθυσμός αναλυτών με κορυφές που απορροφούν στα 280nm αντιστοιχεί βάσει του χρόνου έκλυσης σε δεξτράνες μοριακού βάρους κάτω των 5000 Da και σχετίζεται με προϊόντα διάσπασης πρωτεϊνών και πολυφαινολικούς πληθυσμούς.

Στη συνέχεια, με την χρήση φασματοφωτομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT – IR) διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα από την κομποστοποίηση υπολειμμάτων ελαιοτριβείων αποτελούνται από πολυσακχαρικούς και πρωτεϊνικούς πληθυσμούς, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αντίστοιχα αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC).

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε παρασκευή γαλακτωμάτων O/W με την χρήση των εκχυλισμάτων από τα ελαιοτριβεία και σε αυτά έγινε χρήση στατικής σκέδασης φωτός για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σταγονιδίων, έτσι ώστε να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα αναφορικά με την γαλακτωματοποιητική ικανότητα των δειγμάτων μας όπου προέκυψε το εξής: τα εκχυλίσματα των κομποστοποιημένων

αποβλήτων ελαιοτριβείων θα μπορούσαν να αποτελέσουν αρκετά ικανούς γαλακτωματοποιητές σε τρόφιμα ουδέτερου pH, με μεγαλύτερη γαλακτωματοποιητική ικανότητα να παρουσιάζει το δείγμα OC7.

Το παραπάνω επιβεβαιώνεται τόσο από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού ζ-δυναμικού, της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης λέιζερ (LSCM), αλλά και από την μελέτη των διεπιφανειακών φαινομένων.

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αποτελέσματα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική έρχονται σε συμφωνία μεταξύ τους και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων εμφανίζουν μία αρκετά σημαντική γαλακτωματοποιητική ικανότητα, κυρίως σε ουδέτερο pH.

7. Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού και μελέτη γαλακτωμάτων παρουσία υδροκολλοειδών από μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων (Δεκέμβριος 2018- Ιανουάριος 2019)

7.1 Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των γαλακτωμάτων

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των υδροκολλοειδών από μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων και των γαλακτωμάτων τους.

7.1.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

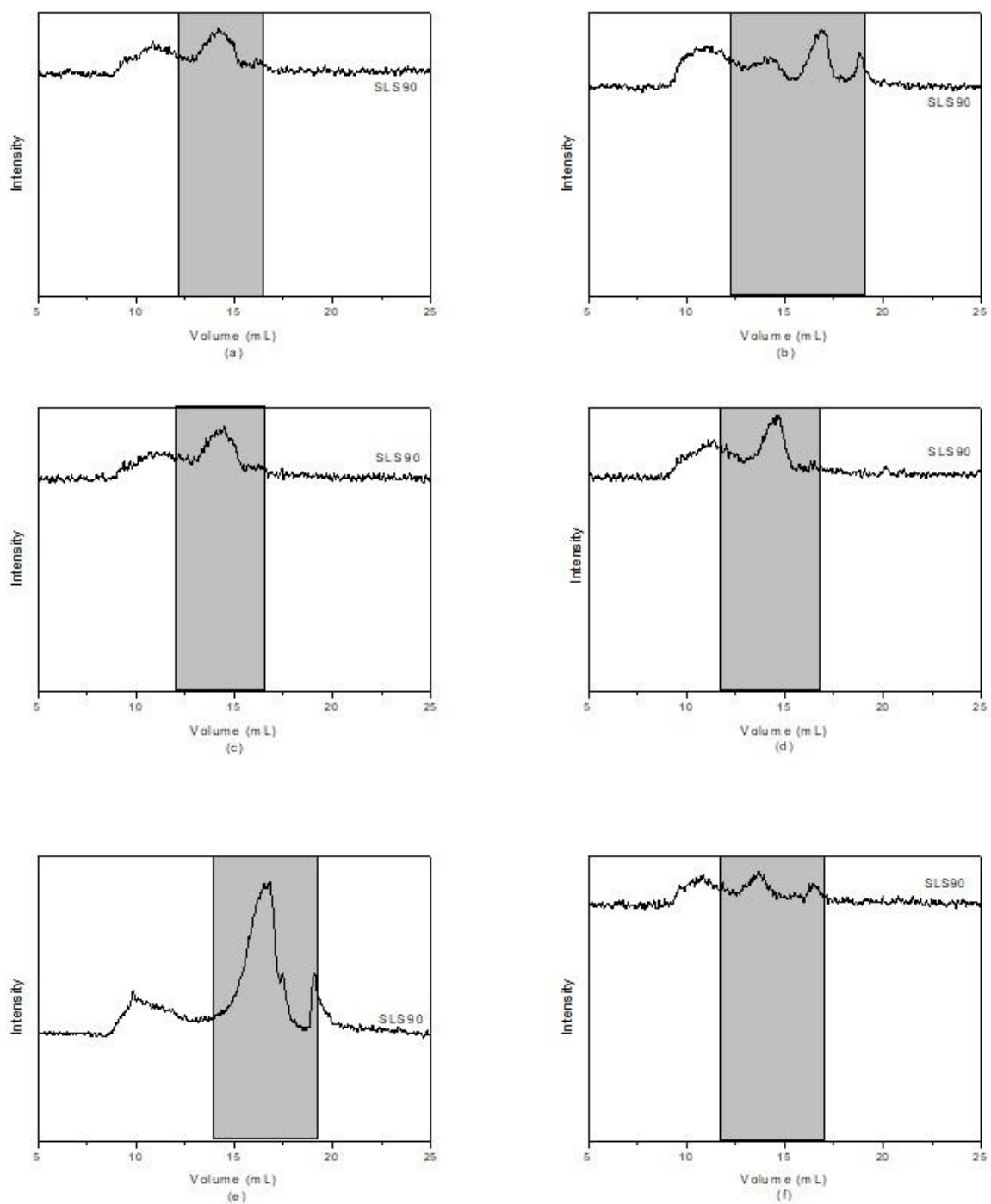
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (Εικόνα 14) που προέκυψαν από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Σε όλα τα διαγράμματα απεικονίζεται μία από τις επτά διαφορετικές γωνίες του MALLS (SLS), εκείνη των 90°. Επιπλέον, οι γκρίζες περιοχές είναι εκείνες στις οποίες υπήρχε έντονη απορρόφηση στο φάσμα του υπεριώδους φωτός UV στα 280nm. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα γραφήματα των υδατικών διαλυμάτων των μη κομποστοποιημένων εκχυλισμάτων (δείγματα Δεκεμβρίου 2018) μετά το φιλτράρισμά τους, ενώ στη δεύτερη στήλη απεικονίζονται εκείνα των μερικώς κομποστοποιημένων αποβλήτων (δείγματα Ιανουαρίου 2018), με σειρά εμφάνισης αντιστοίχως OC5, OC7 και OC9, όπου 5, 7 και 9 αντιστοιχούν στο pH.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την διαπίστωση της δομής και σύστασης των μεγαλομοριακών πληθυσμών που συνθέτουν τα εκχυλίσματα. Με τον τρόπο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα πρώτα πραγματοποιείται η έκλυση των μεγαλύτερων σε μέγεθος μορίων, ακολουθούμενα από μικρότερα μέχρι και τα πιο μικρά από όλα στο τέλος. Ο ρυθμός έκλυσης ήταν 0.8 mL min⁻¹ σε όλες τις μετρήσεις.

Στα δείγματα OC5 (a) και OC7 (c) ο ανιχνευτής SLS κατέγραψε δύο ομάδες πληθυσμών: η πρώτη εκλύεται στα 10 με 12 mL και η δεύτερη στα 12.5 με 15 mL. Ο δεύτερος πληθυσμός εμφάνιζε ισχυρή απορρόφηση στα 280 nm. Στην περίπτωση του δείγματος OC9 (e) διακρίνονται τρεις ομάδες: η πρώτη ανάμεσα στα 8 με 12 mL, που αντιστοιχεί στον χρόνο έκλυσης των δεξτρανών με MB > 1 MDa, η δεύτερη στα 14 με 17 mL (με μια μικρή κορυφή στα 17 mL), που αντιστοιχεί στον χρόνο

έκλυσης δεξτρανών αρκετών δεκάδων kDa και μία τρίτη ομάδα στα 18.5 mL, η οποία αντιστοιχεί σε μικρότερα μόρια (κάτω του 1 kDa). Οι πληθυσμοί που αντιστοιχούν σε χρόνους έκλυσης 14-17 mL, 17 mL και 18.5 mL απορροφούσαν όλοι στα 280 nm. Αυτό υποδεικνύει ότι οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί (εκείνοι που εκλύονται πριν από τα 15 mL) αποτελούνται από τμήματα τα οποία δεν απορροφούν στο UV. Τα μόνα αξιοσημείωτα μόρια αυτής της κατηγορίας στις περιπτώσεις φυτικών τροφίμων, είναι οι πολυσακχαρίτες. Οι δεύτερες κορυφές θα έπρεπε να αποδοθούν σε πρωτεϊνικές δομές καθώς απορροφούσαν στα 280 nm. Το ίδιο ισχύει για τις μικρότερες κορυφές αμέσως μετά τις μεγάλες και επίσης, τα μικρότερα μόρια που εκλύονται στα 18.5 mL στο OC9 αποτελούν προϊόντα διάσπασης των πρωτεϊνών και άλλων μορίων που απορροφούν στα UV, όπως τα φαινολικά.

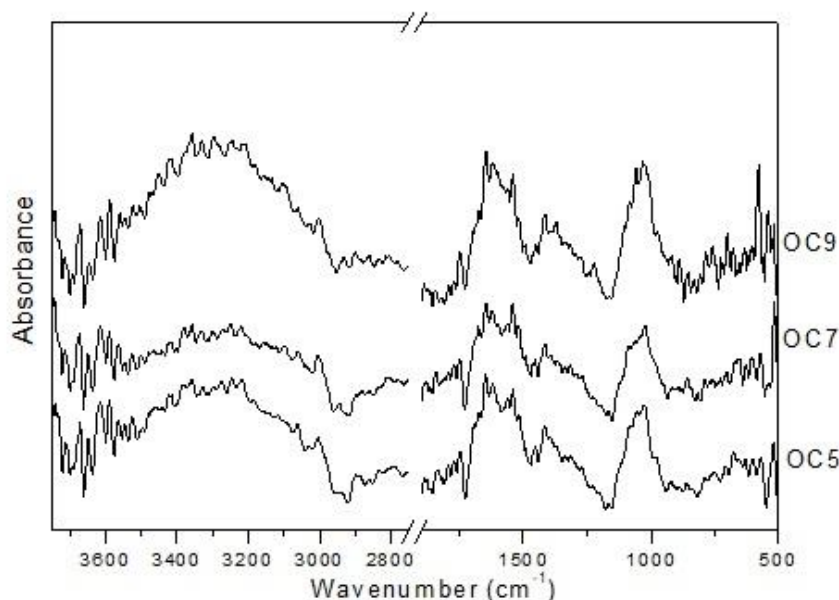
Επιπλέον, στο γράφημα (Εικόνα 14) παρουσιάζεται η εξέλιξη αυτών των πληθυσμών μετά την μερική κομποστοποίηση (ένας μήνας) των υλικών. Το δείγμα OC5 εμφάνισε σημαντική μείωση του μεγέθους των συστατικών του (b). Ο αρχικός πληθυσμός των μη απορροφητικών πολυσακχαριτών στα 280 nm παρουσίασε μεταβολή στο σχήμα του από μια διμερή κορυφή σε μία μονομερή με ολόκληρη την περιοχή να εμφανίζει μεγαλύτερους χρόνους έκλυσης. Η πρωτεϊνική κορυφή, αρχικά ανάμεσα σε 12.5 και 15 mL (a), διασπάστηκε σε μία μικρότερη κορυφή του ίδιου μεγέθους και σε μία αρκετά μεγαλύτερη που απορροφούσε στο UV, υποδεικνύοντας την διάσπαση των πρωτεϊνικών πληθυσμών κατά την διάρκεια της κομποστοποίησης. Μία ακόμη νέα κορυφή εμφανίστηκε σε πολύ μεγαλύτερους χρόνους έκλυσης (19 mL), χρόνος που αντιστοιχεί σε εκείνον μοριακού βάρους λιγότερο από 1000 Da, δηλαδή, αυτή η κορυφή ήταν μεμονωμένα αμινοξέα ή ολιγοπεπτίδια που προέρχονται από τη διάσπαση του αρχικού πρωτεϊνικού πληθυσμού. Ωστόσο, τέτοιες μεταβολές δεν είναι ιδιαίτερα εμφανείς στην περίπτωση των δειγμάτων OC7 (d) και OC9 (f), όπου οι βασικοί πληθυσμοί φαίνεται να παραμένουν σχετικά ανεπηρέαστοι από την σύντομη διαδικασία κομποστοποίησης. Γενικά, το δείγμα OC5 έδειξε προοπτικές καλύτερων γαλακτωματοποιητικών χαρακτηριστικών καθώς η μερικώς ολοκληρωμένη διαδικασία κομποστοποίησης άρχισε να διασπά τα μακρομόρια σε μικρότερα.



Εικόνα 14 – Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) των εκχυλισμάτων που προήλθαν από μη κομποστοποιημένα μίγματα (Δεκέμβριος 2018 - a,c,e) και εκχυλισμάτων από μερικώς κομποστοποιημένα μίγματα στην δεξιά στήλη (Ιανουάριος 2019 – b,d,f). Από πάνω προς τα κάτω: Εκχυλίσματα σε pH 5 (a,b), pH 7 (c,d) και pH 9 (e,f). Οι γκριζες περιοχές υποδεικνύουν την σημαντική απορρόφηση UV ακτινοβολίας στα 280 nm.

7.1.2 Φασματοφωτομετρία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν από την μελέτη των εκχυλισμάτων με την τεχνική FT-IR.



Εικόνα 15 - Φάσμα FT-IR των μερικώς κομποστοποιημένων εκχυλισμάτων σε pH 5 (OC5), pH 7 (OC7) και pH 9 (OC9)

Όπως φαίνεται και από το γράφημα (Εικόνα 15) δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των πρωτεϊνών και των προϊόντων διάσπασής τους καθώς περιείχαν στην ουσία τα ίδια δονούμενα τμήματα. Ωστόσο, η εξέταση του FTIR μπορεί να παρέχει δεδομένα αναφορικά με την χημική ταυτότητα των σύνθετων μιγμάτων αυτών των εκχυλισμάτων. Οι ισχυρές κορυφές στα 1020-1090 cm^{-1} είναι τυπικές των πολυσακχαριτών (Kacurakova & Ebringerova, 2000). Οι ομάδες κορυφών από τα 1530 έως τα 1630 cm^{-1} και 1280 έως 1450 cm^{-1} αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες και πεπτιδικές οντότητες (πρωτεΐνες, ολιγοπεπίδια και μεμονωμένα αμινοξέα) και οφείλονται σε δεσμούς C=O (ζώνη αμιδίων I) και N-H (ζώνη αμιδίων II) (Ferreira, Nunes, Castro, Ferreira, & Coimbra, 2014). Τόσο οι πολυσακχαρίτες όσο και οι πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν ως ξεχωριστοί πληθυσμοί στην SEC (Εικόνα 14). Μια μικρή κορυφή εμφανίστηκε στα 1540 cm^{-1} , η οποία παρατηρήθηκε στα δείγματα OC7 και OC9. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη καρβοξυλικών και σχετίζεται σημαντικά με

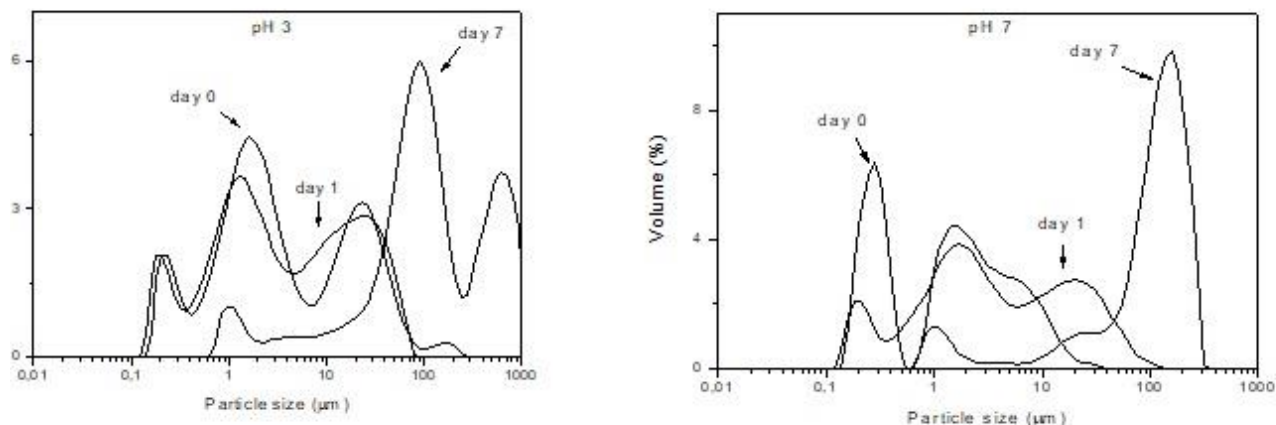
τις υψηλότερες απόλυτες τιμές του (αρνητικού) ζ-δυναμικού αυτών των δειγμάτων. Οι μικρές κορυφές περίπου στα 3040 και 3560 cm^{-1} αποτελούν τυπικούς κραδασμούς επιμήκυνσης των O-H τμημάτων (υπάρχουν σε όλα τα σάκχαρα, πεπτίδια και στο νερό) (Sun, Xu, Zhao, Sun, Fowler, & Baird, 2005).

7.1.3 Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

Όπως φάνηκε κατά την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC), το δείγμα OC5 (pH 5) αποτελείται από περισσότερα συστατικά μικρού μοριακού βάρους από όταν άρχισε να λαμβάνει χώρα η διαδικασία της κομποστοποίησης. Για το λόγο αυτό το συγκεκριμένο δείγμα επιλέχθηκε ως γαλακτωματοποιητής σε γαλακτώματα O/W σε pH 3 και pH 7 έτσι ώστε να γίνει μία προσομοίωση όξινων και ουδέτερων μαλακών τροφών, αντίστοιχα.

Το παρακάτω γράφημα (Εικόνα 16) απεικονίζει την κατανομή των λιποσφαιριδίων στα παραπάνω γαλακτώματα σε μία περίοδο χρόνου 7 ημερών. Αριστερά παρουσιάζεται το γαλακτώμα με pH 3 και δεξιά εκείνο με pH 7. Αρχικά, η κατανομή των λιποσφαιριδίων ήταν γύρω από δύο πληθυσμούς, περίπου 0.2 και 1 μm , αλλά υπήρχε και ένας πληθυσμός μεγαλύτερων σταγονιδίων περίπου στα 20 μm . Η κατανομή του μεγέθους των λιποσφαιριδίων παρέμεινε σταθερή μετά από 24 ώρες, καθώς επίσης παρέμεινε και μετά από 7 ημέρες μια μικρή κορυφή 1 μm , αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτών ήταν μεγέθους 100 μm ή και περισσότερο. Λόγω αυτού πραγματοποιήθηκε η εκτέλεση των ίδιων δειγμάτων μετά την εισαγωγή 1 g dL / 1 δωδεκυλο θεικού νατρίου (SDS) όπου παρατηρήθηκε ότι δεν άλλαξε την κατανομή μεγέθους σταγονιδίων (τα αποτελέσματα δεν φαίνονται) δηλαδή, η εκτόπιση του διεπιφανειακού στρώματος από το SDS δεν έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση συσσωματωμάτων. Επομένως, οι κορυφές μεγαλύτερου μεγέθους πιθανότατα να είναι μεμονωμένα σταγονίδια που παράγονται είτε με συσσωμάτωση είτε με ωρίμανση Ostwald. Αυτό υποδεικνύει ότι οι γαλακτωματοποιητές που προέρχονται από το OC5 έχουν αρκετές προοπτικές χρήσης σε όξινα τρόφιμα, δεδομένου όμως ότι ο χρόνος ζωής αυτών θα είναι περιορισμένος.

Στην περίπτωση του pH 7 παρατηρήθηκε ταχεία αύξηση του μεγέθους των σταγονιδίων από τις πρώτες 24 ώρες μετά την παρασκευή του γαλακτώματος.



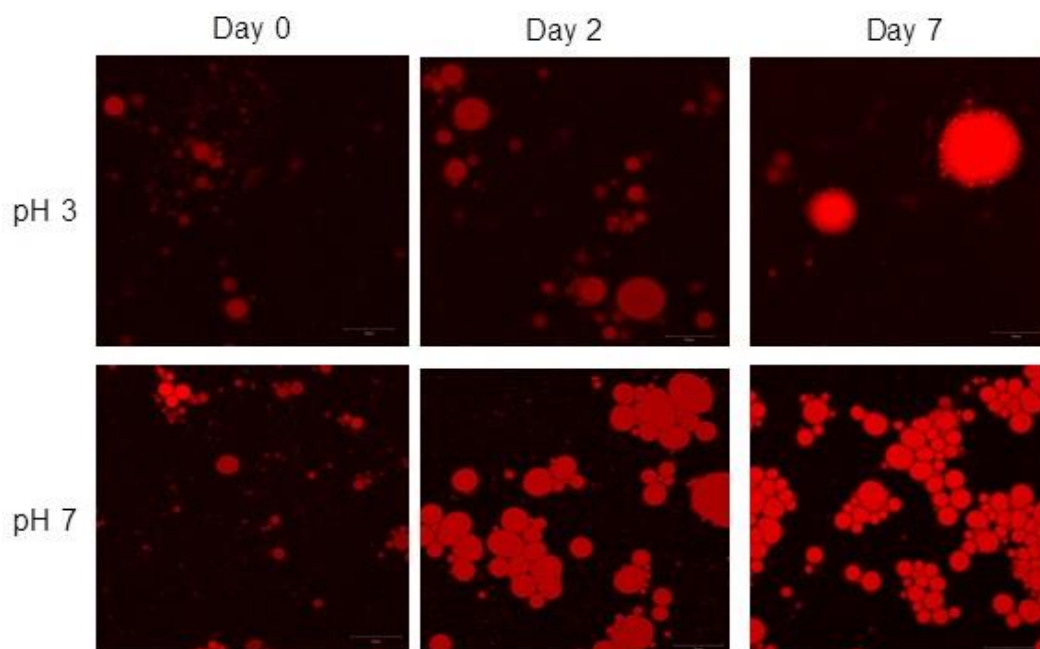
Εικόνα 16 – Κατανομή λιποσφαιριδίων σε γαλακτώματα μινγλύλης σε νερό χρησιμοποιώντας ως γαλακτοματοποιητή το εκχύλισμα από μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιотριβείου και μίγματος φύλλων σε pH 5 (OC5). Τα γαλακτώματα είναι σε pH 3 και pH 7.

7.1.4 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

Το ζ-δυναμικό του δείγματος OC5 μετρήθηκε στα $-9,3 \pm 1.0$ mV, ενώ του OC7 - 26.8 ± 1.0 mV. Όλες οι μετρήσεις ζ-δυναμικού πραγματοποιήθηκαν σε pH 7 χρησιμοποιώντας τα εκχυλίσματα των διαφορετικών pH (OC5, OC7, OC9). Επομένως, οι διαφορές τους στην τιμή του ζ-δυναμικού αντανακλούν πραγματικές διαφορές στη σύστασή τους. Αυτό έδειξε ότι εκχυλίσθηκαν οντότητες υψηλότερης πυκνότητας σε ιονιζόμενα τμήματα (π.χ. καρβοξύλια) σε pH 7 και pH 9 (σε σύγκριση με pH 5). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη μικρότερη περιεκτικότητα σε προϊόντα διάσπασης (ή προϊόντων χαμηλότερου MW) στα OC7 και OC9 σε σύγκριση με το OC5: Για να εξαχθεί ένα μόριο από μια φυτική μήτρα, η δύναμη μεταξύ του ενυδατικού νερού και του εκχυλισμένου μορίου θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τις δυνάμεις που δρουν μεταξύ αυτού του μορίου και του φυτικού υποστρώματος (Ritzoulis C. , 2017). Σε pH 7 ή 9, τα φορτία ήταν υψηλότερα από ό, τι στο pH 5 (καθώς στο pH 5, οι περισσότερες πρωτεΐνες ήταν πιο κοντά στο pI τους). Έτσι, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της φυτικής μήτρας και των μορίων υπό εκχύλιση ήταν ασθενέστερες, διευκολύνοντας την εξαγωγή τους.

7.1.5 Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης λέιζερ (LSCM)

Τα μικρογραφήματα των γαλακτωμάτων προς μελέτη παρατίθενται στην **Εικόνα 17**. Παρατηρούμε ότι στο pH 3 μερικές σταγόνες μεγάλωσαν εις βάρος των μικρότερων, ενώ στο pH 7 οι μεγάλες σταγόνες ήταν κυρίαρχες, γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της στατικής σκέδασης φωτός (**Εικόνα 16**). Η αύξηση των μεγαλύτερων σταγονιδίων εις βάρος των μικρότερων απεικονίστηκε πολύ καθαρά ως ένας μεγάλος αριθμός μικρών σταγονιδίων κροκιδωμένων με μεμονωμένα μεγάλα σταγονίδια σε pH 3 (μικρογραφήματα πάνω δεξιά, pH 3 στις 7 ημέρες). Παρόμοιες παρατηρήσεις θα μπορούσαν να γίνουν και στην περίπτωση του pH 7. Μια μετατόπιση της κατανομής μεγέθους των σταγονιδίων, σε συνδυασμό με την αύξηση του μεγέθους των μεγαλύτερων σταγονιδίων σε βάρος των μικρότερων, ήταν γεγονός ενδεικτικό της ωρίμανσης του Ostwald, αντί της συγχώνευσης (Ritzoulis C. , 2017). Αυτό σημαίνει ότι ένα ισχυρό μηχανικό στρώμα, ικανό να προστατεύει έναντι των σταγονιδίων που συγχωνεύονται / συνενώνονται, δημιουργήθηκε από τους νέους γαλακτωματοποιητές. Για τον έλεγχο της σταθερότητας αυτών των γαλακτωμάτων, θα πρέπει να επιδιωχθεί ο έλεγχος των παραμέτρων που επηρεάζουν την ωρίμανση του Ostwald παρά την συσσωμάτωση, όπως η ελαστικότητα της επιφάνειας, η διαλυτότητα του ελαίου στο νερό, η επιφανειακή τάση και το ιζώδες.



Εικόνα 17 - Μικρογραφήματα των γαλακτωμάτων αμέσως μετά την παρασκευή τους, μετά από 2 ημέρες και μετά από μία εβδομάδα

7.2 Συμπεράσματα

Όλα τα παραπάνω συνιστούν μια ενδιαφέρουσα και πολλά υποσχόμενη έναρξη μελέτης αναφορικά με τις προοπτικές χρήσης των μερικώς κομποστοποιημένων αποβλήτων, στην παραγωγή τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η εξαγωγή υδροκολλοειδών, γαλακτωματοποιητών ή άλλων πολυφαινολικών από τα μερικώς κομποστοποιημένα απόβλητα μπορούν να αποτελέσουν έναν καινοτόμο, γρήγορο και οικονομικό τρόπο αξιοποίησης των εκτεταμένων αποβλήτων της γεωργικής βιομηχανίας. Ωστόσο, αυτό το κομμάτι παραμένει ανεξερεύνητο και χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Η μερική κομποστοποίηση στερεών αποβλήτων επεξεργασίας ελιάς μπορεί να δώσει γαλακτωματοποιητές οι οποίοι είναι ικανοί να απορροφούνται στις διεπιφάνειες λαδιού-νερού των όξινων γαλακτωμάτων και να τα σταθεροποιούν έναντι της συσσωματώσεως. Παρόλα αυτά, είναι λιγότερο επιτυχημένοι στη σταθεροποίηση ενάντια στην ωρίμανση του Ostwald. Το ιδανικό pH εκχύλισης είναι το 5. Η ικανότητα αυτών των γαλακτωματοποιητών να σταθεροποιούν τα γαλακτώματα επί μερικές ημέρες οφείλεται στην παρουσία των προϊόντων διάσπασης των πρωτεϊνικών και πολυσακχαριτικών συστατικών των στερεών αποβλήτων που παράγονται κατά τη διάρκεια της κομποστοποίησης. Οι εκχυλίσεις σε υψηλότερο pH δεν προσφέρουν τέτοια προϊόντα διάσπασης καθώς οι ηλεκτροστατικές έλξεις διατηρούν τα προϊόντα αυτά στην φυτική μήτρα από την οποία προέρχονται. Τελικώς, όλα τα παραπάνω λειτούργησαν ως μια επίδειξη της ικανότητας των μερικώς κομποστοποιημένων υπολειμμάτων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

8. Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού επιφανειοδραστικών πολυμερών από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων για τους μήνες Νοέμβριος 2017-Μάιος 2018

8.1 Αποτελέσματα φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των υδροκολλοειδών από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων σε μία περίοδο 6 μηνών, από τον Νοέμβριο του 2017 μέχρι τον Μάιο του 2018.

8.1.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

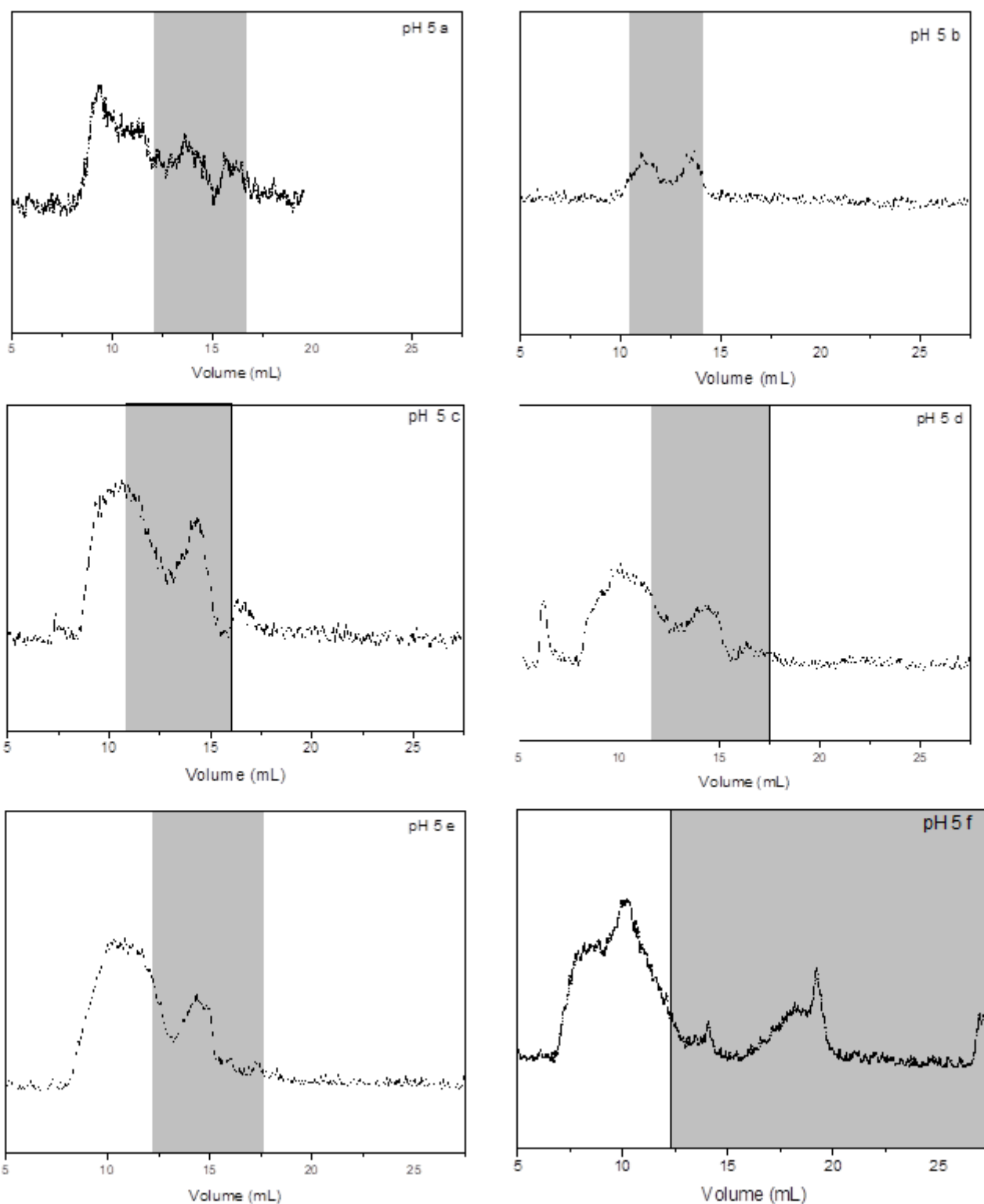
Στην **Εικόνα 18** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) για τους μακρομοριακούς πληθυσμούς που εκχυλίστηκαν σε pH 5 από απόβλητα ελαιοτριβείου τα οποία ήταν υπό κομποστοποίηση, ξεκινώντας από την αρχή της διαδικασίας (a) μέχρι και το τέλος της εξάμηνης διαδικασίας (f). Θα πρέπει να τονιστεί ότι το δείγμα (b) ή τα επόμενα σχήματα (c έως f) δεν εξελίχθηκαν απευθείας από το δείγμα (a). Κάθε δείγμα είναι αποτέλεσμα διαφορετικής εκχύλισης σε δεδομένο χρόνο από το μείγμα που υποβάλλεται σε κομποστοποίηση. Επομένως, οι τυχόν μεταβολές μεταξύ των δειγμάτων αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές στην δυνατότητα εξαγωγής των συστατικών, αντί των αλλαγών που υφίστανται σε ένα μόνο δείγμα.

Παρέχονται δεδομένα από έναν ανιχνευτή σκέδασης φωτός λείζερ που καταγράφει στα 90 ° (SLS) και έναν ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας στα 280 nm (UV), με τις περιοχές υψηλής απορρόφησης στο UV (280 nm) να επισημαίνονται με γκρι χρώμα. Τα εκχυλίσματα από τα μη κομποστοποιημένα υπολείμματα που παρουσιάζονται στο (a) αποτελούνται από μια μεγάλη ποικιλία μακρομοριακών πληθυσμών που κυμαίνονται σε όγκος έκλυσης από τα 7 mL μέχρι τα 14 mL και μετά από τα 15.5 mL έως τα 17 mL. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός εντοπίζεται στα 9-10 mL, ένας χρόνος έκλυσης που αντιστοιχεί σε εκείνο των δεξτρανών μοριακού βάρους 1.1 MDa. Η απουσία απορρόφησης στο UV (280 nm) σε αυτή την περίπτωση υποδεικνύει την απουσία Trp, Tyr, Phe ή δισουλφιδικών δεσμών (Aitken & Learmonth, 2009), άρα και έμμεσα την απουσία πρωτεϊνών. Επομένως, η κορυφή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε πολυσακχαριτικές δομές περίπου 1 MDa. Από τους

μικρότερους, σε μοριακό βάρος, πληθυσμούς δύο περιλαμβάνουν συζευγμένες οντότητες που απορροφούν στα 280 nm και εκλύονται ανάμεσα στα 13 mL και 17 mL.

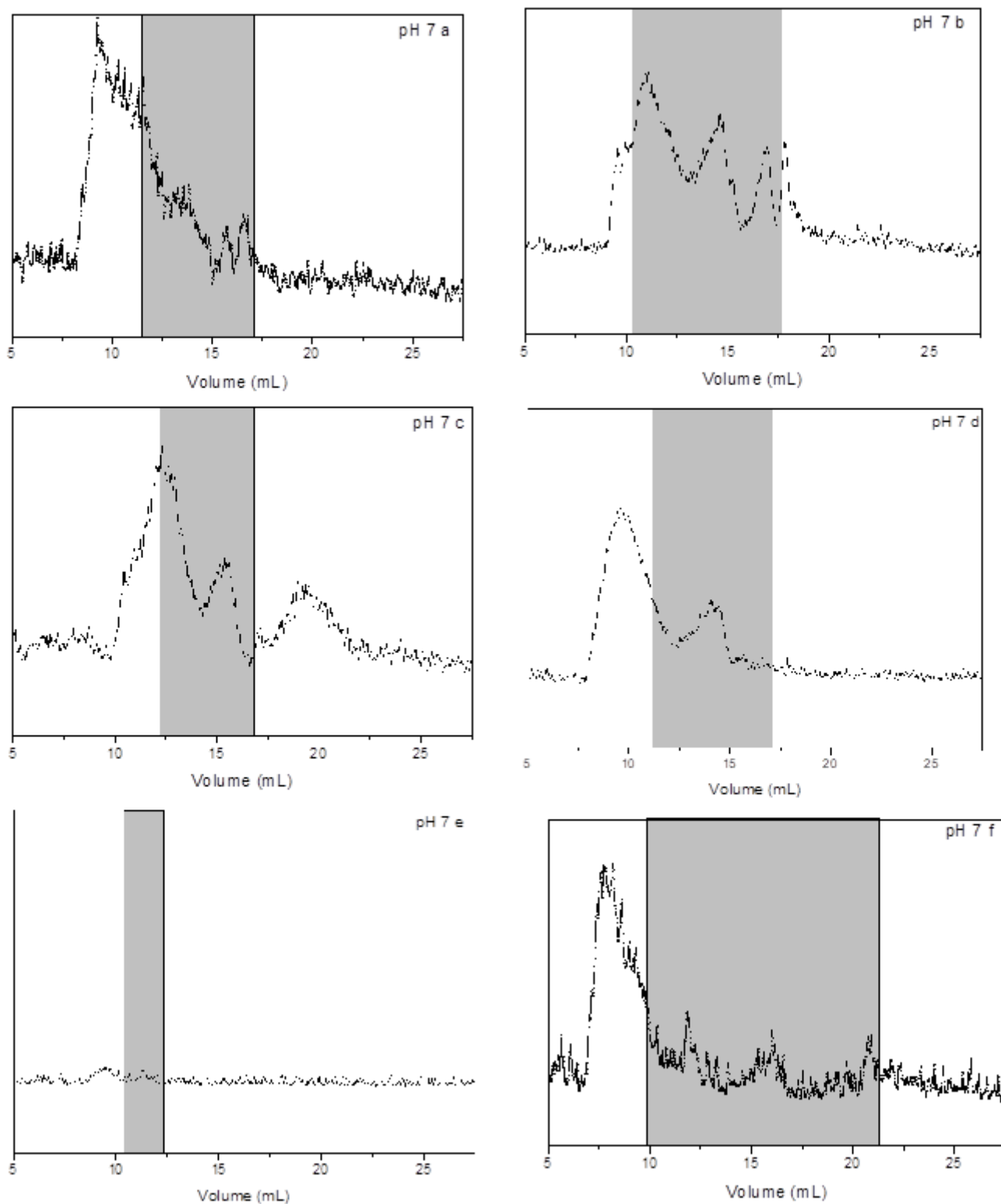
Μετά από 2 μήνες κομποστοποίησης, οι πληθυσμοί μεγαλύτερου μοριακού βάρους εκλύονται μεταξύ 10 και 14 mL (b) και βάσει σύγκρισης με τους όγκους έκλυσης των δεξτρανών, αντιστοιχούν σε 100.000-500.000 Da. Ο δεύτερος πληθυσμός απορροφά στο UV (280 nm). Η γενική εικόνα είναι ότι μετά από δύο μήνες κομποστοποίησης, οι πολυσακχαρίτες που αποκτήθηκαν μέσω της έκλυσης σε pH 5 είναι σημαντικά μικρότεροι συγκριτικά με εκείνους που παρατηρήθηκαν στην αρχή της κομποστοποίησης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες είναι μικρότερου μοριακού βάρους, ενδεικτικό είτε της μερικής υδρόλυσης αυτών είτε της διάσπασης της τεταρτοταγούς δομής και την απελευθέρωση πρωτεϊνικών μονομερών κατά την κομποστοποίηση.

Στα γραφήματα c, d και e παρατηρούμε ότι κατά την διάρκεια του τρίτου, τέταρτου και πέμπτου μήνα της κομποστοποίησης, εκλύονται δύο βασικοί πληθυσμοί: ένας που δεν απορροφά στο UV, περίπου στα 10 mL, ο οποίος σχετίζεται με πολυσακχαρτικές οντότητες μεγέθους περίπου 1 MDa και ένα πρωτεϊνικό γκρουπ (απορροφά στο UV) που εκλύεται στα 14 mL. Αυτή είναι μια εικόνα συγκρίσιμη με εκείνη που παρουσιάστηκε στην έναρξη της κομποστοποίησης (a). Για να κατανοήσουμε τους λόγους για τους οποίους λήφθηκε το χρωματογράφημα (b) στους δύο μήνες, πρέπει να θυμόμαστε ότι η εκχύλιση ενός μακρομορίου από μια στερεή μήτρα συνεπάγεται τον ανταγωνισμό μεταξύ των δυνάμεων που προσελκύουν το πολυμερές πάνω στην αρχική του μήτρα (στην προκειμένη ο στερεός πολτός ελιάς) και εκείνων που προσελκύουν στο εκχυλιστικό μέσο (εδώ νερό) (Ritzoulis C. , 2017). Φαίνεται ότι η διάσπαση της μήτρας ελιάς προχωρεί επαρκώς στη μέση της διαδικασίας κομποστοποίησης, ώστε να επιτρέπεται η έκλυση μεγάλων μορίων. Στο γράφημα των έξι μηνών (f), η διάσπαση της μήτρας ελιάς έχει ολοκληρωθεί σε βαθμό που μικρότερα μόρια εκλύονται σε μεγάλο βαθμό και μπορούν να παρατηρηθούν από τις κορυφές που εμφανίζονται στον ανιχνευτή SLS σε μεγάλους όγκους έκλυσης (17-20 mL) και λόγω της ευρείας περιοχής απορρόφησης στο UV.



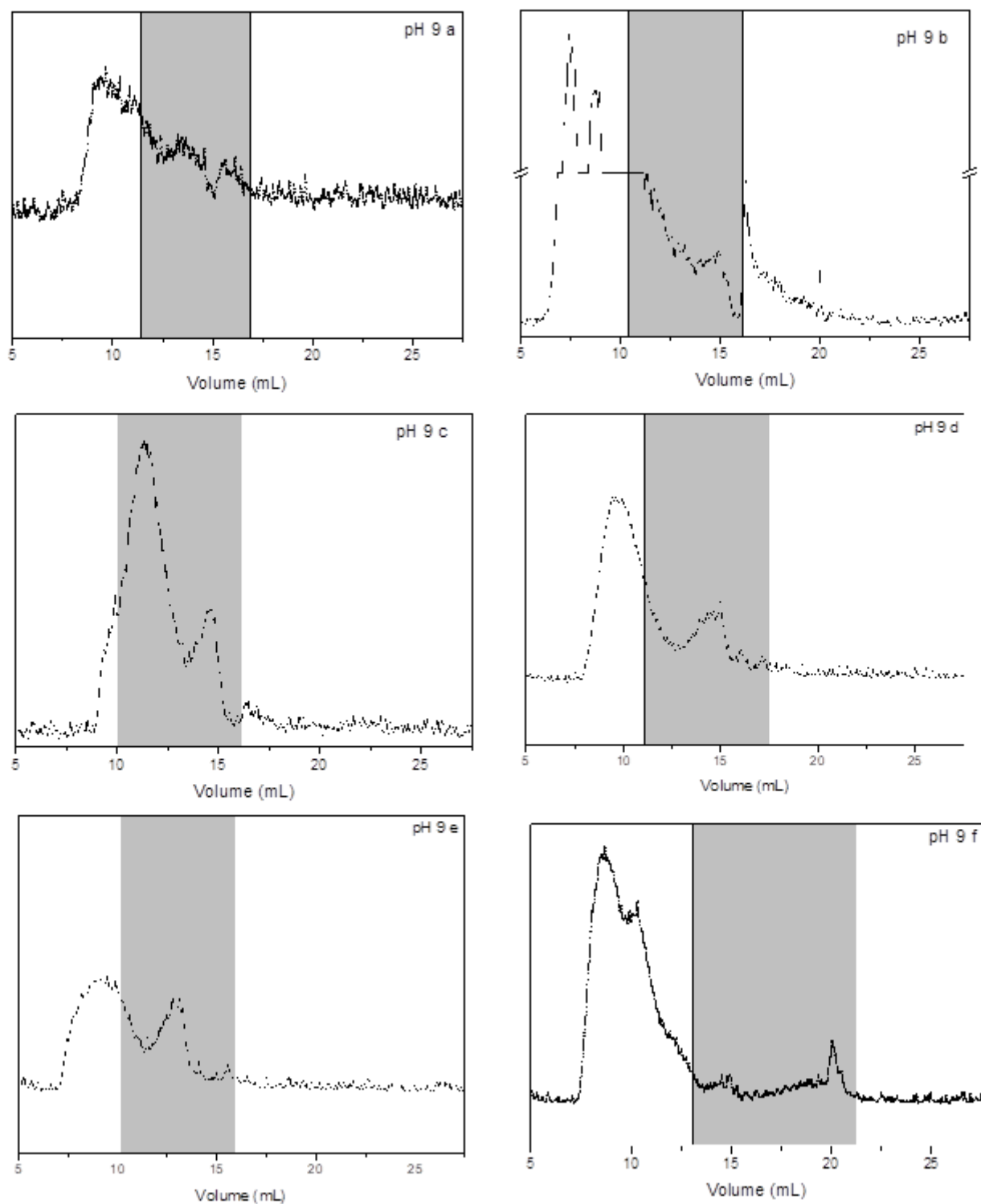
Εικόνα 18 - Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών (SEC) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν σε pH 5. Παρουσιάζεται ο ανιχνευτής SLS. Οι γκριζες περιοχές υποδεικνύουν τα σημεία έκλουσης στα οποία υπήρχε ισχυρή απορρόφηση στο UV στα 280 nm. Τα γραφήματα παρουσιάζουν εκχυλίσματα από μη κομποστοποιημένα δείγματα (a), εκχυλίσματα μετά από κομποστοποίηση 2 μηνών (b), μετά από κομποστοποίηση 3 μηνών(c), 4 μηνών (d), 5 μηνών (e) και 6 μηνών (f).

Στην **Εικόνα 19** παρατίθενται τα δεδομένα της SEC για τα εκχυλίσματα που αποκτήθηκαν με εκχύλιση σε pH 7. Στην έναρξη της διαδικασίας κομποστοποίησης τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με εκείνα στο pH 5: ένας μεγάλος πολυσακχαρτικός πληθυσμός, ακολουθούμενος από πρωτεϊνικούς πληθυσμούς. Ωστόσο, μετά από δύο μήνες κομποστοποίησης, η εκχύλιση προσφέρει μία πολύ διαφοροποιημένη απόδοση με πολλαπλές κορυφές από 10 έως 18 mL, καλύπτοντας έτσι ένα μεγάλο εύρος μοριακού βάρους το οποίο κυμαίνεται από 500 kDa μέχρι 5 kDa. Το εύρος απορρόφησης στο UV είναι επίσης μεγαλύτερο γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη περισσότερων πρωτεϊνικών πληθυσμών. Καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες συνήθως έχουν ΙΣ κοντά σε pH 5, είναι φορτισμένες σε pH 7, επομένως είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό. Έτσι, είναι αναμενόμενο ότι η εκχύλιση σε pH 7 θα αποδώσει μια μεγαλύτερη ποικιλία πρωτεϊνών συγκριτικά με την αντίστοιχη διαδικασία στο pH 5. Μετά την πάροδο τριών μηνών εμφανίζεται άλλη μία κορυφή που δεν απορροφά στο UV μεταξύ 19-20 mL (c), η οποία αντιστοιχεί σε προϊόντα υδρόλυσης πολυσακχαριτών. Η παρατήρηση ότι αυτή η κορυφή απουσιάζει από το γράφημα (d) υποδηλώνει ότι τα τμήματα αυτά υδρολύθηκαν περαιτέρω σε ολιγοσακχαρίτες και δι-μονοσακχαρίτες, τα οποία δεν ανιχνεύονται. Μετά από 5 μήνες κομποστοποίησης, η υδρόλυση φαίνεται να έχει ολοκληρωθεί σε έναν βαθμό όπου δεν εκλούνται άλλοι πολυμερικοί πληθυσμοί. Η κυτταρινική μήτρα και ορισμένες πεπτιδικές οντότητες παραμένουν και απελευθερώνονται για να εκχυλιστούν στο τέλος της κομποστοποίησης και εμφανίζονται ως μία κορυφή που δεν απορροφά στο UV στα 8 mL και μια ευρεία περιοχή μικρότερων κορυφών που απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία (f).



Εικόνα 19 - Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών (SEC) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν σε pH 7. Παρουσιάζεται ο ανιχνευτής SLS. Οι γκριζες περιοχές υποδεικνύουν τα σημεία έκλυσης στα οποία υπήρχε ισχυρή απορρόφηση στο UV στα 280 nm. Τα γραφήματα παρουσιάζουν εκχυλίσματα από μη κομποστοποιημένα δείγματα (a), εκχυλίσματα μετά από κομποστοποίηση 2 μηνών (b), μετά από κομποστοποίηση 3 μηνών(c), 4 μηνών (d), 5 μηνών (e) και 6 μηνών (f).

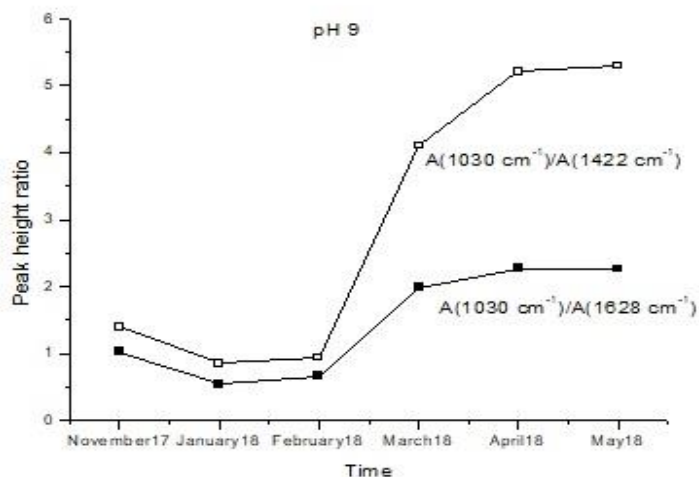
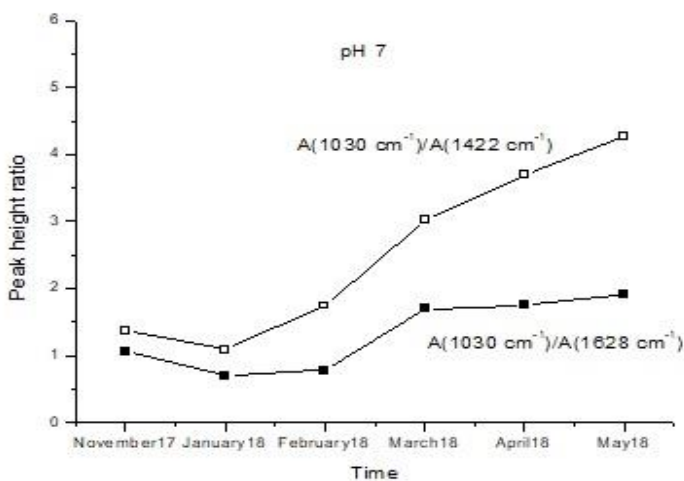
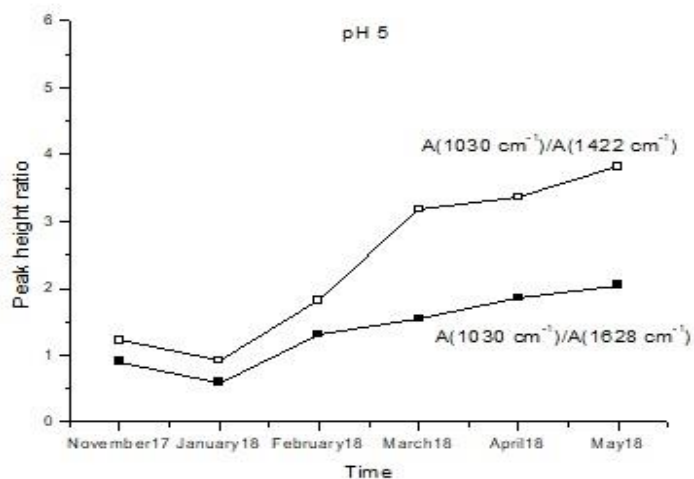
Τέλος, στην περίπτωση εκχύλισης σε pH 9 (Εικόνα 20) εκθέτονται τα σάκχαρα σε ένα περιβάλλον που ευνοεί την αλκαλική υδρόλυση των πολυσακχαριτών και αυξάνει περαιτέρω το αρνητικό φορτίο των αδύναμων ομάδων οξέων των πρωτεϊνών. Τα παραπάνω αναμένεται να οδηγήσουν στην εκχύλιση διαφορετικών οντοτήτων συγκριτικά με το pH 5 και pH 7. Παρόλο που η σύσταση των εκχυλισμάτων που αποκτήθηκαν από μη επεξεργασμένα απόβλητα είναι παρόμοια με εκείνη που αποκτήθηκε σε άλλο pH, οι δύο μήνες κομποστοποίησης αυξάνουν σημαντικά την απόδοση συγκεκριμένων πληθυσμών, κυρίως τους πολυσακχαρίτες μεγάλου μοριακού βάρους (b) που εκλούνται στα 7-10 mL. Οι πληθυσμοί που εκλούνται στα 10-12 mL φαίνεται να είναι πρωτεογλυκάνες καθώς απορροφούν στα 280 nm. Εκτός από τις πρωτεΐνες που εκλούνται στα 15 mL, ένας αξιοσημείωτος πληθυσμός που δεν απορροφά στο UV εμφανίζεται στα 16 mL (αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος των 25 kDa βάσει σύγκρισης του χρόνου έκλυσης των δεξτρανών). Ο πληθυσμός αυτός θα έπρεπε να αποδοθεί στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών. Τα παραπάνω σχετίζονται με τον πληθυσμό που ανιχνεύτηκε στα pH 7 (c) στα 19 με 20 mL, στους 3 μήνες κομποστοποίησης. Προφανώς τα προϊόντα αυτά έχουν ήδη σχηματιστεί τον δεύτερο μήνα και το υψηλότερο pH επιτρέπει την εξαγωγή τους, πιθανώς λόγω αλληλεπιδράσεων με οποιεσδήποτε ιονισμένες πλευρικές ομάδες. Η εκχύλιση μετά από τρεις και τέσσερις μήνες παρουσιάζει πληθυσμούς παρόμοιους με εκείνους που προέκυψαν σε pH 7, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό πολυμερούς λαμβάνεται επίσης μετά από 5 μήνες κομποστοποίησης (e), σε αντίθεση με την έλλειψη εκχυλίσμου υλικού σε pH 7 (Εικόνα 19, e). Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί στην ικανότητα του ρυθμιστικού διαλύματος υψηλού pH να εξαναγκάζει την εισχώρηση ασθενών οξέων. Στα τελευταία στάδια της κομποστοποίησης (f), οι τυχόν υπολειμματικοί πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες απελευθερώνονται εύκολα από τη μήτρα έτσι ώστε να εκχυλιστούν.



Εικόνα 20 - Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών (SEC) των εκχυλισμάτων που προέκυψαν σε pH 9. Παρουσιάζεται ο ανιχνευτής SLS. Οι γκριζες περιοχές υποδεικνύουν τα σημεία έκλουσης στα οποία υπήρχε ισχυρή απορρόφηση στο UV στα 280 nm. Τα γραφήματα παρουσιάζουν εκχυλίσματα από μη κομποστοποιημένα δείγματα (a), εκχυλίσματα μετά από κομποστοποίηση 2 μηνών (b), μετά από κομποστοποίηση 3 μηνών(c), 4 μηνών (d), 5 μηνών (e) και 6 μηνών (f).

8.1.2 Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Προκειμένου να εκτιμηθεί η σύνθεση των εκχυλισμάτων όσον αφορά στους πολυμερικούς πληθυσμούς, συλλέχθηκαν τα φάσματα υπερύθρων (FTIR) μετασχηματισμού του Fourier με ρύθμιση εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR). Όλα τα φάσματα εμφανίζουν τις μεγαλύτερες κορυφές στα 1030 cm^{-1} και κορυφές στα 1628 cm^{-1} και 1422 cm^{-1} . Οι κορυφές στα 1628 cm^{-1} αντιστοιχούν στην περιοχή αμιδίου I πρωτεϊνών, ενώ όλα τα δείγματα εμφάνισαν κορυφές με μέγιστα στα 1030 cm^{-1} , που αντιστοιχούσαν στην απορρόφηση IR πολυσακχαριτών (Kacurakova & Ebringerova, 2000). Οι σχετικές ποσότητες πολυσακχαριτών προς πρωτεΐνες στα δείγματα παρουσιάζονται ως γραφικές παραστάσεις της αναλογίας μεταξύ των απορροφήσεων στα 1030 cm^{-1} προς 1628 cm^{-1} . Αν και η θέση της περιοχής αμιδίου II μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την κατάσταση ενυδάτωσης (Haris & Severcan, 1999), ήταν ασφαλές να αποδοθούν οι υπάρχουσες κορυφές στα 1422 cm^{-1} σε δονήσεις αμιδίου II, καθώς δεν υπάρχουν άλλοι υποψήφιοι για την συγκεκριμένο κορυφή. Μια δεύτερη γραφική παράσταση παρουσιάζεται σε κάθε pH με την αναλογία των απορροφήσεων στα 1030 cm^{-1} προς 1422 cm^{-1} , ως συμπληρωματική αναλογία πολυσακχαριτικών έναντι των δονήσεων αμιδικής μονάδας II. Όλα τα δεδομένα φαίνονται στην **Εικόνα 21**. Σε όλες τις τιμές pH, υπάρχει η ίδια τάση: και στις δύο περιπτώσεις (1030 cm^{-1} προς 1422 cm^{-1} και 1030 cm^{-1} προς 1628 cm^{-1}), η αναλογία σακχαρίτη προς πρωτεΐνη παραμένει σχετικά σταθερή ή μειώνεται ελαφρώς για τους δύο πρώτους μήνες και στη συνέχεια αυξάνεται σε υψηλές τιμές. Δηλαδή, καθώς οι προχωρούν διεργασίες κομποστοποίησης αυξάνεται η απόδοση των σακχάρων σε σχέση με εκείνη των πρωτεϊνών. Αυτό πρέπει να αποδοθεί στις ουσιαστικά μεγαλύτερες ποσότητες πολυσακχαρίτη στο αρχικό δείγμα, οι οποίες απελευθερώνονται από τη μήτρα κατά τη διαδικασία της εκχύλισης και μεταναστεύουν στην υδατική φάση.



Εικόνα 21 - Εξέλιξη του λόγου των κορυφών του FTIR με την πάροδο της κομποστοποίησης για δείγματα που εκχλίστηκαν σε pH 5, 7 και 9. Οι κυματιριθμοί των κορυφών παρουσιάζονται στα γραφήματα.

8.1.3 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των διεπιφανειακών φαινομένων

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να δώσει μια εικόνα για την χρονική εξάρτηση της επιφανειακής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων. Για να διερευνηθεί αυτό, η επιφανειακή δραστηριότητα μετρήθηκε σε όλα τα δείγματα υπό τη μορφή της παρακολούθησης της διεπιφανειακής τάσης ισορροπίας της μυγλούλης-νερού. Η μυγλούλη ενεργεί εδώ ως λιπαρή φάση. Η διεπιφανειακή τάση παρακολουθήθηκε για πέντε διαδοχικούς μήνες (χρόνος έναρξης και Ιανουάριο έως Μάιο) και σε τρεις συγκεντρώσεις pH (5, 7 και 9). Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις διεπιφανειακής τάσης χρησιμοποιήθηκε μια αμφίδρομη ανάλυση της διακύμανσης (χρόνος και pH συν σταθερά αποτελέσματα αλληλεπίδρασης) για να ανιχνευθεί η πιθανή σημασία του παράγοντα και οι διαφορές μεταξύ μέσων όρων χρησιμοποιώντας τα ζεύγη σύγκρισης του Tukey (p : 0,05). Δημιουργήθηκαν επίσης γραφικές απεικονίσεις των αποτελεσμάτων. Το λογισμικό Minitab® 18.1 (Minitab Inc.) χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση.

Ο **Πίνακας 4** αποκαλύπτει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές για κάθε παράγοντα και τον όρο αλληλεπίδρασης στην απόκριση διεπιφανειακής τάσης (τιμές p πολύ χαμηλότερες από 0,05). Αυτές οι διαφορές περιγράφονται ως μέσες συγκρίσεις επιπέδων στον **Πίνακα 5** και πιο αποτελεσματικά στην **Εικόνα 22**. Όσον αφορά στην επίδραση του χρόνου κομποστοποίησης, αν και τα αποτελέσματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μερικών μηνών, οι διαφορές στους μέσους όρους είναι μάλλον μικρές για να ληφθούν υπόψιν οι διαφορές στο δυνατότητα γαλακτωματοποίησης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, δεν υπάρχει επίμονη τάση ως συνάρτηση του χρόνου κομποστοποίησης. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων στην διεπιφανειακή τάση ισορροπίας με εκείνες της κατανομής μοριακού μεγέθους των εκχυλισμάτων ως συνάρτηση του χρόνου κομποστοποίησης και λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι πρωτεΐνες και τα προϊόντα υδρόλυσης τους αναμένεται να είναι κυρίως υπεύθυνες για την επιφανειακή δραστηριότητα των εκχυλισμάτων, υποδηλώνουν ότι η πρωτεϊνική υδρόλυση δεν έχει καμία επίδραση στην επιφανειακή τους δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, εάν η απόλυτη περιεκτικότητα των πρωτεϊνικών ειδών δεν μεταβάλλεται σημαντικά ως συνάρτηση του χρόνου κομποστοποίησης και υπάρχει μόνο μια μεταβολή στο μοριακό βάρος, αναμένεται μάλλον η διαφορά στον ρυθμό προσρόφησης των πρωτεϊνικών ειδών. Τέτοια

αποτελέσματα δεν εξετάστηκαν προς το παρόν και αν υπάρχει μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορές στην ικανότητα γαλακτωματοποίησης των εκχυλισμάτων επειδή η ταχεία προσρόφιση προστατεύει από τη συσσωμάτωση και την κροκίδωση στο σύστημα σύνθετης ροής σε έναν γαλακτωματοποιητή (κατά τη διάρκεια της γαλακτωματοποίησης) και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Από την άλλη πλευρά, η αλλαγή του pH της εκχύλισης δείχνει όχι μόνο μια σημαντική αλλά και μια επίμονη τάση στην ενδοεπιφανειακή ένταση ισορροπίας, αν και οι διαφορές ως προς τη δραστηριότητα είναι πολύ μικρές. Οι παρατηρούμενες διαφορές σχετίζονται με τα εξαγόμενα είδη και οι μετρήσεις επιφανειακής τάσης μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή ενός βέλτιστου pH για την εκχύλιση. Ο όρος αλληλεπίδρασης δείχνει σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κάθε μέσης αλλαγής στάθμης, αλλά στην πραγματικότητα δεν έχει καμία διακριτή τάση ρυθμού αλλαγής εκτός από μια βαθμιαία τελική αύξηση μέσα στο χρόνο για τα επίπεδα pH 5 και 9.

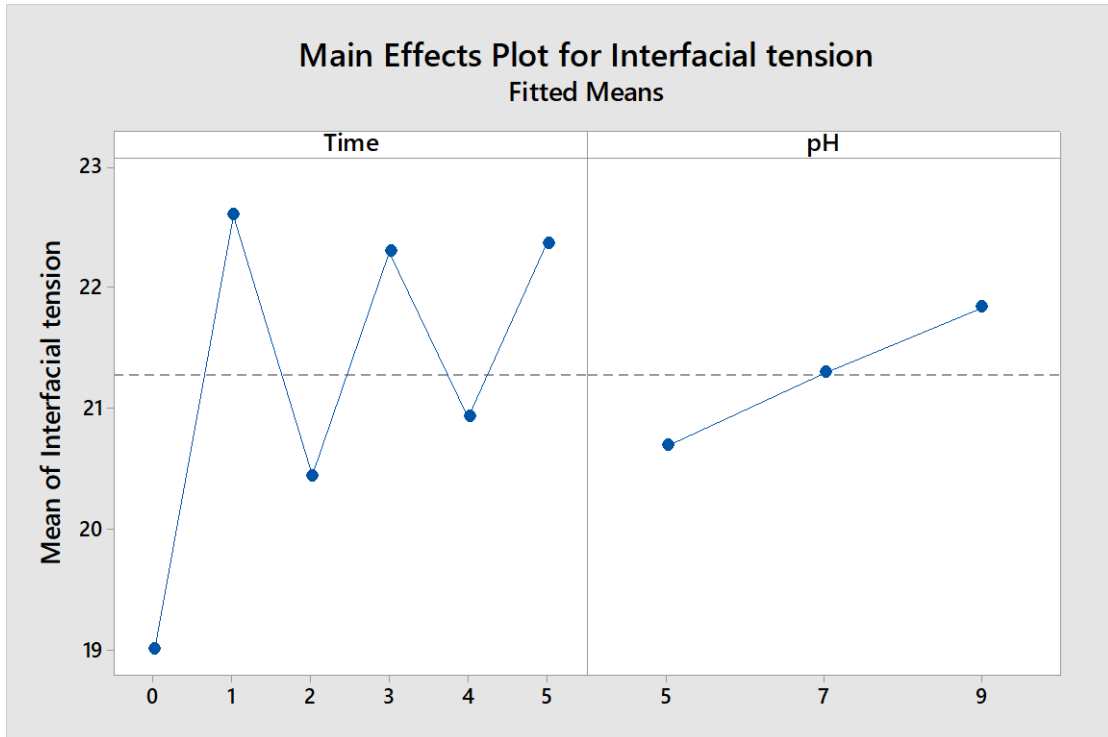
Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Μήνες κομποστοποίησης	5	59.659	32.57%	59.659	11.9319	201.88	0.000
pH εκχύλισης	2	7.891	4.31%	7.891	3.9454	66.75	0.000
Μήνες κομποστοποίησης*pH εκχύλισης	10	114.579	62.55%	114.579	11.4579	193.86	0.000
Error	18	1.064	0.58%	1.064	0.0591		
Total	35	183.193	100.00%				

Πίνακας 4 – Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων

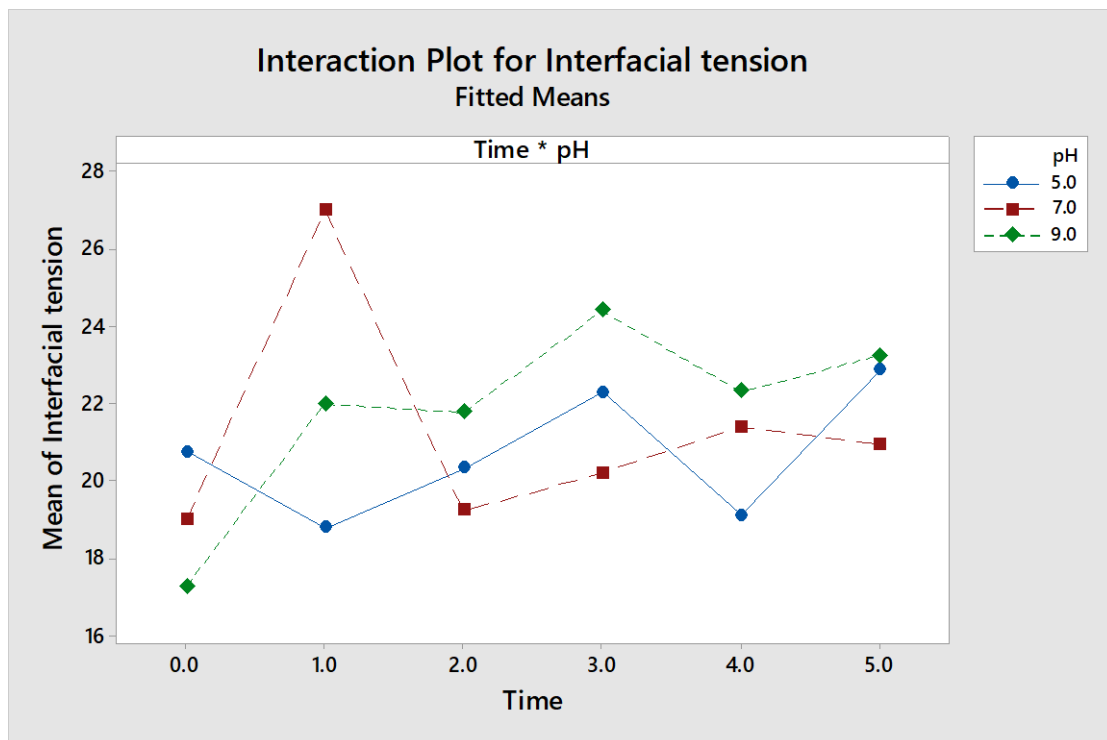
Μήνες Κομποστοποίησης	N	Mean γ (t) (mN/m)	Grouping	pH εκχύλισης	N	Mean γ (t) (mN/m)	Grouping
1	6	22.5992	A	9	12	21.8359	A
5	6	22.3658	A	7	12	21.2997	B
3	6	22.2995	A	5	12	20.6899	C
4	6	20.9357	B				
2	6	20.4440	C				
0	6	19.0068	D				

Means that do not share a letter are significantly different.

Πίνακας 5 - Ομαδοποίηση με χρήση της μεθόδου Tukey, μέθοδος σύγκρισης μέσω των όρων για όλα τα δεδομένα διεπιφανειακής τάσης.



Εικόνα 22 – Μεταβολές στην διεπιφανειακή τάση στο σύστημα μυγλούλη-νερό συναρτήσει χρόνου (αριστερά) και pH εκχυλίσματος (δεξιά).



Εικόνα 23 - Διάγραμμα αλληλεπίδρασης για την διεπιφανειακή τάση ισορροπίας νερού-μυγλούλης με την πάροδο του χρόνου (μήνες) για εκχυλίσματα σε pH 5, pH 7 και pH 9.

8.2 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω παρατηρήθηκε μέσω της SEC μια μεγάλη ποικιλία μακρομοριακών πληθυσμών στην περίπτωση του OC5 κατά την έναρξη της κομποστοποίησης, αλλά διάσπασή τους σε πολλά μικρότερα στο τέλος της διαδικασίας. Στις περιπτώσεις των OC7 και OC9 βρέθηκαν παρόμοιοι πληθυσμοί τους πρώτους τρεις με τέσσερις μήνες, αλλά στο OC7 δεν υπήρχε πλέον εκχυλίσμο υλικό μετά τους πέντε μήνες σε αντίθεση με το OC9 που εμφανίζει ένα σημαντικό ποσοστό πολυμερούς την ίδια χρονική περίοδο.

Από το FT-IR μελετώντας την αναλογία σακχάρων προς τις πρωτεΐνες προέκυψε ότι ο λόγος αυτών παραμένει σχετικά σταθερός ή μειώνεται ελαφρώς κατά τους πρώτους δύο μήνες ενώ μετά αυξάνεται αρκετά. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει αύξηση της απόδοσης των σακχάρων σε σχέση με τις πρωτεΐνες όσο εξελίσσεται η κομποστοποίηση γεγονός που οφείλεται στις αυξημένες ποσότητες σακχαριτών στο αρχικό δείγμα.

Τέλος, από την στατιστική ανάλυση των διεπιφανειακών φαινομένων προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) τόσο στην περίπτωση του χρόνου όσο και του pH. Ωστόσο, αναφορικά με τον χρόνο δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στις τιμές ισορροπίας για να ληφθούν υπόψιν στην μεταβολή της γαλακτωματοποιητικής δυνατότητας των δειγμάτων σε βάθος χρόνου. Επομένως, η πρωτεϊνική υδρόλυση δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στην επιφανειακή δραστηριότητα αν και στην περίπτωση που η απόλυτη περιεκτικότητα των πρωτεϊνικών ειδών δεν μεταβάλλεται σημαντικά ως συνάρτηση του χρόνου κομποστοποίησης και υπάρχει μόνο μια μεταβολή στο μοριακό βάρος, αναμένεται μάλλον η διαφορά στον ρυθμό προσρόφησης των πρωτεϊνικών ειδών γεγονός που θα επηρεάζει και την διεπιφανειακή τάση. Κάτι τέτοιο δεν εξετάστηκε, αλλά χρήζει περαιτέρω μελέτης. Επιπλέον, όσον αφορά στο pH παρατηρήθηκε μια βαθμιαία τελική αύξηση στον χρόνο για το pH5 και το pH9 γεγονός που θα μπορούσε να βοηθήσει στην επιλογή του βέλτιστου pH εκχυλίσεως.

9. Συμπεράσματα – Προτάσεις

9.1 Συμπεράσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, τα εκχυλίσματα από κομποστοποιημένα απόβλητα ελαιοτριβείων θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία καλή επιλογή γαλακτωματοποιητών για την βιομηχανία τροφίμων, αλλά ενδεχομένως και για άλλους κλάδους. Παρατηρήθηκαν διαφορές στην περίπτωση των μερικώς κομποστοποιημένων αποβλήτων καθώς θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως αξιόπιστοι γαλακτωματοποιητές, αλλά με περιορισμένο χρόνο ζωής μέσα σε ένα τρόφιμο. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής κάθε περίπτωση δειγμάτων μπορεί να αξιοποιηθεί αναλόγως. Τα πλήρως κομποστοποιημένα απόβλητα αποτελούν μία πολύ καλή πηγή γαλακτωματοποιητών με αυξημένη διάρκεια ζωής σε τρόφιμα με ουδέτερο pH με ιδανικό pH εκχύλισης να είναι το 7 λόγω της σταθερότητας που επιδεικνύει. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των μερικώς κομποστοποιημένων υπολειμμάτων ιδανικό pH εκχύλισης αποδείχθηκε το 5, αλλά η εφαρμογή του θα μπορούσε να γίνει σε όξινα τρόφιμα με περιορισμένο χρόνο ζωής. Τέλος, αναφορικά με την συνολική κινητικότητα των δειγμάτων διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων κομποστοποίησης με βασικό στοιχείο την υδρόλυση των πρωτεϊνών σε βάθος χρόνου και την αύξηση της απόδοσης των σακχάρων, ενώ μέσω της στατιστικής ανάλυσης των διεπιφανειακών φαινομένων δεν μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την επίδραση του χρόνου, αλλά μπορεί να επιλεγθεί ενδεχομένως το βέλτιστο pH εκχύλισης, το οποίο φαίνεται να είναι το 5. Με περαιτέρω έρευνα στην υδρόλυση των πρωτεϊνών και της επίδρασής τους στην επιφανειακή τάση, άρα και στην γαλακτωματοποιητική ικανότητα των εκχυλισμάτων, θα μπορούσε να προσδιοριστεί ασφαλέστερα το ιδανικό διάστημα κομποστοποίησης. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι ακόμα και τα μερικώς κομποστοποιημένα υπολείμματα έδωσαν σταθερά γαλακτώματα.

9.2 Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Στα πλαίσια των προτάσεων για μελλοντικές μελέτες θα ήταν η παραγωγή γαλακτωμάτων υπό άλλες συνθήκες και για άλλες χρήσεις (π.χ. φαρμακευτικές), καθώς και οι διαφορές στον τρόπο εκχύλισης, στην σύσταση των αρχικών δειγμάτων, αλλά και η χρήση άλλων παραπροϊόντων από την βιομηχανία τροφίμων. Επιπλέον, σημαντική θα ήταν και η περαιτέρω μελέτη της υδρόλυσης των πρωτεϊνών ως προς

την επίδρασή τους στην επιφανειακή τάση των δειγμάτων με σκοπό να διαπιστωθεί η βέλτιστη χρονική διάρκεια της κομποστοποίησης των υπολειμμάτων.

Όπως είναι αναμενόμενο λοιπόν, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σε κάθε περίπτωση για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων πριν την πρακτική εφαρμογή τους.

Βιβλιογραφία

- Abramowitz, M. (2003). *Microscope: Basics and Beyond*. Neo York: Olympus America Inc. Scientific Equipment Division.
- Agboola, S., & Dalgeish, D. (1996). Effects of pH and Ethanol on the Kinetics of Destabilisation of Oil-in-Water Emulsions Containing Milk Proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, σσ. 448-454.
- Aitken, A., & Learmont, P. (2009). *Protein determination by UV absorption*. In J.W. Walker (Ed.), *The protein protocols handbook (3rd ed.)*. NY: Humana Press.
- Aitken, A., & Learmonth, P. (2009). Protein determination by UV absorption. *The Protein Protocols Handbook (3rd edition)*.
- Allouche, N., Fki, I., & Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of agricultural and food chemistry*, σσ. 267-273.
- Al-Malah, K. A., & Abu-Lail, N. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separation and Purification Technologies*, 20, σσ. 225-234.
- Arvanitoyiannis, I., Kassaveti, A., & Stefanatos, S. (2007). Current and potential uses of thermally treated olive oil waste. *International journal of food science & technology*, σσ. 852-867.
- Aveyard, R., & Haydon, D. A. (1965). Thermodynamic Properties of Aliphatic Hydrocarbon/water Interfaces. *Trans. Faraday Soc*, σσ. 2255-2261.
- Baddi, G. A. (2004). Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, σσ. 39-44.
- Bari, Q., & Koenig, A. (2001). Effect of air recirculation and reuse on composting of organic solid waste. *Resources, Conservation and Recycling*, 33, σσ. 93-111.
- Barranco, D., Fernandez, R., & Rallo, L. (1997). *El cultivo del olivo*. Madrid: Junta de Andalucia-Mundi-Prensa.
- Cardoso, S., Coimbra, M., & Da Silva, J. (2003). Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers*, σσ. 125-133.
- Cayuela, M. S.-M., & Roig, A. (2005). Evaluation of two different aeration systems for compostin two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry*, 41 (3), σσ. 616-623.

- Cegarra, J. P., & Garcia, D. (1996). Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38, σσ. 193-203.
- Chandra, M., & Sathiavelu, S. (2009). Waste management in the olive oil industry in the Mediterranean region by composting. *Clean Technologies and Environmental Policy*, σσ. 293-298.
- Coimbra, M., Waldron, K., & Selvendran, R. (1994). Isolation and characterisation of cell wall polymers from olive pulp (*Olea europaea* L.) . *Carbohydrate Research*, σσ. 245-262.
- Cosgrove, T. (2010). *Colloid science: principles, methods and applications*. John Wiley & Sons.
- Coupland, J., & McClements, D. (2001). Droplet size determination in food emulsions: comparison of ultrasonic and light scattering methods. *Journal of Food Engineering*, σσ. 117-120.
- DellaGreca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., & Temusi, F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, σσ. 352-359.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, σσ. 1532-1552.
- Djilas, S., Canadanovix-Brunet, J., & Cetkovic, G. (2009). By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, σσ. 191-202.
- Ebbing, D., & Gammon, S. (1999). *General Chemistry (6th ed.)*. Boston: Houghton Mifflin.
- Ferreira, A., Nunes, A., Castro, A., Ferreira, P., & Coimbra, M. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydr. Polym.*, σσ. 490-499.
- Ferreira, C., Calisto, V., Cuerda-Correa, E., Otero, M., Nadais, H., & Esteves, V. (2016). Comparative valorisation of agricultural and industrial biwastes by combustion and pyrolysis. *Bioresource technology*, 218, σσ. 918-925.
- Filippi, C. B.-M., & Saviozzi, A. (2002). Co-composting of olive oil mill by-products, chemical and microbiological evaluations. *Compost Science and Utilization*, 10, σσ. 63-71.

- Filotheou, Ritzoulis, C., Avgidou, M., Kalogianni, E., Pavlou, A., & Panayiotou, C. (2015). Novel emulsifiers from olive processing solid waste. *Food Hydrocolloid* 48, σσ. 274-281.
- Food and Agriculture Organisation . (2003).
- Friberg, S., Larsson, K., & Sjoblom, J. (2003). *Food emulsions (4th ed.)*. Boca Raton: CRC press.
- Gaborieau, M., & Castignolles, P. (2011). Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and bioanalytical chemistry*, σσ. 1413-1423.
- Garti, N., & Bisperink, C. (1998). Double emulsions: progress and applications. *Current opinion in colloid & interface science*, σσ. 657-667.
- Gil-Serrano, A., & Tejero-Matero, P. (1988). A xyloglucan from olive pulp. *Carbohydrate research*, σσ. 278-281.
- Haris, P., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Enzymatic*, σσ. 207-221.
- Haugland, R. (1992). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals: Molecular Probes*.
- Hoefler, A. (2004). *Hydrocolloids: practical guides for the food industry*. Eagan: Ed American.
- Kacurakova, M. C., & Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate polymers*, σσ. 195-203.
- Karim, A., & Bhat, R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in food science & technology*, σσ. 644-656.
- Kavvadias, V., Doula, M., Komnitsas, K., & Liakopoulou, N. (2010). Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *Journal of hazardous materials*, σσ. 144-155.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, σσ. 549-559.
- Lozano-Sanchez, J., Giambanelli, E., Quirantes-Pine, R., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2011). Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, σσ. 11491-11500.

- McClements, D. (2005). *Food emulsions: principles, practices and techniques (2nd ed.)*. Boca Raton: CRC press.
- Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2009). Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Progress in Natural Science*, σσ. 1515-1521.
- Morrison, N., Clark, R., Chen, Y., Talashek, T., & Sworn, G. (1999). Gelatin alternatives for the food industry. *Physical chemistry and industrial application of gellan gum*, σσ. 127-131.
- Murphy, D. (2002). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. John Wiley & Sons.
- Neto Andre, R. P. (2005). Fluidised bed co-gasification of coal and olive oil industry wastes. *Fuel*, σσ. 1635-1644.
- Oliveira, E. E. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: production and characterization. *Bioresource Technology*, σσ. 5402-5406.
- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical technology and biotechnology*, σσ. 1475-1485.
- Paredes, C. R.-M., & Cegarra, I. (2000). Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biology and Fertilisation of Soils*, 32, σσ. 222-227.
- Paredes, M., Moreno, E., Ramos-Cormenzana, A., & Martinez, J. (1987). Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, σσ. 1557-1564.
- Pavlou, Ritzoulis, C., Filotheou, A., & Panayiotou, C. (2016). Emulsifiers extracted from winery waste. *Waste and Biomass Valorization*, 7, σσ. 533-542.
- Piotrowska, A., Rao, M., Scotti, R., & Gianfreda, L. (2011). Changes in soil chemical and biochemical properties following amendment with crude and dephenolized olive mill waste water (OMW). *Geoderma*, σσ. 8-17.
- Rana, G., Rinaldi, M., & Introna, M. (2003). Volatilisation of substances after spreading olive oil waste water on the soil in a Mediterranean environment. *Agriculture, ecosystems & environment*, σσ. 49-58.
- Ritzoulis, C. (2013). *Introduction to the physical chemistry of foods*. CRC Press.
- Ritzoulis, C. (2017). Mucilage formation in food: A review on the example of okra. *International Journal of Food Science and Technology* 52, σσ. 59-67.

- Ritzoulis, Marini, E., Aslanidou, A., Georgiadis, N., Karayannakidis, P., Koukiotis, C., και συν. (2014). Hydrocolloids from quince seed: Extraction, characterization, and study of their emulsifying/stabilizing capacity. *Food hydrocolloids* 42, σσ. 178-186.
- Sun, X. F., & Baird, M. S. (2005). Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate polymers*, σσ. 15-26.
- Sun, X., Xu, F., Zhao, H., Sun, R., Fowler, P., & Baird, M. (2005). Physicochemical characterisation of residual hemicelluloses isolated with cyanamide-activated hydrogen peroxide from organosolv pre-treated wheat straw. *Bioresour. Technol.*, σσ. 1342-1349.
- Van de Hulst, H. (1982). *Light scattering by small particles*. New York: Dover Publications Inc.
- Vierhuis, E., Korver, M., Schols, H., & Voragen, A. (2003). Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea* cv moraiolo) in relation to processing for oil extraction. *Carbohydrate Polymers*, σσ. 135-148.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F., και συν. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of agricultural and food chemistry*, σσ. 3397-3401.
- Vitolo, S., Petarca, L., & Bresci, B. (1999). Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource technology*, σσ. 129-137.
- Ασημοπούλου, Α. (2008). *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*. Θεσσαλονίκη.
- Δημοπούλου, Μ. (2017). *Συστηματική Μελέτη Βιοπολυμερών και Υδροκολλοειδών από τον Καρπό της Μπάμιας (*Abelmoschus Esculentus*)*. Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Παναγιώτου, Κ. (1998). *Διεπιφανειακά φαινόμενα και κολλοειδή συστήματα (2nd ed.)*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη.
- Παναγιώτου, Κ. (2006). *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών (3rd ed.)*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Πήγασος.
- Χατζηϊωάννου, Θ. Μ. (2003). *Ενόργανη Ανάλυση (5th ed.)*. Αθήνα: Εκδόσεις Μαυρομάτη.