



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**“ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΡΥΘΡΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΜΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟ ΔΙΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΠΑΡΚΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΜΕ
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΟΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ/ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ/ΝΕΡΟΥ
ΥΠΟ ΗΠΙΕΣ ΟΞΙΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ”**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ ΑΜ:2819089

ΓΙΑΓΤΖΗ ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΑΜ:2819092

Επιβλέπων Καθηγητής

Δρ. Μακρής Π. Δημήτριος

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2025



Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**UNIVERSITY OF
THESSALY**

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

**“ORGANOSOLV TREATMENT OF RED GRAPE POMACE FOR EFFECTIVE
RECOVERY OF ANTIOXIDANT POLYPHENOLS AND PIGMENTS USING A
TERNARY GLYCEROL/ETHANOL/WATER SYSTEM UNDER MILD ACIDIC
CONDITIONS”**



DIPLOMA THESIS

by Geropoulou Maria, Giagtzi Elisavet

Supervisor

Dr. Dimitris P. Makris

KARDITSA 2025

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της προπτυχιακής διπλωματικής μας εργασίας, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες στον καθηγητή μας, κύριο Μακρή Δημήτριο, για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μας το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα θέλαμε να απευθύνουμε στον κύριο Χατζημητάκο Θεόδωρο και τον κύριο Παλαιογιάννη για τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστούμε στους υποψήφιους διδάκτορες Κοτσού Κωνσταντίνα και Καλομπάτσιο Δημήτριο για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθειά τους, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε την ευγνωμοσύνη μας στις οικογένειές μας για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν i) η ανάπτυξη ενός νέου, πράσινου τριτοταγούς συστήματος διαλυτών που αποτελείται από νερό, αιθανόλη και γλυκερόλη, και II) η εφαρμογή μιας επεξεργασίας ερυθρών στεμφύλων με οργανικό διαλύτη (RGP) για την αποτελεσματική παραγωγή εκχυλισμάτων που περιέχουν πολυφαινόλες με ενισχυμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η επεξεργασία που αναπτύχθηκε πραγματοποιήθηκε υπό ήπιες όξινες συνθήκες, που προσδίδονται με την προσθήκη κιτρικού οξέος, και που αρχικά αξιολογήθηκε με βάση τη δριμύτητα, δημιουργώντας γραμμικά μοντέλα που περιέγραφαν τη συσχέτιση μεταξύ της απόδοσης σε ολικές πολυφαινόλες και των παραγόντων της δριμύτητας. Για να πραγματοποιηθεί η βελτιστοποίηση της επεξεργασίας, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία της επικριτικής επιφάνειας, λαμβάνοντας υπόψη την οξύτητα του διαλύτη και το χρόνο παραμονής ως μεταβλητές της επεξεργασίας. Η βελτιστοποιημένη επεξεργασία παρείχε μέγιστες ολικές πολυφαινόλες ($165,52 \pm 5,84 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$), ολικές χρωστικές ουσίες ($4,35 \pm 0,18 \text{ mg MnE g}^{-1} \text{ DM}$) και ολικές φλαβανόλες ($31,50 \text{ mg CtE g}^{-1} \text{ DM}$), και εκχυλίσματα με ιδιαίτερα ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε συγκεκριμένα συστατικά με υψηλή αντιοξειδωτική ισχύ, όπως η κατεχίνη, που προσδιορίστηκαν στο εκχύλισμα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Έτσι, η επεξεργασία που αναπτύχθηκε προτείνεται ως μια εξαιρετικά αποτελεσματική διαδικασία για την παραγωγή εκχυλισμάτων RGP εμπλουτισμένων σε πολυφαινολικές ενώσεις, με ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση. Τέτοια εκχυλίσματα θα μπορούσαν στη συνέχεια να αξιοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων, για να παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία και/ή χρωματισμό.

Λέξεις-κλειδιά: ανθοκυανίνες- χρωστικές- αντιοξειδωτικά- στέμφυλα κόκκινου σταφυλιού- επεξεργασία με οργανικούς διαλύτες- πολυφαινόλες

ABSTRACT

The purpose of this investigation was i) the development of a novel, green tertiary solvent system composed of water, ethanol, and glycerol, and ii) the implementation of an organosolv treatment of red grape pomace (RGP) for the efficient production of polyphenol-containing extracts with enhanced antioxidant properties. The treatment developed was performed under mild acidic conditions, imparted by the addition of citric acid, and it was first evaluated based on severity, establishing linear models that described the correlation between treatment performance and combined severity factors. To solicit treatment optimization, response surface methodology was implemented, considering solvent acidity and residence time as the treatment variables. The optimized treatment afforded maximum total polyphenol (165.52 ± 5.84 mg GAE g⁻¹ DM), total pigment (4.35 ± 0.18 mg MvE g⁻¹ DM) and total flavanol (31.50 mg CtE g⁻¹ DM) yields, and extracts with particularly enhanced antioxidant activity. This might be attributed to specific constituents with high antioxidant potency, such as catechin, determined in the extract using high-performance liquid chromatography. Thus, the treatment developed is proposed as a highly efficient process to generate RGP extracts enriched in polyphenolic compounds, with enhanced antioxidant activity. Such extracts might then be valorized as food additives, to provide antioxidant protection and/or pigmentation.

Keywords: anthocyanin pigments, antioxidants, red grape pomace, organosolv treatment, polyphenols

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
Λέξεις κλειδιά.....	iv
ABSTRACT	v
Key words.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vi
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	ix
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xi
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ-ΣΥΜΒΟΛΑ	xii

1.Εισαγωγή-Βιβλιογραφική ανασκόπηση	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	2
1.1 Υποπροϊόντα και απόβλητα τροφίμων φυτικής προέλευσης	2
1.2 Αξιοποίηση των υποπροϊόντων στην οινοποίηση.....	2
1.3 Δεδομένα παραγωγής υποπροϊόντων στην οινοποίηση ανά έτος.....	5
1.4 Ποσοστά απόρριψης των υποπροϊόντων οινοποίησης.....	6
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την απόρριψη.....	7
1.6 Βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης υποπροϊόντων στην οινοποίηση.....	8
1.7 Πράσινες πρακτικές διαχείρισης υποπροϊόντων στην οινοποίηση.....	10
1.8 Συστατικά σταφυλίων και εκχυλίσιμες ενώσεις.....	12
1.9 Πολυφαινόλες.....	14
1.10 Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	16
1.11 Τύποι επεξεργασίας και στατιστικές στην παραγωγή.....	17

1.12 Χαρακτηρισμός παραγόμενων υποπροϊόντων.....	19
1.13 Πρακτικές χρήσεις των παραγόμενων υποπροϊόντων	21
1.14 Υποπροϊόντα ερυθρής οينوποίησης ως πηγή αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών παραγόντων.....	21
1.15 Μέθοδοι επεξεργασίας υποπροϊόντων στεμφύλων.....	23
1.15.1 Ξήρανση.....	23
1.15.2 Εκχύλιση στεμφύλων.....	24
1.15.3 Παράγοντες επιρροής εκχύλισης	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	29
ΣΚΟΠΟΣ.....	29
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 Χημικά.....	30
3.2 Ερυθρά στέμφυλα (RGP).....	30
3.3 Διαδικασίες εκχύλισης.....	31
3.4 Προσδιορισμός της δριμύτητας της επεξεργασίας.....	32
3.5 Πειραματικός σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση της επεξεργασίας.....	33
3.6 Αναλύσεις για ολικές πολυφαινόλες, ολικές χρωστικές, ολικές φλαβανόλες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.....	34
3.7 Χρωματογραφικές αναλύσεις.....	35
3.8 Χειρισμός δεδομένων και στατιστικές.....	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	37
4.1 Πειραματισμός μιας μεταβλητής.....	37
4.2 Μοντελοποίηση με βάση τη δριμύτητα.....	40

4.3 Μοντελοποίηση με βάση την επιφάνεια απόκρισης.....	43
4.4 Αξιολόγηση της απόδοσης της επεξεργασίας.....	46
4.5 Επίδραση στην πολυφαινολική σύνθεση και τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά.....	50
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Σύνοψη Εκχυλίσμων Ενώσεων και Χρήσεις.....	14
Πίνακας 3.1: Τα επίπεδα συγκέντρωσης κιτρικού οξέος (C_{CA}) και χρόνος παραμονής (t) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό, στην πραγματική και κωδικοποιημένη μορφή τους.....	33
Πίνακας 4.1: Η επίδραση των διαφόρων συνδυασμών της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) και του χρόνου παραμονής (t) στη δριμύτητα της επεξεργασίας (CSF και CSF') και στη συνολική απόδοση πολυφαινολών (Y_{TP}).....	40
Πίνακας 4.2: Τιμές απόκρισης (Y_{TP}) που αντιστοιχούν στα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του πειραματικού σχεδιασμού.....	45
Πίνακας 4.3: Αναλυτική πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος που λαμβάνεται μετά την επεξεργασία με τον βελτιστοποιημένο διαλύτη καθώς και τα εκχυλίσματα που παρήχθησαν από τις μεταχειρίσεις ελέγχου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των τριπλών προσδιορισμών ($\pm$ τυπική απόκλιση).....	52

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Χημικές δομές πολυφαινολών.....	16
Σχήμα 1.1: Στάδια παραγωγής κρασιού.....	18
Σχήμα 4.1: Η επίδραση της αναλογίας της γλυκερόλης στο σύστημα διαλυτών που εξετάστηκε, στην απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες. Σε όλες τις περιπτώσεις, το σύστημα διαλύτη περιείχε ένα τυπικό ποσοστό νερού 10% και ποικίλα ποσοστά αιθανόλης. Οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, για 180 λεπτά. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).....	37
Σχήμα 4.2: Η επίδραση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) στο εξεταζόμενο σύστημα διαλύτη, στην απόδοση σε συνολικές πολυφαινόλες. Σε όλες τις περιπτώσεις, το σύστημα διαλύτη αποτελούνταν από 10% νερό, 60% γλυκερίνη και 30% αιθανόλη. Οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, για 180 λεπτά. Οι στήλες που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά γράμματα (a, b, c) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).....	38
Σχήμα 4.3: Η επίδραση του χρόνου παραμονής της επεξεργασίας στην απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες, σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C. Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με σύστημα διαλύτη που αποτελείται από 10% νερό, 60% γλυκερίνη και 30% αιθανόλη, που περιείχε 10% κιτρικό οξύ. Τα σημεία που αντιστοιχούν σε διαφορετικά γράμματα (α, β, γ) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).....	39
Σχήμα 4.4: Συσχέτιση μεταξύ του συνδυασμένου συντελεστή δριμύτητας (A) και του εναλλακτικού συντελεστή δριμύτητας (B), με την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες. Οι ράβδοι υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση.....	42
Σχήμα 4.5: Διάγραμμα που παρουσιάζει τη συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών της απόκρισης (Y_{TP}), που προέκυψε μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης. Δίνονται επίσης ο τετραγωνικός συντελεστής συσχέτισης (R^2) και η τιμή p-value για το μοντέλο (A). Στο διάγραμμα (B) παρουσιάζεται ο συντελεστής επιθυμητότητας, η μέγιστη προβλεπόμενη Y_{TP} , καθώς και τα θεωρητικά βέλτιστα C_{CA} και t . Οι ένθετοι πίνακες περιέχουν τα στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται με την μεθοδολογία	

επιφάνειας απόκρισης. Οι τιμές που επισημαίνονται με αστερίσκο είναι στατιστικά σημαντικές (κόκκινο: $p < 0,05$, πορτοκαλί: $p < 0,001$).	44
Σχήμα 4.6: Διάγραμμα περιγράμματος που απεικονίζει την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (Y_{tp}) συναρτήσει της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) και του χρόνου παραμονής (t).	46
Σχήμα 4.7: Απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (Α), ολικές χρωστικές (Β) και ολικές φλαβονόλες (Γ) που επιτυγχάνεται με την επεξεργασία RGP με τον διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ($C_{CA} = 14,1\%$, $t = 300$ min). Οι στήλες που αντιστοιχούν σε 60% EtOH και 75% GI αντιστοιχούν σε επεξεργασίες που πραγματοποιήθηκαν με υδατική αιθανόλη και υδατική γλυκερόλη. Η αντιστοίχιση με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) υποδηλώνουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).	48
Σχήμα 4.8: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα του εκχυλίσματος RGP που λαμβάνεται με επεξεργασία με το διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες. Τα χρωματογραφήματα Α, Β, C και D ανιχνεύθηκαν στα 280, 320, 360 και 520 nm, αντίστοιχα. Αντιστοίχιση κορυφών: 1, γαλλικό οξύ- 2, καφταρικό οξύ- 3, κυανιδίνη 3-Ο-γλυκοζίτης- 4, κατεχίνη- 5, δελφινιδίνη 3-Ο-γλυκοζίτης- 6, παράγωγο p-κουμαρικού- 7, παράγωγο φερουλάτης- 8, πετουνιδίνη 3-Ο-γλυκοζίτης- 9, παιονιδίνη 3-Ο-γλυκοζίτης, 10, p-κουμαρικό οξύ- 11, φερουλικό οξύ- 12, ρουτίνη- 13, μαλβιδίνη 3-Ο-γλυκοσίδιο- 14, κερκετίνη 3-Ο-γλυκουρονίδιο- 15, καεμφερόλη 3-Ο-ρουτινοσίδιο- 16, μαλβιδίνη 3-Ο-γλυκοσίδιο p-κουμαρικό- 17, μυρικετίνη- 18, ρεσβερατρόλη- 19, κερκετίνη- 20, καεμφερόλη- 21, ισοραμνετίνη.	51
Σχήμα 4.9: Η ικανότητα απόσβεσης (Α) και η αναγωγική ισχύς (Β) του εκχυλίσματος που παράγεται μετά από RGP επεξεργασία με τον διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ($C_{CA} = 14,1\%$, $t = 300$ λεπτά). Στήλες που αντιστοιχίζονται ως 60% EtOH και 75% GI αντιστοιχούν σε επεξεργασίες που πραγματοποιήθηκαν με υδατική αιθανόλη και υδατική γλυκερόλη. Εκχώρηση με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) υποδηλώνουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).	54

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Υποπροϊόντα ερυθρής οινοποίησης-στέμφυλα.....	3
Εικόνα 1.1: Ξηραντήρας.....	24
Εικόνα 3.1: Στέμφυλα μετά την ξήρανση και την κονιορτοποίηση.....	31
Εικόνα 3.2: Στέμφυλα μετά την ξήρανση και την κονιορτοποίηση.....	31
Εικόνα 2.3: Σύστημα συσκευής εκχυλίσεων.....	32
Εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6: Δείγματα από τις μετρήσεις πολυφαινόλων, αντιοξειδωτικών και χρωστικών στο εργαστήριο.....	35

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ- ΣΥΜΒΟΛΑ

- **RGP:** Ερυθρά στέμφυλα
- **MBR:** Βιολογικοί Αντιδραστήρες Μembrάνης
- **TPC:** Ολικές Πολυφαινόλες
- **HPLC:** Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
- **GAE:** Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος
- **AAE:** Ισοδύναμα Ασκορβικού Οξέος
- **DM:** Ξηρή Μάζα
- **SD:** Τυπική Απόκλιση
- **Y_{TP}:** Συνολική Απόδοση Πολυφαινολών
- **A_{AR}:** Ικανότητα Απόσβεσης Ελεύθερων Ριζών
- **P_R:** Αναγωγική Ισχύς
- **CSF:** Συντελεστής Δριμύτητας

Εισαγωγή -Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. Υποπροϊόντα και απόβλητα τροφίμων φυτικής προέλευσης

Η παραγωγή και επεξεργασία τροφίμων φυτικής προέλευσης δημιουργεί μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων και αποβλήτων. Αυτά περιλαμβάνουν φλοιούς, σπόρους, γίγαρτα, και μη βρώσιμα μέρη, τα οποία συχνά καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής ή καίγονται, επιβαρύνοντας το περιβάλλον. Σύμφωνα με τη μελέτη των [Mirabella et al. \(2014\)](#), περίπου το 30% της παγκόσμιας παραγωγής φρούτων και λαχανικών απορρίπτεται ως απόβλητο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Αυτά τα υπολείμματα μπορούν, ωστόσο, να αξιοποιηθούν σε διάφορους τομείς, όπως η παραγωγή βιοενέργειας, λιπασμάτων ή και βιοενεργών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία.

Ένας βασικός παράγοντας για την αξιοποίηση αυτών των υποπροϊόντων είναι η ανάπτυξη τεχνολογιών για την εξαγωγή χρήσιμων συστατικών. Για παράδειγμα, τα απόβλητα από την επεξεργασία εσπεριδοειδών περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και πηκτίνης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών ([Chauhan et al., 2017](#)). Η επιτυχής επαναχρησιμοποίηση τέτοιων υλικών συμβάλλει στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, ενώ παράλληλα δημιουργεί οικονομικά οφέλη.

Επιπλέον, η παραγωγή κομπόστ από φυτικά υπολείμματα μπορεί να βελτιώσει τη γονιμότητα του εδάφους. Έρευνες έχουν δείξει ότι η οργανική ύλη από απορρίμματα λαχανικών βελτιώνει τη δομή και την ικανότητα συγκράτησης νερού στο έδαφος ([Singh et al., 2020](#)). Παράλληλα, η χρήση αυτών των υλικών για την παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας χώνευσης προσφέρει μια σημαντική λύση για την ενεργειακή αξιοποίηση των αποβλήτων, υποκαθιστώντας συμβατικά καύσιμα και μειώνοντας τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα.

1.2. Αξιοποίηση των υποπροϊόντων στην οينوποίηση

Η οينوποίηση, ως μια από τις αρχαιότερες και πιο διαδεδομένες βιομηχανικές διαδικασίες, δημιουργεί μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, τα οποία έχουν ιστορικά αντιμετωπιστεί ως

απόβλητα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η βιώσιμη διαχείριση αυτών των υλικών έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία, καθώς προσφέρει περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη. Τα κύρια υποπροϊόντα της οινοποίησης περιλαμβάνουν τα στέμφυλα (Εικόνα 1.1), τις οινολάσπες, τα γίγαρτα και τους φλοιούς των σταφυλιών. Αυτά τα υλικά είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και τανίνες, καθώς και σε έλαια και οργανικά θρεπτικά συστατικά, που επιτρέπουν την αξιοποίησή τους σε πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών.



Εικόνα 1.1 Υποπροϊόντα ερυθρής οινοποίησης-στέμφυλα

Αξιοποίηση των στεμφύλων

Τα στέμφυλα, τα οποία αποτελούν περίπου το 10-20% του συνολικού βάρους του σταφυλιού, περιέχουν φλοιοί, γίγαρτα και μικρές ποσότητες μίσχων (Lafka et al., 2007). Είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, που αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά και παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να εξαχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά συντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων ή ως δραστικά συστατικά σε καλλυντικά προϊόντα. Παράλληλα, τα γίγαρτα περιέχουν υψηλής ποιότητας

έλαιο, πλούσιο σε ωμέγα-6 λιπαρά οξέα, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή καλλυντικών, προϊόντων περιποίησης δέρματος και θρεπτικών συμπληρωμάτων (Tsakona et al., 2018).

Επιπλέον, τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη ζωική διατροφή ως πλούσια πηγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητα σε τανίνες μπορεί να περιορίσει την ποσότητα που χρησιμοποιείται στα ζωοτροφικά μίγματα. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, εφαρμόζονται τεχνικές ζύμωσης που μειώνουν την περιεκτικότητα σε τανίνες και βελτιώνουν τη διατροφική αξία του τελικού προϊόντος (Gómez-Muñoz et al., 2017).

Αξιοποίηση των οινολασπών

Οι οινολάσπες αποτελούν στερεά κατάλοιπα που προκύπτουν από την καθίζηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της αποθήκευσης του κρασιού. Είναι πλούσιες σε οργανικό υλικό, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και φωσφόρο, καθιστώντας τις κατάλληλες για χρήση ως φυσικά λιπάσματα. Με την εφαρμογή της κομποστοποίησης, οι οινολάσπες μπορούν να βελτιώσουν τη γονιμότητα του εδάφους και να μειώσουν την ανάγκη για χημικά λιπάσματα (Gómez-Muñoz et al., 2017).

Παράλληλα, η αξιοποίησή τους στη βιοενεργειακή παραγωγή είναι εξαιρετικά σημαντική. Μέσω αναερόβιας χώνευσης, οι οινολάσπες μπορούν να μετατραπούν σε βιοαέριο, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή θερμικής ή ηλεκτρικής ενέργειας. Αυτός ο τρόπος αξιοποίησης μειώνει τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, συμβάλλοντας σε μια πιο βιώσιμη βιομηχανία.

Τεχνολογίες εξαγωγής και βιομηχανικές εφαρμογές

Οι σύγχρονες τεχνολογίες εξαγωγής, όπως η υπερηχητική εκχύλιση και η εκχύλιση με χρήση διοξειδίου του άνθρακα σε υπερκρίσιμη κατάσταση, έχουν βελτιώσει σημαντικά την αποδοτικότητα ανάκτησης πολύτιμων συστατικών από τα υποπροϊόντα της οينوποίησης. Αυτές οι μέθοδοι εξασφαλίζουν υψηλή καθαρότητα και σταθερότητα των εκχυλισμάτων, διευκολύνοντας την ενσωμάτωσή τους σε διάφορες εφαρμογές (Maicas, 2020).

Τα εκχυλίσματα πολυφαινολών, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικά συντηρητικά που παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων.

Παράλληλα, οι ανθοκυανίνες, που εξάγονται από τις φλοιοί των σταφυλιών, χρησιμοποιούνται ως φυσικές χρωστικές σε τρόφιμα και ποτά, αντικαθιστώντας τις συνθετικές χημικές ενώσεις.

Περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη

Η αξιοποίηση των υποπροϊόντων της οινοποίησης αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για τη βιομηχανία, αλλά και μια μεγάλη ευκαιρία για την ανάπτυξη της κυκλικής οικονομίας. Η χρήση αυτών των υλικών μειώνει την ποσότητα αποβλήτων που καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, ενώ παράλληλα δημιουργεί νέες πηγές εσόδων για τις οινοποιητικές επιχειρήσεις.

1.3. Δεδομένα παραγωγής υποπροϊόντων στην οινοποίηση ανά έτος

Η παραγωγή υποπροϊόντων στην οινοποίηση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ετήσια παραγωγή κρασιού παγκοσμίως, η οποία ανέρχεται περίπου στους 24,75 τόνους ανά έτος, σύμφωνα με δεδομένα του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου ([OIV, 2023](#)). Από την ποσότητα των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρασιού, περίπου το 20-30% μετατρέπεται σε υποπροϊόντα, περιλαμβάνοντας στέμφυλα, γίγαρτα, φλοιοί και οινολάσπες. Το ποσοστό των υποπροϊόντων της οινοποίησης που απορρίπτεται εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή, τις διαθέσιμες τεχνολογίες και τις πρακτικές της κάθε οινοποιίας. Εντούτοις, εκτιμάται ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών δεν αξιοποιείται πλήρως, ιδιαίτερα σε περιοχές με χαμηλή ανάπτυξη στον τομέα της κυκλικής οικονομίας. ([Maicas, 2020](#)).

Στέμφυλα

Τα στέμφυλα αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία υποπροϊόντων, καθώς προκύπτουν από τη σύνθλιψη και τη ζύμωση των σταφυλιών. Σύμφωνα με στοιχεία, για κάθε τόνο σταφυλιών που επεξεργάζεται η βιομηχανία κρασιού, παράγονται περίπου 150-200 κιλά στέμφυλα. Με την παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών να ξεπερνά τους 70 εκατομμύρια τόνους ανά έτος, εκτιμάται ότι παράγονται περίπου 10-15 εκατομμύρια τόνοι στεμφύλων ετησίως ([Romboli et al., 2021](#)).

Γίγαρτα και έλαια

Τα γίγαρτα αποτελούν περίπου το 3-5% του συνολικού βάρους του σταφυλίου. Από αυτά, παράγονται περίπου 2-3 εκατομμύρια τόνοι κουκουτσιών κάθε χρόνο, τα οποία είναι πλούσια σε έλαια. Η περιεκτικότητα σε έλαιο των κουκουτσιών κυμαίνεται από 8-16%, ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλίου. Επομένως, η δυνητική παραγωγή ελαίου από γίγαρτα υπολογίζεται σε περίπου 300-400 χιλιάδες τόνους ανά έτος ([Tsakona et al., 2018](#)).

Οινολάσπες

Οι οινολάσπες προκύπτουν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης και της διαύγασης του κρασιού. Για κάθε τόνο σταφυλίων που μεταποιείται, παράγονται κατά μέσο όρο 30-50 κιλά οινολάσπες. Με βάση την παγκόσμια παραγωγή, οι οινολάσπες υπολογίζεται ότι ανέρχονται σε περίπου 2-3 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Οι οινολάσπες είναι πλούσιες σε οργανικά θρεπτικά συστατικά, καθιστώντας τις ιδανικές για την παραγωγή λιπασμάτων ή βιοαερίου ([Gómez-Muñoz et al., 2017](#)).

Περιφερειακά δεδομένα

Η παραγωγή υποπροϊόντων διαφοροποιείται ανά γεωγραφική περιοχή λόγω των διαφορών στις ποικιλίες σταφυλίων, στις μεθόδους οινοποίησης και στην ετήσια παραγωγή κρασιού. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όπου παράγεται περίπου το 60% του παγκόσμιου κρασιού, τα υποπροϊόντα ανέρχονται σε 8-10 εκατομμύρια τόνους ετησίως, με την Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία να αποτελούν τους μεγαλύτερους παραγωγούς ([OIV, 2023](#)).

1.4. Ποσοστά απόρριψης των υποπροϊόντων οινοποίησης

Στέμφυλα

Στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 20-40% των στεμφύλων πετιούνται ή χρησιμοποιούνται για χαμηλής αξίας εφαρμογές, όπως η απλή διάθεση σε χώρους υγειονομικής ταφής ή ως ζωοτροφή ([Romboli et al., 2021](#)).

Σε περιοχές με περιορισμένες τεχνολογίες επεξεργασίας, το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει έως και το 50%, ιδιαίτερα σε μικρές και μεσαίες οινοποιίες που δεν διαθέτουν υποδομές για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών.

Γίγαρτα

Τα γίγαρτα, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε χρήσιμες ενώσεις εκτός από το έλαιο, συχνά απορρίπτονται ή καίγονται. Εκτιμάται ότι περίπου 30-50% των γιγάρτων δεν αξιοποιούνται, ειδικά σε χώρες όπου δεν υπάρχει βιομηχανία εκχύλισης ελαίων (Tsakona et al., 2018).

Οινολάσπες

Παρά τη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά, περίπου το 50-60% των οινολασπών απορρίπτεται ή οδηγείται σε χώρους υγειονομικής ταφής. Αυτό οφείλεται κυρίως στο υψηλό κόστος διαχείρισης και στη μικρή ανάπτυξη εφαρμογών όπως η παραγωγή λιπασμάτων ή βιοαερίου (Gómez-Muñoz et al., 2017).

Άλλα υποπροϊόντα (φλοιοί, βόστρυχοι)

Οι φλοιοί και οι βόστρυχοι των σταφυλιών, που είναι πλούσιοι σε ίνες και φαινολικές ενώσεις, συνήθως απορρίπτονται σε ποσοστά 40-60%, ειδικά στις περιοχές όπου δεν υπάρχει πρόσβαση σε εξειδικευμένες τεχνολογίες επεξεργασίας.

1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόρριψη

Μικρά Οινοποιεία: Οι μικρότεροι παραγωγοί, που αποτελούν μεγάλο ποσοστό της βιομηχανίας, συχνά δεν διαθέτουν τους οικονομικούς πόρους ή την τεχνογνωσία για την αξιοποίηση των υποπροϊόντων τους.

Νομοθεσία: Σε ορισμένες χώρες, οι κανονισμοί για τη διαχείριση αποβλήτων είναι χαλαροί, με αποτέλεσμα τα υποπροϊόντα να καταλήγουν σε χωματερές ή να απορρίπτονται ανεξέλεγκτα.

Τεχνολογία: Η απουσία προηγμένων τεχνολογιών επεξεργασίας περιορίζει την ανάκτηση χρήσιμων συστατικών, ιδιαίτερα σε αναπτυσσόμενες περιοχές.

Παράγοντες που θα μπορούσαν να μειώσουν την απόρριψη θα ήταν αρχικά οι επενδύσεις σε τεχνολογία. Η εισαγωγή τεχνολογιών όπως η υπερηχητική εκχύλιση και η αναερόβια χώνευση μπορεί να μειώσει σημαντικά την απόρριψη, επιτρέποντας την αξιοποίηση μέχρι και του 90% των υποπροϊόντων. Επίσης μια άλλη πρακτική θα ήταν η εφαρμογή κυκλικής οικονομίας. Τα υποπροϊόντα μπορούν να μετατραπούν σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως φυσικά αντιοξειδωτικά, βιοκαύσιμα και οργανικά λιπάσματα, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για απόρριψη. Συνολικά, εκτιμάται ότι παγκοσμίως απορρίπτεται 30-50% των υποπροϊόντων της οινοποίησης, ανάλογα με την περιοχή και το επίπεδο της τεχνολογικής ανάπτυξης (Maicas, 2020).

1.6. Βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης υποπροϊόντων στην οινοποίηση

Η υιοθέτηση βιώσιμων πρακτικών διαχείρισης υποπροϊόντων στην οινοποίηση αποτελεί κεντρικό στόχο για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και την προώθηση της κυκλικής οικονομίας. Οι βιώσιμες μέθοδοι επικεντρώνονται στη μείωση των αποβλήτων, την ανάκτηση χρήσιμων συστατικών και την ενσωμάτωση αυτών των υλικών σε νέες βιομηχανικές εφαρμογές. Ακολουθούν ορισμένες από τις βασικές βιώσιμες πρακτικές:

Κομποστοποίηση και χρήση ως φυσικό λίπασμα

Η κομποστοποίηση των στεμφύλων, των φλουδών και των οινολασπών είναι μια από τις πιο διαδεδομένες βιώσιμες πρακτικές. Συγκεκριμένα αυτή η διαδικασία μετατρέπει τα οργανικά απόβλητα σε φυσικό λίπασμα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Με αυτό τον τρόπο βελτιώνει τη γονιμότητα του εδάφους και μειώνει την ανάγκη για χημικά λιπάσματα. Εφαρμόζεται ήδη ευρέως σε αμπελουργικές περιοχές, καθώς μειώνει την ποσότητα των απορριπτόμενων υλικών και βελτιώνει τη βιωσιμότητα των καλλιεργειών (Gómez-Muñoz et al., 2017).

Παραγωγή βιοενέργειας μέσω αναερόβιας χώνευσης

Η αναερόβια χώνευση των οινολασπών και των στεμφύλων παράγει βιοαέριο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή θερμότητας για τις ανάγκες

της οиноποιίας. Μπορεί να μειώσει της εξάρτησης από ορυκτά καύσιμα. Επιπλέον, το υπολειμματικό υλικό από τη χώνευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα (Bertran et al., 2004).

Ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων

Τα υποπροϊόντα της οиноποίησης είναι πλούσια σε πολύτιμες ενώσεις, όπως πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες, τανίνες και φυτικά έλαια. Οι βιώσιμες μέθοδοι εξαγωγής περιλαμβάνουν την υπερηχητική εκχύλιση, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάκτηση πολυφαινολών και φυσικών αντιοξειδωτικών με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. Την εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος για την παραγωγή ελαίων από γίγαρτα σταφυλιών (Tsakona et al., 2018). Οι εξαγόμενες ενώσεις βρίσκουν εφαρμογές:

- Στη βιομηχανία τροφίμων (ως φυσικά συντηρητικά).
- Στα καλλυντικά (για αντιγηραντικά και ενυδατικά προϊόντα).
- Στη φαρμακοβιομηχανία (για την ανάπτυξη συμπληρωμάτων διατροφής).

Χρήση στη ζωική διατροφή

Τα στέμφυλα, αφού επεξεργαστούν (π.χ. μέσω ζύμωσης για μείωση των τανινών), μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικό σε ζωοτροφές γιατί είναι πλούσια σε φυτικές ίνες και ενέργεια, μειώνουν το κόστος των ζωοτροφών και ενισχύουν τη βιωσιμότητα της κτηνοτροφίας.

Παραγωγή βιοδιασπώμενων υλικών

Τα στέμφυλα και οι φλοιοί των σταφυλιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη βιοδιασπώμενων συσκευασιών. Τα φυσικά πολυμερή που περιέχουν (όπως η λιγνίνη και η κυτταρίνη) είναι κατάλληλα για την κατασκευή φιλικών προς το περιβάλλον υλικών συσκευασίας. Επιπλέον ενισχύουν τη βιωσιμότητα της βιομηχανίας τροφίμων.

Χρήση για παραγωγή βιοκαυσίμων

Τα γίγαρτα σταφυλιών και άλλα στερεά υποπροϊόντα της οиноποίησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω ζύμωσης, που αποτελεί ανανεώσιμη

πηγή ενέργειας. Παραγωγή βιοντίζελ από το έλαιο των κουκουτσιών, μειώνοντας την εξάρτηση από συμβατικά καύσιμα (Maicas, 2020).

Βιολογικός καθαρισμός και διαχείριση αποβλήτων

Για τη διαχείριση των υγρών αποβλήτων (όπως τα υπολείμματα ζύμωσης και οι οινολάσπες), εφαρμόζονται Βιολογικοί αντιδραστήρες μεμβράνης (MBR) οι οποίοι καθαρίζουν τα υγρά απόβλητα και επιτρέπουν την επαναχρησιμοποίηση του νερού. Επιπλέον χρησιμοποιούνται φυτεμένα φίλτρα (constructed wetlands), φυσικά συστήματα που καθαρίζουν τα λύματα με χρήση φυτών και μικροοργανισμών.

Οι παραπάνω εφαρμογές των βιώσιμων πρακτικών παρουσιάζουν σαφώς πλεονεκτήματα όπως η μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος. Λιγότερα απόβλητα καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής, και οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου μειώνονται. Επιπλέον πλεονέκτημα η αύξηση της προστιθέμενης αξίας. Τα υποπροϊόντα μετατρέπονται σε προϊόντα υψηλής αξίας, ενισχύοντας την οικονομική βιωσιμότητα της οινοποιίας. Τέλος με τις βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης γίνεται προώθηση της κυκλικής οικονομίας. Η επαναχρησιμοποίηση των υλικών μειώνει την εξάρτηση από πρώτες ύλες.

1.7. Πράσινες Πρακτικές Διαχείρισης Υποπροϊόντων στην Οινοποίηση

Οι πράσινες πρακτικές διαχείρισης υποπροϊόντων στην οινοποίηση προάγουν τη βιωσιμότητα μέσω της μείωσης του περιβαλλοντικού αποτυπώματος, της ανάκτησης πολύτιμων υλικών και της ενίσχυσης της κυκλικής οικονομίας. Αυτές οι πρακτικές δίνουν έμφαση στη χρήση φυσικών διεργασιών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών, περιορίζοντας την ανάγκη για συμβατικές, ενεργότερες μεθόδους.

Ορισμένες από αυτές είναι η ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση υποπροϊόντων, η οποία περιλαμβάνει την ανακύκλωση υγρών αποβλήτων και την κομποστοποίηση στερεών υπολειμμάτων. Τα λύματα από την οινοποίηση (όπως τα υγρά απόβλητα της ζύμωσης) μπορούν να υποστούν επεξεργασία με φυσικές μεθόδους, όπως φυτεμένα φίλτρα (constructed wetlands). Αυτά τα συστήματα χρησιμοποιούν φυτά και μικροοργανισμούς για τον

καθαρισμό του νερού, το οποίο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για άρδευση αμπελώνων. Τα στερεά υπολείμματα όπως τα στέμφυλα και οι οινολάσπες μετατρέπονται σε φυσικό λίπασμα, το οποίο μπορεί να επιστρέψει στους αμπελώνες, μειώνοντας την ανάγκη για συνθετικά λιπάσματα.

Μια άλλη πράσινη πρακτική διαχείρισης είναι η χρήση υποπροϊόντων για ενίσχυση του εδάφους. Από την καύση στερεών υποπροϊόντων (όπως τα γίγαρτα και τα στέμφυλα) σε ελεγχόμενες συνθήκες παράγεται βιοάνθρακας, ο οποίος, αυξάνει τη γονιμότητα του εδάφους, συγκρατεί νερό και θρεπτικά συστατικά, μειώνει τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα, καθώς "δεσμεύει" άνθρακα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Romboli et al., 2021).

Η ανάκτηση ενέργειας μέσω βιολογικών διεργασιών είναι μια ακόμα πρακτική. Οι οινολάσπες και τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαερίου μέσω αναερόβιας χώνευσης. Το βιοαέριο χρησιμοποιείται για παραγωγή θερμότητας ή ηλεκτρικής ενέργειας, για ενεργειακή αυτονομία των οινοποιείων. Τέλος το υπόλειμμα της χώνευσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό λίπασμα.

Επόμενη πρακτική η εξαγωγή βιοδραστικών συστατικών με πράσινες τεχνολογίες. Οι πράσινες τεχνολογίες αποφεύγουν τη χρήση τοξικών χημικών και εστιάζουν σε φυσικές διεργασίες. Υπερηχητική εκχύλιση: Χρησιμοποιείται για την ανάκτηση πολυφαινόλων, αντιοξειδωτικών και φυσικών χρωστικών από τα στέμφυλα, μειώνοντας την κατανάλωση ενέργειας. Εκχύλιση με νερό ή υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂): Μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος για την εξαγωγή ελαίων από γίγαρτα σταφυλιών. Ζύμωση υποπροϊόντων: Βιοτεχνολογικές μέθοδοι επιτρέπουν τη μετατροπή των στεμφύλων σε προϊόντα υψηλής αξίας, όπως ένζυμα, αιθανόλη ή άλλα βιολογικά υλικά (Maicas, 2020).

Δύο ακόμα εφαρμογές είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων και η χρήση στη βιώσιμη συσκευασία. Τα υποπροϊόντα της οινοποίησης, όπως οι φλοιοί και οι βόστρυχοι, χρησιμοποιούνται για την κατασκευή βιοδιασπώμενων υλικών συσκευασίας. Αυτή η πρακτική μειώνει τη χρήση πλαστικών υλικών και δημιουργεί κυκλικά προϊόντα που επιστρέφουν στη φύση. Σχετικά με την παραγωγή βιοκαυσίμων πρόκειται για την βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ. Τα σάκχαρα που περιέχονται στα στέμφυλα και τις οινολάσπες μπορούν να μετατραπούν σε βιοαιθανόλη μέσω ζύμωσης. Από την επεξεργασία του ελαίου που εξάγεται από τα γίγαρτα σταφυλιών μπορεί να παραχθεί βιοντίζελ, μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας που μειώνει τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα

Οφέλη Πράσινων Πρακτικών

Οι πράσινες πρακτικές διαχείρισης των υποπροϊόντων παρουσιάζουν περιβαλλοντικά οφέλη όπως μείωση των απορριμμάτων που καταλήγουν σε χωματερές, περιορισμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και βελτίωση της υγείας του εδάφους και της βιοποικιλότητας.

Επιπλέον τα οφέλη είναι και κοινωνικά καθώς προωθείται η πράσινη επιχειρηματικότητα και δημιουργούνται νέες θέσεις εργασίας στις πράσινες τεχνολογίες. Τέλος παρουσιάζονται και οικονομικά οφέλη όπως είναι η μείωση του κόστους διαχείρισης αποβλήτων, η δημιουργία νέων προϊόντων υψηλής αξίας (π.χ. αντιοξειδωτικά, βιοκαύσιμα, λίπασμα) και η εξοικονόμηση ενέργειας και πόρων.

Παραδείγματα εφαρμογών

Στην Ιταλία πολλά οινοποιεία ανακυκλώνουν τα υποπροϊόντα τους για την παραγωγή φυσικών καλλυντικών και λιπασμάτων. Στην Γαλλία εφαρμόζεται εκτεταμένη χρήση βιοενέργειας από οινολάσπες για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Στην Ελλάδα οινοποιεία αξιοποιούν στέμφυλα για την παραγωγή παραδοσιακών προϊόντων, όπως τσίπουρο, και ξεκινούν καινοτόμες πρακτικές, όπως η χρήση υπολειμμάτων για κομποστοποίηση.

1.8. Συστατικά Σταφυλιών και Εκχυλίσιμες Ενώσεις

Τα σταφύλια είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά με υψηλή θρεπτική, φαρμακευτική και βιομηχανική αξία. Κάθε μέρος του σταφυλιού (φλοιός, σάρκα, γίγαρτα, βόστρυχοι) περιέχει διαφορετικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να εκχυλιστούν για χρήση σε τρόφιμα, καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες εφαρμογές. Παρακάτω παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά των σταφυλιών και τι μπορεί να εκχυλιστεί από αυτά.

Φλοιός Σταφυλιού

Η φλοιός είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, χρωστικές και αρωματικές ενώσεις. Τα κύρια συστατικά που περιέχονται είναι πολυφαινόλες όπως ανθοκυανίνες στις ερυθρές ποικιλίες, φλαβονοειδή και κατεχίνες και τανίνες, οι οποίες δίνουν στυφή χαρακτηριστικά και έχουν

αντιοξειδωτική δράση. Σε μικρότερη ποσότητα συναντώνται αρωματικές ενώσεις όπως τερπένια και φαινολικές αλδεΐδες καθώς και κυτταρίνη και ημικυτταρίνη.

Όλα τα παραπάνω συστατικά μπορούν να εκχυλιστούν με διάφορες μεθόδους εκχύλισης. Η πιο διαδεδομένη είναι η εκχύλιση με νερό ή αιθανόλη. Εναλλακτικές μέθοδοι είναι η υπερηχητική εκχύλιση η οποία έχει χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, και η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Τα εκχυλίσματα μπορούν να προστεθούν σε λειτουργικά τρόφιμα ως φυσικές χρωστικές και αντιοξειδωτικά, είτε να χρησιμοποιηθούν για την βελτίωση των οργανολυπτικών χαρακτηριστικών διάφορων τροφίμων. Επιπλέον είναι συχνή η χρήση στον τομέα των καλλυντικών και των φαρμάκων.

Σάρκα Σταφυλιού

Η σάρκα αποτελεί την κύρια πηγή σακχάρων και υγρών του σταφυλιού. Τα κύρια συστατικά της είναι τα σάκχαρα(γλυκόζη, φρουκτόζη), τα οξέα(τρυγικό και μηλικό οξύ), οι αρωματικές ενώσεις(εστέρες και αλκοόλες) και μέταλλα(κάλιο, μαγνήσιο).

Από εκχυλίσματα στερεού-υγρού με χρήση νερού ή αιθανόλης ως διαλύτη, είτε με απόσταξη, εκχυλίζονται σάκχαρα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών ή βιοαιθανόλης. Άλλα προϊόντα που λαμβάνονται είναι οργανικά οξέα για χρήση ως ρυθμιστικά οξέα στη βιομηχανία τροφίμων, οργανικά οξέα και αρωματικές ενώσεις για την ενίσχυση της γεύσης και της θρεπτικής αξίας τροφίμων.

Γίγαρτα Σταφυλιού

Τα γίγαρτα είναι εξαιρετική πηγή λιπιδίων, πολυφαινόλων και φυτοχημικών. Συστατικά όπως έλαια, πολυφαινόλες, τοκοφερόλες και πρωτεΐνες μπορούν να εκχυλιστούν για την χρήση στην βιομηχανία τροφίμων. Το λινολεϊκό οξύ, το ελαϊκό οξύ, η βιταμίνη E, οι προκυανιδίνες και τα φλαβονοειδή ανακτώνται με ειδικές μεθόδους, συνήθως με την χρήση υπερήχων, για να έχουν υψηλή ποιότητα και να χρησιμοποιούνται για συμπληρώματα διατροφής και τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας.

Βόστρυχοι Σταφυλιού

Οι βόστρυχοι συχνά απορρίπτονται αλλά περιέχουν σημαντικές ενώσεις. Φαινολικά οξέα και τανίνες όπως οι προανθοκυανιδίνες, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ χρησιμοποιούνται

ευρέως στην βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων. Φυτικές ίνες όπως η λιγνίνη και η κυτταρίνη βοηθούν στην παραγωγή βιοδιασπώμενων υλικών και λειτουργικών τροφίμων. Αυτά εκχυλίζονται κυρίως με υδατική εκχύλιση ή εκχύλιση με υγρή αιθανόλη.

Οινολάσπες

Οι οινολάσπες, που είναι τα υπολείμματα της ζύμωσης, είναι πλούσιες σε οργανικά υλικά και υποπροϊόντα. Με εκχύλιση μπορούν να ληφθούν πολλές πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες που αξιοποιούνται ως σταθεροποιητές τροφίμων. Λόγω της σύστασής τους τα συστατικά αυτά μπορούν να διαχωριστούν και με φυσική φυγοκέντρωση.

<u>Μέρος του Σταφυλίου</u>	<u>Κύρια Συστατικά</u>	<u>Χρήσεις</u>
<u>Φλοιός</u>	Πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες	Τρόφιμα, καλλυντικά, φαρμακευτικά
<u>Σάρκα</u>	Σάκχαρα, οργανικά οξέα	Παραγωγή κρασιού, χυμών, βιοαιθανόλης
<u>Γίγαρτα</u>	Έλαια, τοκοφερόλες	Καλλυντικά, τρόφιμα, φαρμακευτικά
<u>Βόστρυχοι</u>	Τανίνες, φυτικές ίνες	Αντιοξειδωτικά, λειτουργικά υλικά
<u>Οινολάσπες</u>	Πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες	Συμπληρώματα, σταθεροποιητικά, προϊόντα υγείας

Πίνακας 1.1: Σύνοψη Εκχυλίσιμων Ενώσεων και Χρήσεις

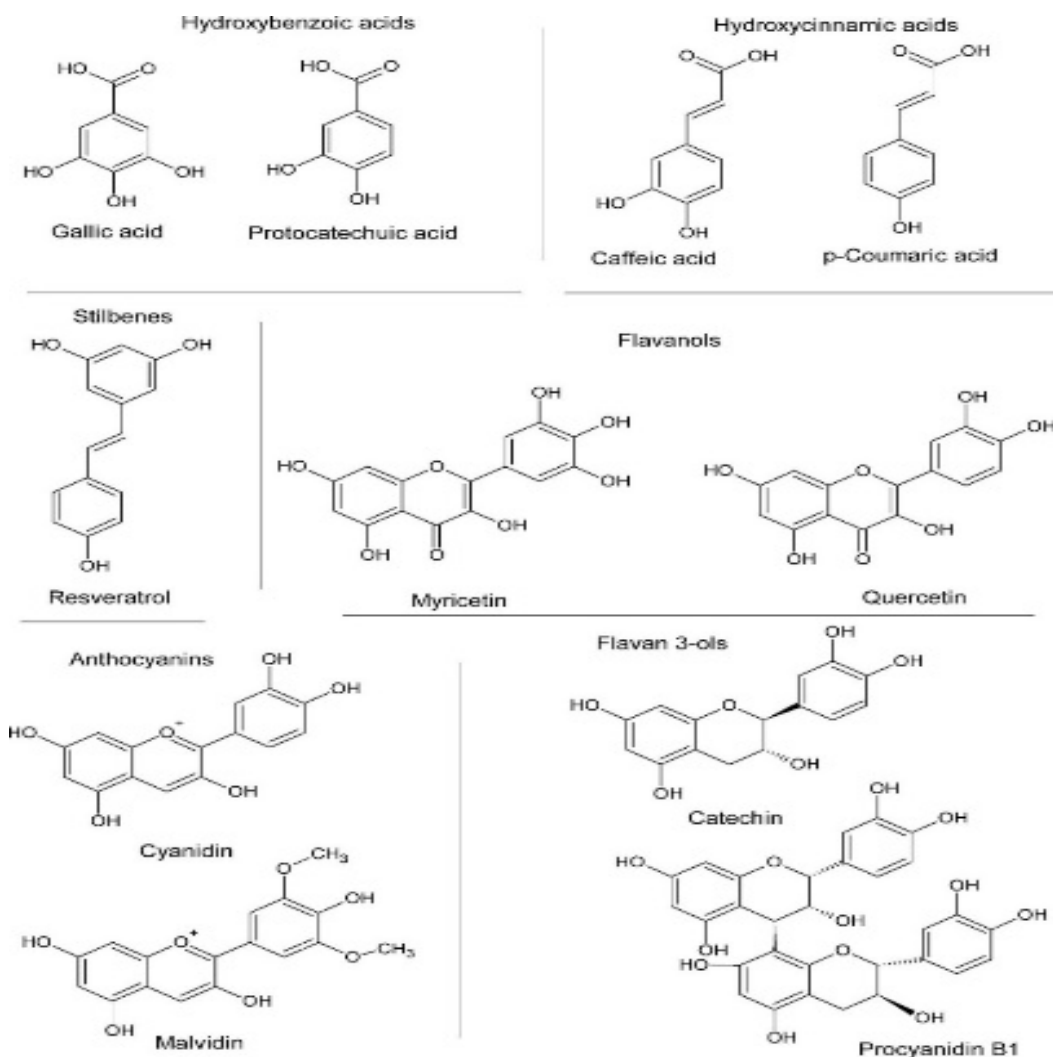
1.9 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη κατηγορία φυσικών οργανικών ενώσεων που βρίσκονται σε φυτικά τρόφιμα και ποτά. Περιέχουν πολλές υδροξυλομάδες (-OH) συνδεδεμένες σε αρωματικούς δακτυλίους και έχουν ιδιαίτερη σημασία λόγω της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και αντικαρκινικής δράσης τους. Ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες υποκατηγορίες:

1. Φλαβονοειδή (π.χ., κατεχίνες, κουερσετίνη).
2. Φαινολικά οξέα (π.χ., καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ).
3. Στιλβένια (π.χ., ρεσβερατρόλη).
4. Λιγνάνες (φυτοοιστρογόνα).

Κύριες πηγές των πολυφαινολών είναι φυτικά τρόφιμα όπως φρούτα και λαχανικά. Τα σταφύλια περιέχουν ανθοκυανίνες, κατεχίνες και προκυανιδίνες, ενώ άλλα μούρα όπως τα κεράσια είναι πλούσια με φλαβονοειδή. Λαχανικά όπως το μπρόκολο, τα κρεμμύδια και το σπανάκι περιέχουν φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Ξηροί καρποί και μπαχαρικά αλλά και ποτά όπως το κρασί, το τσάι και ο καφές περιέχουν επίσης ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή και καφεϊκό οξύ αντίστοιχα.

Οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της υγείας και στη μείωση του κινδύνου για χρόνιες ασθένειες. Η αντιοξειδωτική τους δράση εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, δηλαδή ρυθμίζουν τις κυτταροκίνες και τις ενζυμικές οδούς βοηθώντας στην μείωση των φλεγμονών. Επίσης μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη βακτηρίων και να βοηθήσουν στην διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας του εντέρου. Τέλος προλαμβάνουν από ασθένειες όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις.



Σχήμα 1.1: Χημικές δομές πολυφαινολών

1.10 Αντιοξειδωτικές ουσίες

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προστατεύοντας τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες που έρευνες δείχνουν ότι σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Επιπλέον ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Φυσικά αντιοξειδωτικά συναντώνται σε φυτικά τρόφιμα ενώ πολλά συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων. Scalbert et al. (2005)

Τα πιο ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι πολυφαινόλες και η βιταμίνη C. Συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι το ασκορβικό οξύ, το BHA (βουτυλική υδροξυανισόλη) και το BHT (βουτυλική υδροξυτολουόλη) και χρησιμοποιούνται κυρίως για την συντήρηση τροφίμων μέσω της αποτροπής της οξείδωσης των λιπιδίων που περιέχουν.

Σημασία των Αντιοξειδωτικών για την Υγεία

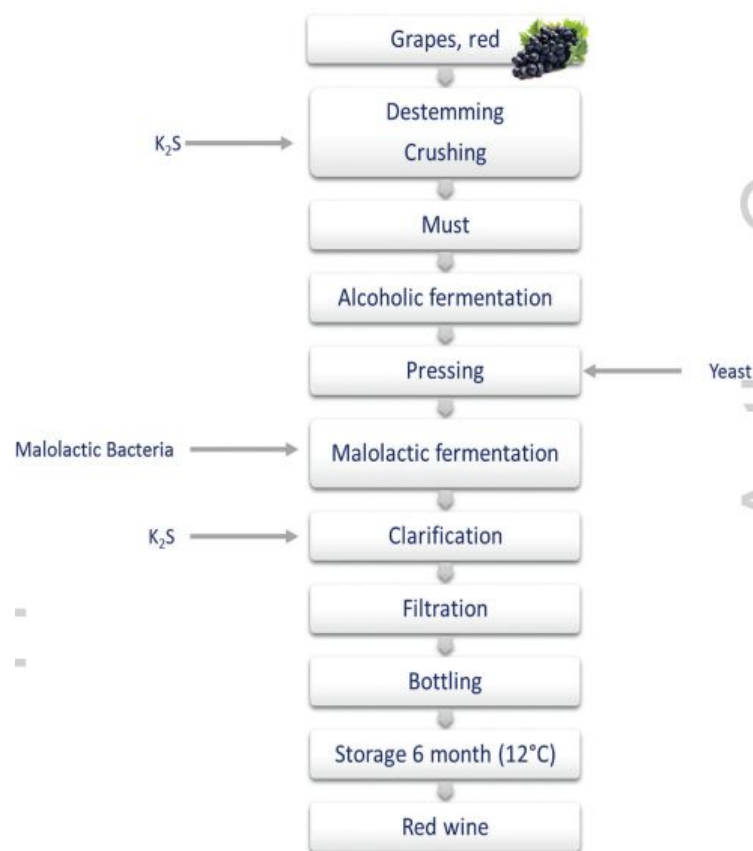
Τα αντιοξειδωτικά ενδέχεται να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, να προστατεύσουν από την ανάπτυξη καρκίνου και να καθυστερήσουν τη διαδικασία γήρανσης. Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις αναστέλλουν τη φλεγμονή και ενισχύουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι πολυφαινόλες, για παράδειγμα, έχουν αποδειχτεί ότι προστατεύουν από καρδιαγγειακά νοσήματα μέσω της μείωσης της φλεγμονής και της οξειδωτικής βλάβης στους αγγειακούς τοίχους (Pignatelli et al., 2006). Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μειώνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων αναστέλλοντας την κυτταρική αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες

1.11 Τύποι επεξεργασίας και στατιστικές στην παραγωγή

Το σταφύλι (*Vitis vinifera* L.) είναι ένα πραγματικό μούρο, που κατατάσσεται σε μια ομάδα πολλών σαρκώδους καρπού με σπόρους. Τα μούρα είναι οργανωμένα σε ένα σύμπλεγμα και κάθε μούρο συνδέεται με τη ράγα με ένα μικρό μίσχο που περιέχει τα αγγεία που τροφοδοτούν το μούρο με νερό και θρεπτικά συστατικά (Ribéreau-Gayonetal, 2006). Τα σταφύλια ανήκουν στις μεγαλύτερες οπωροφόρες καλλιέργειες στον κόσμο με παγκόσμια παραγωγή περίπου $77,18 \times 10^6$ τόνους το 2013 (FAOSTAT, 2015). Η Κίνα, οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Ιταλία, η Ισπανία και η Γαλλία είναι οι κύριοι παραγωγοί σε όλο τον κόσμο, παρέχοντας περίπου το 48% της παγκόσμιας παραγωγής (FAOSTAT, 2015).

Το σταφύλι είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα φρούτα στον κόσμο τόσο ως νωπό φρούτο (επιτραπέζιο σταφύλι) όσο και μεταποιημένα σε κρασί και χυμό σταφυλιού. Ο χυμός σταφυλιών και η οينوποίηση έχουν διαφορετικές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων η διαδικασία ζύμωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή αλκοόλης, ως η κύρια. Για την

παραγωγή ερυθρού οίνου, τα σταφύλια μετά τη συγκομιδή τους ξεφλουδίζονται και συνθλίβονται για την εξαγωγή χυμού σταφυλιών, ακολουθούμενη από εκχύλιση παρουσία φλοιών και σπόρων σταφυλιών (Bautista-Ortínetal., 2005). Ο κύριος σκοπός της εκχύλισης είναι η εκχύλιση των χρωστικών ενώσεων (ανθοκυανίνες και φαινολικές ουσίες) από τα στερεά συστατικά του σταφυλιού (Bautista-Ortínetal., 2005). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πρωτογενής ζύμωση (αλκοολική ζύμωση) από κύτταρα ζύμης (1-2 εβδομάδες παρουσία φλοιών σταφυλιών), και η ικανότητά τους να απορροφούν φαινολικές ενώσεις μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη ή χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στον οίνο και στο υποπροϊόν του. Η δευτερογενής ζύμωση (μηλογαλακτική ζύμωση) πραγματοποιείται από βακτήρια γαλακτικού οξέος, απουσία φλοιών σταφυλιών, οι οποίες απομακρύνονται με την έκθλιψη του γλεύκους. Έτσι, οι φλοιοί και τα γίγαρτα των σταφυλιών απορρίπτονται ως υποπροϊόν, το οποίο ονομάζεται «στέμφυλα σταφυλιών». Τέλος, μετά από κατάλληλη παλαίωση, τα ερυθρά κρασιά διαυγάζονται, αναμειγνύονται και διηθούνται για την εμφιάλωση.



Σχήμα 1.2: Στάδια παραγωγής κρασιού. (Bautista-Ortínetal., 2005)

Από την άλλη πλευρά, αν και οι ερυθροί οίνοι λαμβάνονται με την αλκοολική ζύμωση γλεύκους παρουσία στερεών τμημάτων του μούρου (φλοιοί και σπόροι), οι λευκοί οίνοι παράγονται αποκλειστικά με τη ζύμωση του χυμού σταφυλιών (Ribéreau-Gayonetal., 2006). Τα κύρια στάδια επεξεργασίας των λευκών οίνων είναι η έκθλιψη, το γλέυκος, η αλκοολική ζύμωση, η έκθλιψη, η διαύγαση, η διήθηση, η εμφιάλωση και η αποθήκευση. Αρχικά, τα σταφύλια συνθλίβονται και αφαιρούνται τα κοτσάνια, αφήνοντας υγρό γλέυκος που ρέει. Στο λευκό κρασί, όλες οι φλοιοί των σταφυλιών διαχωρίζονται από το «γλέυκος» με φίλτρα ή φυγόκεντρα πριν το γλέυκος υποστεί ζύμωση.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, χρησιμοποιούνται άγριες ζύμες για να μετατρέψουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αλκοόλη. Μετά τη σύνθλιψη και τη ζύμωση, το κρασί πρέπει να αποθηκευτεί, να φιλτραριστεί και να ωριμάσει κατάλληλα. Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι για την παρασκευή χυμού σταφυλιών διαφέρουν πολύ ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες ποικιλίες και τις τοπικές παραδόσεις. Σε γενικές γραμμές, τα κύρια στάδια στην παρασκευή χυμού είναι το ξεφλούδισμα, η σύνθλιψη, η εκχύλιση, η συμπίεση, η παστερίωση, η πήξη και η διήθηση (Batesetal., 2001). Αρχικά, τα τσαμπιά των σταφυλιών διαχωρίζονται από το στέλεχος. Αυτό το βήμα αποδίδει μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως τα κοτσάνια και τα στελέχη. Στη συνέχεια, οι θρυμματισμένοι καρποί θερμαίνονται στους 60-63°C, τη στιγμή αυτή προστίθενται πηκτινολυτικά ένζυμα για τη διάσπαση της πηκτίνης, ώστε ο πολτός των σταφυλιών να είναι έτοιμος για συμπίεση. Αυτό το μέρος της διαδικασίας βοηθά στην εξαγωγή του χρώματος από τους φλοιούς στο χυμό. Αργότερα, ο χυμός παστεριώνεται με ένα φλας που θερμαίνεται στους 80-85°C και στη συνέχεια ψύχεται γρήγορα. Η επεξεργασία συνεχίζεται όταν οι αργολίνες έχουν κατακαθίσει και στη συνέχεια το ίζημα μπορεί να φιλτραριστεί. Στο τέλος, ο χυμός θερμαίνεται στους 95°C και είναι έτοιμος για εμφιάλωση ή κονσερβοποίηση. (Bates et al., 2001).

1.12 Χαρακτηρισμός παραγόμενων υποπροϊόντων

Η διαδικασία οινοποίησης είναι γνωστό ότι παράγει μεγάλες ποσότητες στερεών υπολειμμάτων (Brahimetal., 2014). Αυτά τα υποπροϊόντα είναι συγκεκριμένα τα στέμφυλα σταφυλιών και οι βόστρυχοι ή τα στελέχη σταφυλιών. Τα στέμφυλα είναι το πιο άφθονο υπόλειμμα της οινοποίησης, το οποίο παράγεται μετά την ταυτόχρονη ζύμωση και εκχύλιση

των σταφυλιών κατά την παραγωγή ερυθρού οίνου (Barciaetal., 2014). Τα στέμφυλα αποτελούνται κυρίως από φλοιοί και σπόρους και αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του βάρους του επεξεργασμένου σταφυλιού (LloberaandCañellas, 2007) και από το ξυλώδες τμήμα των σταφυλοδεμάτων που απορρίπτονται στην αρχή της ερυθρής οινοποίησης (González-Centenoetal., 2013). Τα στελέχη των σταφυλιών αποτελούν το 1,4-7% του συνολικού βάρους της σταφυλής (Souquetetal., 2000). Αυτές οι μεγάλες ποσότητες παραγόμενων υποπροϊόντων μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις εάν δεν αντιμετωπιστούν σωστά (Nellemann, 2009). Για το λόγο αυτό, η ολοκληρωμένη αξιοποίηση των αγροβιομηχανικών αποβλήτων αποτελεί μια βιώσιμη λύση για την ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων των αγροβιομηχανικών δραστηριοτήτων.

Ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) αποτελεί το σημείο εκκίνησης για τον χαρακτηρισμό των υποπροϊόντων σταφυλιών, διότι παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη σχετική σύνθεση του δείγματος. Υπάρχουν διάφορες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι που βασίζονται σε διαφορετικές αρχές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών σε φυτικά δείγματα, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό διαφόρων δομικών ομάδων (Fontanaetal., 2013). Σε γενικές γραμμές, τα στέμφυλα έχουν 4-5% φαινολικές ενώσεις, ενώ στα στελέχη η περιεκτικότητα σε φαινόλες είναι η διπλάσια (Brahimetal., 2014).

Επιπλέον, υπάρχει επίσης διαφορά στο προφίλ των φαινολικών ενώσεων μεταξύ των πυρηνοκάρπων και των στελεχών της αμπέλου. Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο πυρηνόκαρπο σταφυλιών περιλαμβάνουν κατεχίνες, δηλαδή μονομερείς και ολιγομερείς φλαβαν-3-όλες (προανθοκυανιδίνες) και γλυκοζυλιωμένες φλαβονόλες (LloberaandCañellas, 2007). Οι (Antoniolli et al, 2015) ανέφεραν ότι το εκχύλισμα πυρήνα σταφυλιών Malbec περιέχει κυρίως φλαβανόλες όπως κατεχίνη και επικατεχίνη και ακολουθούν τα φαινολικά οξέα: συριγγικό, γαλλικό, p-κουμαρικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ, φλαβονολικές ουσίες-κερκετίνη, κερκετίνη-3-γλυκοζίτη και ανθοκυανίνες -δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, πεονιδίνη, μαλβιδίνη και τα αντίστοιχα γλυκοζίτες τους (Antoniolli et al., 2015).

1.13 Πρακτικές χρήσεις των παραγόμενων υποπροϊόντων

Η βιομηχανία επεξεργασίας σταφυλιών παράγει μεγάλες ποσότητες αποβλήτων- ωστόσο, μόνο ένα κλάσμα αυτών των αποβλήτων αξιοποιείται για άλλους σκοπούς και η πλειονότητα απορρίπτεται (Muñoz-Gonzalez et al., 2014). Αυτό προκαλεί μεγάλα οικονομικά προβλήματα στη βιομηχανία και επίσης, εάν δεν γίνεται σωστή διαχείρισή τους μπορεί τελικά να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα περιβαλλοντικής ρύπανσης. Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική ανάγκη να αναζητηθούν εναλλακτικές χρήσεις για τα απόβλητα που προέρχονται από την επεξεργασία σταφυλιών. Τα απόβλητα σταφυλιών, που αποτελούνται από φλοιοί, σπόρους, στελέχη και αχρησιμοποίητο πολτό, είναι σημαντική πηγή φαινολικών ενώσεων που παρουσιάζουν διάφορες βιοδραστικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές. Αυτό τα καθιστά μια εξαιρετική επιλογή για τη χρήση τους στην παραγωγή πρόσθετων τροφίμων, φαρμάκων, απολυμαντικών, μεταξύ άλλων. Σε αυτό έρχεται να προστεθεί η αντίληψη των καταναλωτών για τους κινδύνους για την υγεία λόγω της χρήσης συνθετικών ενώσεων σε αυτού του είδους τα προϊόντα (Ayala-Zavala et al., 2011).

Έτσι, η οικονομία της μεταποίησης των καλλιεργειών θα μπορούσε να βελτιωθεί με την ανάπτυξη χρήσεων υψηλότερης αξίας για τα υποπροϊόντα τους (Ayala-Zavala et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια, οι επιστημονικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με τον χαρακτηρισμό των χημικών συστατικών των υποπροϊόντων αποβλήτων σταφυλιών επέτρεψαν την αναζήτηση διαφόρων εφαρμογών στην προσπάθεια να ληφθούν συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων (Muñoz-Gonzalez et al., 2014). Σε αυτό το πλαίσιο, η ολοκληρωμένη εκμετάλλευση των σταφυλιών αποτελεί μια επιτυχημένη ευκαιρία για τη λήψη θρεπτικών συστατικών και φαινολικών ενώσεων και ταυτόχρονα για οικονομικά οφέλη και ευεργετικές επιπτώσεις στο περιβάλλον.

1.14 Υποπροϊόντα ερυθρής οινοποίησης ως πηγή αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών παραγόντων

Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα στη βιομηχανία τροφίμων είναι η πρόληψη της μόλυνσης λόγω της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων κατά την παραγωγή τροφίμων, λόγω των άμεσων συνεπειών της στη δημόσια υγεία. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 2000

έως το 2008, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί προκάλεσαν 9,4 εκατομμύρια επεισόδια τροφιμογενών ασθενειών, 55.961 νοσηλείες και 1351 θανάτους. Επιπλέον, η παρουσία αλλοιωγόνων βακτηρίων μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των νωπών τροφίμων και των τροφίμων (Ayala-Zavalaetal., 2011). Η μικροβιακή αλλοίωση προκαλείται από τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων και μεταβολιτών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οπτικών και υφολογικών ελαττωμάτων, καθώς και τη δημιουργία οσμών, περιορίζοντας σημαντικά την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, σε συνδυασμό με τον κίνδυνο ανάπτυξης παθογόνων μικροβίων (Scallanetal., 2011) .

Τα χημικά συνθετικά πρόσθετα μπορούν να μειώσουν τη φθορά των τροφίμων, αλλά η κατανάλωση περισσότερων τροφίμων που έχουν διαμορφωθεί με χημικά συντηρητικά έχει αυξήσει την ανησυχία των καταναλωτών και έχει δημιουργήσει μια ζήτηση για πιο φυσικά και ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα. Ως αποτέλεσμα, υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που παράγονται με φυσικό τρόπο. Στο πλαίσιο αυτό, τα υποπροϊόντα σταφυλίων θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντική πηγή φυσικών εκχυλίσμάτων με αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων (Oliveiraetal., 2013).

Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα υποπροϊόντων σταφυλίου είναι αποτελεσματικά για τη μείωση του παθογόνου φορτίου στα νωπά λαχανικά, μια ομάδα προϊόντων που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανησυχία από άποψη μικροβιολογικής ασφάλειας (FAO/WHO, 2008), επειδή συχνά καλλιεργούνται σε ανοιχτό χωράφι και είναι ευάλωτα στη μόλυνση από το έδαφος, τα λύματα, το νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση και την επαφή με (περιττώματα) άγρια ζώα (FAO/ WHO, 2008) (Katalinić etal., 2010). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα εκχυλίσματα πυρήνων σταφυλίων που ενσωματώνονται σε μπιφτέκια βοδινού κρέατος σε ποσοστό 10% μειώνουν τον συνολικό αριθμό των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (Enterobacteriaceae, κολοβακτηρίδια και *S. aureus*) και των μικροοργανισμών αλλοίωσης τροφίμων (ζύμες και μούχλες, Micrococcaceae, αερόβια μεσόφιλα, ψυχρότροφα, λιπολυτικά και πρωτεολυτικά βακτήρια) μετά από 48 ώρες αποθήκευσης στους 4°C (Sagdicetal., 2011), ενώ τα εκχυλίσματα σπόρων σταφυλίου που ενσωματώθηκαν σε ποσοστό 1% σε μεμβράνες αμύλου μπιζελιού μείωσαν την ανάπτυξη του *Brochothrixthermosphacta* (μείωση κατά 1,3 logCFU/mL) σε χοιρινά φιλέτα (Sagdicetal., 2011).

Η αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσε να αποδοθεί στη μετανάστευση των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού στο εσωτερικό του κρέατος (Sagdicetal., 2011). Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι τα εκχυλίσματα υποπροϊόντων σταφυλιών θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για την πρόληψη της αλλοίωσης των προϊόντων κρέατος, καθώς και για την αναστολή ορισμένων τροφιμογενών παθογόνων. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των εκχυλισμάτων υποπροϊόντων σταφυλιών αποδίδονται στην περιεκτικότητα σε φαινόλες. Ο αντιμικροβιακός τρόπος δράσης των φαινολικών ενώσεων προτείνεται ότι δρα σε πολλαπλούς κυτταρικούς στόχους. Το γαλλικό και το φερουλικό οξύ, για παράδειγμα, οδήγησαν σε μη αναστρέψιμες αλλαγές στη διαπερατότητα των μεμβρανών σε *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *L. monocytogenes*, μέσω αλλαγών στην υδροφοβικότητα, μείωσης του αρνητικού επιφανειακού φορτίου και εμφάνισης τοπικής ρήξης ή σχηματισμού πόρων στις κυτταρικές μεμβράνες με επακόλουθη διαρροή βασικών ενδοκυτταρικών συστατικών (Borgesetal., 2013). Επίσης, το γαλλικό οξύ διαπέρασε αποτελεσματικά τη βακτηριακή μεμβράνη της *Salmonella* spp., μέσω της χηλίωσης δισθενών κατιόντων από την εξωτερική μεμβράνη (Borgesetal., 2013).

1.15 Μέθοδοι επεξεργασίας υποπροϊόντων στέμφυλων

1.15.1. Ξήρανση

Η ξήρανση είναι μια πολύπλευρη διαδικασία που συνεπάγεται τη σταδιακή μεταφορά μάζας και θερμότητας, με άλλες φυσικές ή χημικές μεταβολές που μπορεί να μεταβάλλουν την ποιότητα του προϊόντος. Η ξήρανση πραγματοποιείται επηρεάζοντας τον ρυθμό εξάτμισης του υγρού μέσω της εφαρμογής θερμότητας στο στερεό υλικό. Η θερμότητα μπορεί να παρέχεται μέσω συναγωγής, αγωγής, ακτινοβολίας ή με την τοποθέτηση της υγρής ουσίας εντός ενός συστήματος μικροκυμάτων ή ραδιοσυχνοτήτων σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Περισσότερο από το 85% των βιομηχανικών στεγνωτηρίων χρησιμοποιούν συναγωγή, χρησιμοποιώντας θερμαινόμενο αέρα ως μέσο ξήρανσης. Επιπλέον, περίπου το 99% των εφαρμογών απαιτούν την εξαγωγή νερού. Όλες οι μέθοδοι ξήρανσης, εκτός από την ξήρανση με μικροκύματα και ραδιοσυχνότητες, αποδίδουν θερμότητα στην περιφέρεια του υλικού, με αποτέλεσμα τη διάχυση της θερμότητας κυρίως μέσω αγωγής εντός του υλικού. Η περιεχόμενη υγρασία πρέπει να διαπεράσει την επιφάνεια του στερεού υλικού και στη συνέχεια να μεταφερθεί στον ξηρό αέρα (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.3 Ξηραντήρας

1.15.2. Εκχύλιση στεμφύλων

Η επιθυμία για φυσικά αντιοξειδωτικά έχει τονώσει την έρευνα για την εξαγωγή αυτών των ενώσεων από φυτά και γεωργικά υποπροϊόντα. Η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα είναι μια οικονομική και αποτελεσματική τεχνική. Η απόδοση αντιοξειδωτικών χημικών ουσιών από φυτικά υλικά επηρεάζεται κυρίως από τις συνθήκες εκχύλισης, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης (Botelho et al., 2018).

Εκχύλιση στερεών ουσιών με διαλύτη

Η εκχύλιση στερεών ουσιών με τη χρήση υγρού διαλύτη είναι μια δυναμική τεχνική μεταφοράς μάζας που συνεπάγεται την εκχύλιση του συστατικού-στόχου από τη στερεή φάση χρησιμοποιώντας έναν οργανικό διαλύτη που μπορεί να διαλύσει την επιθυμητή διαλυμένη ουσία. Για τη μεταφορά μάζας των διαλυμένων ουσιών από τη στερεή φάση στον διαλύτη είναι απαραίτητη μια ακολουθία διαδικασιών.

- Διείσδυση του διαλύτη στη στερεά φάση
- Διαλυτοποίηση των συστατικών
- Μετατόπιση της διαλυμένης ουσίας προς το εξωτερικό της στερεάς φάσης
- Μεταφορά της διαλυμένης ουσίας από τη διεπιφάνεια του στερεού στη φάση του διαλύτη (Botelho et al., 2018).

Η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες αποτελεί το αρχικό στάδιο για την εφαρμογή τους στη διαμόρφωση συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων, καθώς και για την ενσωμάτωσή τους ως πρόσθετα τροφίμων. Οι φαινολικές χημικές ουσίες μπορούν να απομονωθούν είτε από νωπά είτε από αποξηραμένα φυτικά δείγματα. Συνήθως, πριν από την εκχύλιση, τα δείγματα στεγνώνουν στον αέρα ή καταψύχονται, ανάλογα με την ευαισθησία των βιοδραστικών συστατικών, και στη συνέχεια αλέθονται και ομογενοποιούνται. Ωστόσο, καθώς οι μέθοδοι ξήρανσης, όπως η ξήρανση με κατάψυξη, μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τα συστατικά των φυτικών δειγμάτων, συνιστάται προσοχή στο σχεδιασμό και την ανάλυση της έρευνας σχετικά με τις φαρμακευτικές δυνατότητες των φυτών.

Η εκχύλιση με διαλύτη είναι η κυρίαρχη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη λήψη εκχυλισμάτων από φυτικές πρώτες ύλες, λόγω της απλότητας, της αποτελεσματικότητας και της ευρείας εφαρμογής της. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με διαλύτη επηρεάζεται από τον τύπο του διαλύτη, ο οποίος καθορίζεται από την πολικότητα, τη διάρκεια της εκχύλισης, τη θερμοκρασία, την αναλογία δείγματος προς διαλύτη και τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των υλικών. Η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων καθορίζεται από τη χημική σύνθεση του φυτικού δείγματος και την πολικότητα των χρησιμοποιούμενων διαλυτών. Τα φυτικά υλικά μπορεί να περιέχουν φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων απλών μορφών όπως τα φαινολικά οξέα και οι ανθοκυανίνες, καθώς και υψηλά πολυμερισμένες ουσίες όπως οι τανίνες, σε διαφορετικές ποσότητες. Επιπλέον, οι φαινολικές χημικές ουσίες μπορεί να συνδέονται με άλλα φυτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχει καθολική μέθοδος εκχύλισης που να είναι κατάλληλη για την εκχύλιση όλων των φυτικών φαινολικών χημικών ουσιών. Η επιλογή του συστήματος διαλύτη κατά την εκχύλιση θα καθορίσει το μείγμα των διαλυτών φαινολικών χημικών ουσιών που ανακτώνται από τα φυτικά υλικά. Το μείγμα αυτό μπορεί επίσης να περιλαμβάνει συγκεκριμένες μη φαινολικές ενώσεις, όπως υδατάνθρακες, οργανικά

οξέα και λιπίδια. Κατά συνέπεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά μέτρα για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων στοιχείων (Botelho et al., 2018).

Βασικές αρχές και διεργασίες της εκχύλισης Soxhlet

Οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης με διαλύτη για την παραλαβή φαρμακευτικών ουσιών από φυτικές πρώτες ύλες βασίζονται στην επιλογή διαλύτη σε συνδυασμό με την εφαρμογή θερμότητας ή ανάδευσης. Η εκχύλιση Soxhlet, μια καθιερωμένη από καιρό τεχνική, χρησιμεύει ως το πρότυπο αναφοράς για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας άλλων διαδικασιών εκχύλισης στερεού-υγρού. Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια ευρέως αναγνωρισμένη και καθιερωμένη μέθοδος που ξεπερνά άλλες παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, εκτός από την εκχύλιση θερμοευαίσθητων χημικών ουσιών. Σε μια τυπική συσκευή Soxhlet, το βοτανικό υλικό περιέχεται μέσα σε μια «δαχτυλήθρα» που είναι κορεσμένη με συμπυκνωμένο νέο διαλύτη από μια φιάλη απόσταξης. Όταν φθάσει στο επίπεδο υπερχειλίσης, ένα σιφόνι εξάγει το διάλυμα από τη δαχτυλήθρα και επιστρέφει τον διαλύτη στη φιάλη απόσταξης, μεταφέροντας τις διαλυμένες ουσίες που εξάγονται στην υγρή μάζα. Η διαδικασία απόσταξης διαχωρίζει τις διαλυμένες ουσίες από τον διαλύτη στη φιάλη διαλύτη. Οι διαλυμένες ουσίες παραμένουν στη φιάλη, ενώ ο φρέσκος διαλύτης, κατά τη θέρμανση, εξατμίζεται και ταξιδεύει προς τον συμπυκνωτή, συμπυκνώνοντας στη συνέχεια στη δαχτυλήθρα για επανασυμπίεση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση (Diaz et al., 2018).

Επιλογή των διαλυτών

Διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας και οι συνδυασμοί τους έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών χημικών ουσιών από φυτικά υλικά, συχνά σε διαφορετικές ποσότητες νερού. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη επηρεάζει τόσο την ποσότητα όσο και τον ρυθμό εκχύλισης πολυφαινολών. Η μεθανόλη είναι ιδιαίτερα επιτυχής στην εκχύλιση πολυφαινολών χαμηλού μοριακού βάρους, αλλά οι φλαβονόλες μεγαλύτερου μοριακού βάρους εκχυλίζονται βέλτιστα με τη χρήση υδατικού διαλύματος ακετόνης. Η αιθανόλη χρησιμεύει ως αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση πολυφαινολών και θεωρείται ασφαλής για την ανθρώπινη κατάποση. Η χρήση μεθανόλης ή αιθανόλης ως διαλύτη θεωρείται κατάλληλη για την εκχύλιση ενώσεων πλούσιων σε ανθοκυανίνες. Αυτοί οι διαλύτες διαταράσσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ ταυτόχρονα διαλύουν και σταθεροποιούν τις ανθοκυανίνες (Diaz et al., 2018).

1.15.3. Παράγοντες επιρροής εκχύλισης

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη γενική πτυχή της εκχύλισης. Πρέπει να διατηρείται σταθερή ροή, θερμοκρασία, πίεση και κατάλληλος χρόνος επαφής μεταξύ του διαλύτη και των στερεών. Επιπλέον, η αποτελεσματική διαχείριση του εξοπλισμού και των οργάνων είναι ζωτικής σημασίας για τη βέλτιστη απόδοση. Πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος των σωματιδίων και ο διαλύτης. Επιπλέον, για την επιλογή της βέλτιστης τεχνολογίας εκχύλισης που εξασφαλίζει υψηλή απόδοση και αρκετή σταθερότητα της διαλυμένης ουσίας, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά της ουσίας που πρόκειται να εκχυλιστεί και της πρώτης ύλης που υποβάλλεται σε επεξεργασία. Έτσι, θα έχουμε επιλέξει τη βέλτιστη προσέγγιση που αποδίδει τα πιο ευνοϊκά αποτελέσματα. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διαλυτότητα των ενώσεων στον διαλύτη (Khiari & Jeguirim, 2018).

Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι φυσικές παράμετροι του ιξώδους και της μειωμένης τάσης. Το μέγεθος των σωματιδίων πρέπει να λαμβάνει υπόψη την κυτταρική δομή, καθώς η επιτυχής εκχύλιση βασίζεται στη μορφολογία του αρχικού υλικού. Επιπλέον, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων συσχετίζεται με αυξημένο ρυθμό μεταφοράς διαλυμένων ουσιών. Κατά συνέπεια, η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης βελτιώνεται με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Η υγρασία παραμένει ένα στοιχείο που επηρεάζει και συγκεκριμένα επηρεάζει τη μεταφορά μάζας. Η υγρασία μπορεί να επηρεάσει θετικά τη διαδικασία και να διευκολύνει τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις. Επιπλέον, η θερμοκρασία είναι υψίστης σημασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύει τη διάχυση και τη διαλυτότητα της ουσίας που προορίζεται για εκχύλιση. Τέλος, η ανάδευση του διαλύτη είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς ενισχύει τον ρυθμό διάχυσης και μεταφοράς της ουσίας (Khiari & Jeguirim, 2018).

Εκχύλιση με υπερήχους

Οι υπέρηχοι είναι επιμήκη ελαστικά κύματα με συχνότητες που υπερβαίνουν τα 20 kHz, που είναι το ανώτερο όριο της ανθρώπινης ακουστικής αντίληψης. Το φάσμα των υπερήχων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο ζώνες. Υπέρηχοι υψηλής έντασης και υπέρηχοι χαμηλής έντασης. Οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται σε χαμηλές εντάσεις στη διαγνωστική ιατρική, στην αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων, στη χημική ανάλυση και σε μεθοδολογίες μη καταστροφικού ελέγχου. Αντίθετα, οι υπέρηχοι υψηλής έντασης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για εκτεταμένες διεργασίες, όπως η εκχύλιση, η ομογενοποίηση, η γαλακτωματοποίηση, η αφυδάτωση, η κρυστάλλωση, η εξάτμιση, η απενεργοποίηση

ενζύμων, η μεταβολή του ιξώδους, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και η παστερίωση σε χαμηλή θερμοκρασία (Khiari & Jeguirim, 2018).

Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα με εύρος συχνοτήτων από 300 MHz έως 300 GHz. Τα μικροκύματα κατηγοριοποιούνται σε τρεις ζώνες: τα δεκαδικά μικροκύματα (0,3-3 GHz), τα εκατοστιαία μικροκύματα (3-30 GHz), τα χιλιοστομετρικά μικροκύματα (30-300 GHz).

Τα μικροκύματα μπορούν να προκαλέσουν θερμότητα μέσω δύο μηχανισμών. Η αρχική μέθοδος περιλαμβάνει την αμοιβαία αντιστροφή των διπόλων, ενώ η επόμενη μέθοδος αφορά την ηλεκτροφόρηση των ιόντων. Η εξαγωγή μικροκυμάτων προκαλεί μεταβολές στις κυτταρικές δομές των υλικών λόγω των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Οι μεταβολές που συντελούνται αυξάνουν το πορώδες του υλικού, διευκολύνοντας τη διείσδυση του διαλύτη. Η εκχύλιση με μικροκύματα περιλαμβάνει τρία στάδια, κατά τα οποία ο διαλύτης διεισδύει στα σωματίδια και διαλύει το συστατικό-στόχο. Το συστατικό μεταφέρεται στη συνέχεια στην εξωτερική επιφάνεια του στερεού σωματιδίου. Κατά συνέπεια, η ουσία από την εξωτερική επιφάνεια του σωματιδίου μεταφέρεται στον όγκο του διαλύματος (Posadino et al., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ

Η αξιοποίηση των αγροτικών προϊόντων αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στο σύγχρονο αγροτικό και βιομηχανικό τομέα. Η χρήση χημικών πρόσθετων και οι συνεπάγουσες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων οδήγησε στην αναζήτηση φυσικών πρόσθετων με την αξιοποίηση υποπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η αξιοποίηση των στέμφυλων, υποπροϊόντα της οينوβιομηχανίας με σκοπό την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών όπως πολυφαινόλες, αντιοξειδωτικές ουσίες, χρωστικές.

Σκοπός της έρευνας ήταν η βελτιστοποίηση και μεγιστοποίηση της απόδοσης των εκχυλίσμων. Η διαδικασία ανάκτησης των πολυφαινολικών ενώσεων, των αντιοξειδωτικών ουσιών και των χρωστικών πραγματοποιήθηκε σε αποξηραμένο δείγμα στεμφύλων, της ερυθρής ποικιλίας Syrah. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα τριπλού διαλύτη νερού/αιθανόλης/γλυκερόλης με την προσθήκη κιτρικού οξέος. Τα εκχυλίσματα με την υψηλότερη συγκέντρωση ενώσεων δοκιμάστηκαν και μελετήθηκαν.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χημικά

Ένυδρη κατεχίνη (> 98%), trans-ρεσβερατρόλη (> 99%), κερκετίνη 3-O-γλυκουρονίδιο ($\geq$ 95%), χλωριούχο κυανίνη ($\geq$ 90%), φερουλικό οξύ (99%), καεμφερόλη, p-κουμαρικό οξύ, καμφερόλη 3-O-ρουτινοσίδη (98%), μυρικετίνη, η ισοραμνετίνη και η ένυδρη ρουτίνη (κερκετίνη 3-O-ρουτινοσίδη) (> 94%) ελήφθησαν από την Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία). Άνυδρο ανθρακικό νάτριο (99%), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και άνυδρη γλυκερόλη (99%) αγοράστηκαν από την Penta (Praha, Τσεχία). Μυρμηκικό οξύ (99%), L-ασκορβικό οξύ και κιτρικό οξύ ($\geq$ 99,5%) προήλθαν από την Carlo Erba (Μιλάνο, Ιταλία). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφία ήταν κατάλληλου (HPLC) βαθμού. Ο ανιχνευτής ριζών 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH), η ένυδρη κερκετίνη (97%) και το καφεϊκό οξύ (99%) προέρχονταν από την Alfa Aesar (Karlsruhe, Γερμανία). Το εξαϋδρικό χλωριούχο σίδηρο ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) αγοράστηκε από την Merck (Darmstadt, Γερμανία). Η 2,4,6-τρις(2-πυριδυλ)-s-τριαζίνη (TPTZ) προήλθε από την Fluka (Steinheim, Γερμανία).

3.2 Ερυθρά στέμφυλα (RGP)

Τα στέμφυλα προέρχονταν από την οινοποίηση σταφυλιών Syrah (*Vitis vinifera* spp.) και συλλέχθηκαν μετά από μια τυπική διαδικασία ερυθρού οίνου που περιλάμβανε 7 ημέρες εκχύλισης. Μετά τη συλλογή, τα στέμφυλα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε αεροστεγή πλαστικά δοχεία εντός 48 ωρών και αποξηράθηκαν με κατάψυξη για 24 ώρες. Το αποξηραμένο υλικό τεμαχίστηκε σε οικιακό επιτραπέζιο μύλο και συλλέχθηκε σκόνη με μέση διάμετρο σωματιδίων < 300 μm . Η σκόνη αυτή αποθηκεύτηκε σε πλαστικά δοχεία στους - 40 °C και χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (Εικόνες 3.1 και 3.2).



Εικόνα 3.1 και 3.2: Στέμφυλα μετά την ξήρανση και την κονιορτοποίηση

3.3 Διαδικασίες εκχύλισης

Αρχικά, οι εκχυλίσεις διαλογής πραγματοποιήθηκαν με μείγματα νερού/αιθανόλης/γλυκερόλης, όπου το ποσοστό του νερού διατηρήθηκε σταθερό στο 10%, ενώ η αιθανόλη και η γλυκερίνη χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες αναλογίες. Μετά από τον καθορισμό της βέλτιστης αναλογίας αιθανόλης και γλυκερόλης, προστέθηκε κιτρικό οξύ στον διαλύτη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, 20 ml διαλύτη μεταφέρθηκαν σε φιάλη Duran™ των 25 ml με βιδωτό πώμα και θερμάνθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, σε λουτρό ελαίου τοποθετημένο σε αναδευτήρα θερμής πλάκας (Witeg, Wertheim, Γερμανία) (Εικόνα 3.3). Όταν το υγρό απέκτησε τη ρυθμισμένη θερμοκρασία, η ακριβής μάζα 1,00 g αποξηραμένων, τεμαχισμένων RGP εισήχθη στη φιάλη, και οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση στις 500 rpm, για χρόνο παραμονής 180 λεπτών. Στη συνέχεια, τα επεξεργασμένα δείγματα ψύχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000×g, ώστε να ληφθεί ένα διαυγές υπερκείμενο. Στις περιπτώσεις της δοκιμής αυστηρότητας και της βελτιστοποίησης της επεξεργασίας επιφάνειας απόκρισης, ο χρόνος παραμονής και ο συγκέντρωση του κιτρικού οξέος μεταβάλλονταν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό.



Εικόνα 4.3 Σύστημα συσκευής εκχυλίσεων

3.4 Προσδιορισμός δριμύτητας της επεξεργασίας

Για να ελεγχθεί η σοβαρότητα της επεξεργασίας στην απόδοση της ανάκτησης πολυφαινολών, επιτεύχθηκαν διαφορετικά επίπεδα σοβαρότητας με κατάλληλη ρύθμιση του χρόνου παραμονής και της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος, τα οποία επηρέαζαν το pH του διαλύτη. Στη συνέχεια, η σοβαρότητα προσδιορίστηκε ως εξής (Del Pino-García et al., 2017) (Díaz-de-Cerio et al., 2018)

$$R_o = t \times e^{(T-100/14.75)}$$

$$SF = \log R_o$$

Ο SF ονομάζεται συντελεστής σοβαρότητας, ενώ ο R_o αντιστοιχεί στη σοβαρότητα. Ως τιμή αναφοράς λαμβάνεται η τιμή 100 (°C) και το 14,75 είναι μια εμπειρική παράμετρος που σχετίζεται με τη θερμοκρασία επεξεργασίας και την ενέργεια ενεργοποίησης.

Ο συνδυασμένος παράγοντας σοβαρότητας (CSF) αποτελεί μια διευρυμένη μορφή του SF, λαμβάνοντας υπόψη το pH του διαλύτη, το οποίο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αποσύνθεση του βιομάρτυρα (RGP) (FAOSTAT, 2015) :

$$R_o' = 10^{-pH} \times t \times (T-100/14.75)$$

$$CSF = \log R_o' - pH$$

Μια εναλλακτική έκφραση του CFS, που ορίζεται ως CFS', έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες εξετάσεις, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της σοβαρότητας διαφορετικών θεραπειών, εντός μεγάλων ευρών pH (FAOSTAT, 2015) :

$$CSF' = \log R_o + |pH - 7|$$

3.5 Πειραματικός σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση της επεξεργασίας

Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι διεργασίες έλαβαν χώρα υπό σταθερή θερμοκρασία (90 °C), δύο κρίσιμοι παράγοντες μεταχείρισης (ανεξάρτητες μεταβλητές), η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος (καταλύτης) (C_{CA}) και ο χρόνος (t), χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση, με βάση τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Επιλέχθηκε η ανάπτυξη ενός κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού, ο οποίος περιλαμβάνει 11 σημεία σχεδιασμού, 3 από αυτά είναι κεντρικά σημεία του πειράματος. Τα επίπεδα και των δύο ανεξάρτητων μεταχειρίσεων (C_{CA} , t) κωδικοποιήθηκαν σε 3 επίπεδα, -1, 0 και 1, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη μελέτη (Fontana, Antonioli & Bottini, 2013) . Οι κωδικοποιημένες και οι πραγματικές τιμές των μεταβλητών φαίνονται στον πίνακα 1.

Μεταβλητή	Κωδικός	Επίπεδα Συγκέντρωσης		
		-1	0	1
C_{CA} (%)	X_1	5	10	15
T (min)	X_2	60	180	300

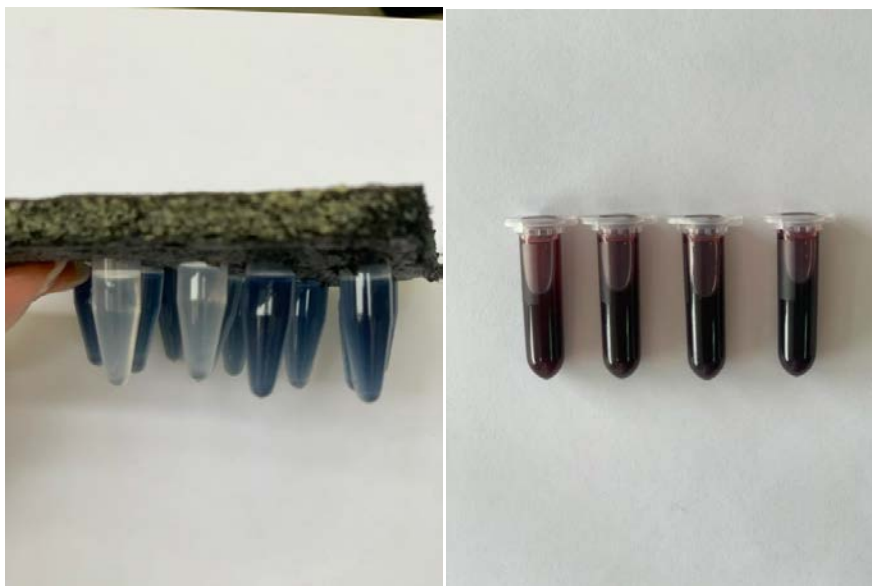
Πίνακας 3.1: Τα επίπεδα συγκέντρωσης κιτρικού οξέος (C_{CA}) και χρόνος παραμονής (t) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό, στην πραγματική και κωδικοποιημένη μορφή τους

Για να επιλεγούν τα κατάλληλα εύρη για τις τιμές και των δύο μεταβλητών, προηγήθηκαν πειράματα ενός παράγοντα για την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού. Η μοντελοποίηση της θεραπείας αξιολογήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική σημαντικότητα (R^2 , p), ενώ η σημαντικότητα κάθε συντελεστή του μοντέλου

χρησιμοποιήθηκε για την παράλειψη μη σημαντικών παραγόντων από τις εξισώσεις (μαθηματικά μοντέλα). Η αξιολόγηση, καθώς και κάθε άλλη σχετική στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν με κατάλληλους ελέγχους (τεστ έλλειψης προσαρμογής και ANOVA), λαμβάνοντας το 95% ως ελάχιστη σημαντικότητα.

3.6 Αναλύσεις για ολικές πολυφαινόλες, ολικές χρωστικές, ολικές φλαβονόλες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η ανάλυση για τον προσδιορισμό των ολικών πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας επικυρωμένης δημοσιευμένης μεθοδολογίας ([García-Lomillo & González-SanJosé, 2017](#)) και τεχνικές λεπτομέρειες οι οποίες αναφέρθηκαν αλλού ([Gawel et al., 2014](#)) (Εικόνα 3.4). Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως βαθμονόμηση και τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Ομοίως, τα προηγούμενως περιγραφέντα πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τόσο της ικανότητας απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) όσο και της αναγωγικής ισχύς (P_R) των εκχυλισμάτων που παρήχθησαν ([Gawel et al., 2014](#)). Οι A_{AR} και P_R εκφράστηκαν ως $\mu\text{mol DPPH}$ ανά g ξηρής μάζας (DM) και μmol ασκορβικού οξέος ισοδύναμα (AAE) ανά g DM, αντίστοιχα. Οι ολικές φλαβονόλες αναλύθηκαν μετά από παραγωγή με π -διμεθυλαμινοκιναμαλδεϋδη (DMACA) και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα κατεχίνης ([Gonzalez-Centeno et al., 2013](#)) (Εικόνα 3.5). Οι συνολικές χρωστικές αναλύθηκαν με την εφαρμογή μιας μεθοδολογίας που έχει ήδη αναφερθεί ([González-Vázquez et al., 2017](#)) και τα αποτελέσματα αναφέρθηκαν ως μαλβίνη (μαλβιδίνη 3-O-γλυκοζίτη) ισοδύναμα (Εικόνα 3.6).



Εικόνες 3.4, 3.5 και 3.6: Δείγματα από τις μετρήσεις πολυφαινολών, αντιοξειδωτικών και χρωστικών στο εργαστήριο

3.7 Χρωματογραφικές αναλύσεις

Η πειραματική ταυτοποίηση ορισμένων πολυφαινολικών μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα RGP επιτεύχθηκε με φασματομετρία υγρής χρωματογραφίας-διόδους-συστοιχίας μάζας (LC-DAD-MS). Ειδικότερα, το trans-καφταρικό οξύ ταυτοποιήθηκε

δοκιμαστικά, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη μελέτη (Gowman et al., 2019) , χρησιμοποιώντας ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό αρνητικής λειτουργίας. Ομοίως, μια προηγούμενη μεθοδολογία αναπτύχθηκε για την ταυτοποίηση των κύριων ανθοκυανινών, χρησιμοποιώντας θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Heuzé & Tran, 2020) . Η συσκευή χρωματογραφίας και οι αναλυτικές ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναφέρθηκαν λεπτομερώς σε προηγούμενη μελέτη (Gawel et al., 2014) . Κουερσετίνη 3-O-γλυκουρονίδιο, καεμφερόλη 3-O-ρουτινοσίδη, ρουτίνη, μυρικετίνη, καεμφερόλη, γαλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, κερκετίνη, ισοραμεντίνη και κατεχίνη. ποσοτικοποιήθηκαν με εξωτερικά πρότυπα, χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν με αρχικά πρότυπα των συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0 έως 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα παράγωγα p-κουμαρικού και φερουλικού προσδιορίστηκαν ποσοτικά ως p-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ, αντίστοιχα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυανίνης χλωριούχο χλωρίδιο ως πρότυπο και εκφράστηκε ως ισοδύναμο κυανίνης. Ομοίως, το καφεϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την ποσοτικοποίηση του trans-καφταρικού οξέος. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο τετραγωνικός συντελεστής συσχέτισης (R^2) των καμπυλών βαθμονόμησης ήταν > 0.999 . Όλα τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη ποιότητας HPLC.

3.8 Χειρισμός δεδομένων και στατιστικές

Ο πειραματικός σχεδιασμός που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της μεθοδολογίας της επιφάνειας απόκρισης, καθώς και τα συνοδευτικά στατιστικά στοιχεία (ANOVA, έλλειψη καλής προσαρμογής) και η ανάλυση κατανομής πραγματοποιήθηκαν με το JMP™ Pro 16 (SAS, Cary, NC, ΗΠΑ). Οι γραμμικές και μη γραμμικές παλινδρομήσεις (επίπεδο σημαντικότητας τουλάχιστον 95%) πραγματοποιήθηκαν με το SigmaPlot™.15.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, ΗΠΑ). Η κανονικότητα των δεδομένων εξετάστηκε με τη χρήση της μεθόδου Shapiro-Wilk. Δεδομένου ότι τα δεδομένα δεν βρέθηκαν να κατανέμονται κανονικά, οι στατιστικές σημαντικές διαφορές ήταν εξετάστηκαν με το τεστ Kruskal-Wallis, χρησιμοποιώντας το IBM SPSS Statistics™ 29 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Οι τιμές που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος $\pm$ η τυπική απόκλιση (SD).

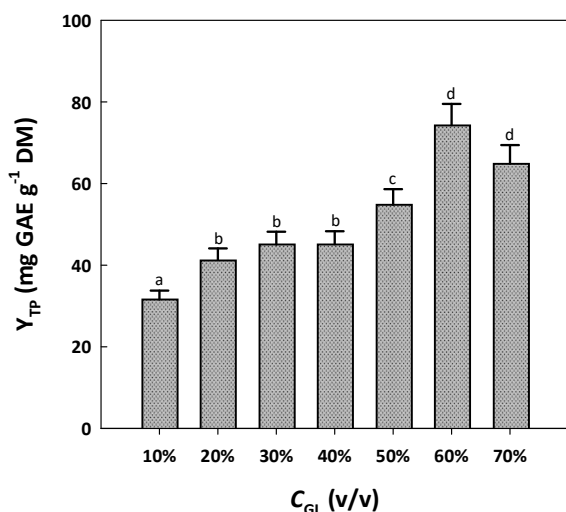
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Πειραματισμός μιας μεταβλητής

Μια προηγούμενη εξέταση σχετικά με την εκχύλιση πολυφαινόλων από ερυθρά στέμφυλα με τη χρήση μιγμάτων νερού/γλυκερόλης έδειξε ότι ένας διαλύτης που αποτελείται από 90% (w/v) γλυκερίνη θα μπορούσε να είναι πολύ αποτελεσματικός, ωστόσο αυτό το σύστημα διαλύτη ήταν ιδιαίτερα παχύρρευστο και ο χειρισμός του ήταν δύσκολος και προβληματικός (Katalinić et al., 2010). Με βάση αυτή την παρατήρηση, η περιεκτικότητα σε νερό των συστημάτων διαλυτών που δοκιμάστηκαν διατηρήθηκε σταθερό στο 10% και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξετάστηκε με την αλλαγή της αναλογίας του αιθανόλης/γλυκερόλης. Η γλυκερίνη δεν δοκιμάστηκε πέραν του 70%, για να ληφθούν εκχυλίσματα που θα μπορούσαν να φυγοκεντρηθούν εύκολα.

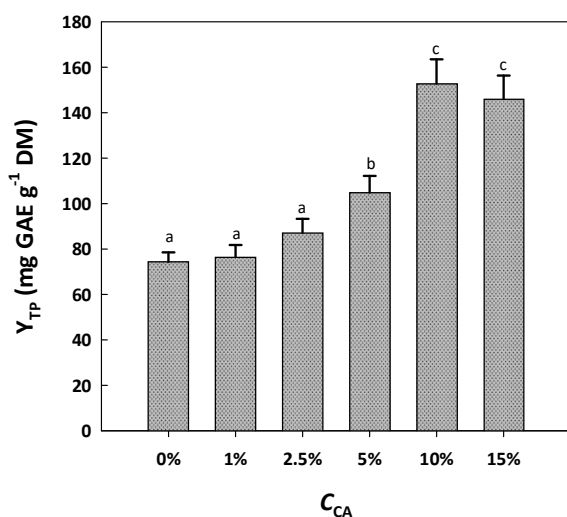
Στο **Σχήμα 4.1** απεικονίζεται η απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες που καταγράφηκε ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της γλυκερίνης (C_{GL}) στα μείγματα που δοκιμάστηκαν.



Σχήμα 4.1: Η επίδραση της αναλογίας της γλυκερόλης στο σύστημα διαλυτών που εξετάστηκε, στην απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες. Σε όλες τις περιπτώσεις, το σύστημα διαλύτη περιείχε ένα τυπικό ποσοστό νερού 10% και ποικίλα ποσοστά αιθανόλης. Οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, για 180 λεπτά. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

Η ενσωμάτωση γλυκερίνης σε επίπεδο 10% ήταν αναποτελεσματική, καθώς το εν λόγω σύστημα διαλυτών παρείχε σημαντικά χαμηλή Y_{TP} ($p < 0,05$). Η εναλλαγή της C_{GL} από 20 σε 60% παρείχε πρακτικά παρόμοια Y_{TP} , αλλά η ρύθμιση της C_{GL} στο 60% παρείχε σημαντικά υψηλότερο Y_{TP} ($p < 0,05$). Η περαιτέρω αύξηση της C_{GL} στο 70% δεν ευνόησε την υψηλότερη Y_{TP} . Επομένως, το μίγμα που αποτελείται από 10% νερό, 60% γλυκερίνη και 30% αιθανόλη επιλέχθηκε ως το πιο αποτελεσματικό.

Το επόμενο βήμα για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του συστήματος διαλύτη ήταν η εξέταση της επίδρασης του κιτρικού οξέος. Έτσι, προστέθηκε κιτρικό οξύ στον διαλύτη σε συγκεντρώσεις (C_{CA}) που κυμαίνονταν από 1 έως 15% (Σχήμα 4.2).

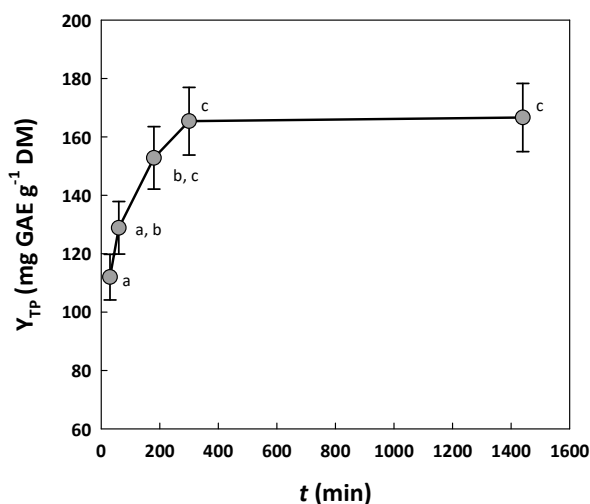


Σχήμα 4.2: Η επίδραση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) στο εξεταζόμενο σύστημα διαλύτη, στην απόδοση σε συνολικές πολυφαινόλες. Σε όλες τις περιπτώσεις, το σύστημα διαλύτη αποτελούνταν από 10% νερό, 60% γλυκερίνη και 30% αιθανόλη. Οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, για 180 λεπτά. Οι στήλες που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά γράμματα (a, b, c) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

Μέχρι C_{CA} 2,5%, το κιτρικό οξύ άσκησε αμελητέα επίδραση στην Y_{TP} . Ωστόσο, σε C_{CA} 10% η απόδοση εκχύλισης αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$), φθάνοντας τα 152,83 mg GAE g⁻¹ DM. Αντίθετα, η αύξηση του C_{CA} σε 15 % δεν προκάλεσε σημαντική αύξηση της Y_{TP} , σε

σύγκριση με το 10% ($p > 0,05$). Αυτό το αποτέλεσμα απέδειξε ότι η βέλτιστη C_{CA} κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15%.

Τέλος, εξετάστηκε επίσης ο χρόνος παραμονής (t), για να προσδιοριστεί η περίοδος επεξεργασίας εντός της οποίας το Y_{TP} θα μπορούσε να μεγιστοποιηθεί. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσες με το μείγμα που αποτελείτο από νερό/γλυκερόλη/αιθανόλη (1/6/3), που περιείχε 10% κιτρικό οξύ. Το χρονικό καθεστώς που δοκιμάστηκε κυμαινόταν από 30 έως 300 λεπτά με βάση προκαταρκτικά πειράματα, αλλά επεκτάθηκε επίσης έως τα 1440 λεπτά, για να εξεταστεί η επίδραση της παρατεταμένης επεξεργασίας (Σχήμα 4.3). Ο σχετικός σύντομος χρόνος παραμονής έως 60 λεπτά δεν ήταν ευνοϊκός για την επίτευξη υψηλού Y_{TP} , αλλά στατιστικά υψηλότερες τιμές που έφτασαν τα 165,40 mg GAE g⁻¹ DM επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας χρόνο παραμονής 300 min ($p < 0.05$). Δεν ήταν δυνατή η επίτευξη υψηλότερου Y_{TP} , ακόμη και όταν ο χρόνος παραμονής παρατάθηκε σε 1440 λεπτά (24 ώρες). Ως εκ τούτου, τα 300 λεπτά επιλέχθηκαν ως η καταλληλότερη ανώτερη τιμή για τη δοκιμή της επίδρασης του χρόνου παραμονής.



Σχήμα 4.3: Η επίδραση του χρόνου παραμονής της επεξεργασίας στην απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες, σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C. Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με σύστημα διαλύτη που αποτελείται από 10% νερό, 60% γλυκερίνη και 30% αιθανόλη, που περιείχε 10% κιτρικό οξύ. Τα σημεία που αντιστοιχούν σε διαφορετικά γράμματα (α, β, γ) αντιπροσωπεύουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

4.2 Μοντελοποίηση με βάση τη δριμύτητα

Η δριμύτητα της επεξεργασίας είναι ένα μέτρο της σφοδρότητας των συνθηκών που χρησιμοποιούνται, το οποίο μπορεί να αντικατοπτρίζεται σε αυτόν τον παράγοντα. Το pH του μέσου επεξεργασίας (διαλύτης) θεωρείται επίσης αναπόσπαστο μέρος της δριμύτητας (FAOSTAT, 2015). Ως εκ τούτου, ο συνδυασμένος παράγοντας δριμύτητας μπορεί να είναι πιο περιγραφικός από την άποψη αυτή, καθώς λαμβάνει επίσης υπόψη του την επίδραση της οξύτητας (ή αλκαλικότητας) του διαλύτη. Το κιτρικό οξύ θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ήπιος όξινος καταλύτης στη λιγνοκυτταρινική βιομάζα αποσύνθεση (Botelho et al, 2018) (Brahim et al, 2014), και η συνάφεια της επίδρασης αυτής με την ανάκτηση πολυφαινολών χρήζει διερεύνησης.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 90 °C, οι διάφορες δριμύτητες που δοκιμάστηκαν και διαμορφώθηκαν με τη χρήση διαφορετικών επιπέδων όξινων καταλυτών και χρόνου παραμονής. Για καθένα από αυτούς τους συνδυασμούς, προσδιορίστηκαν τόσο η CSF όσο και η CSF' και δόθηκαν μαζί με τη συνολική απόδοση πολυφαινόλης (Y_{tp}) (Πίνακας 4.2). Παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη Y_{tp} (168,49 mg GAE g⁻¹ DM) επιτεύχθηκε με $C_{CA} = 15\%$ και $t = 300$ λεπτά. Η τιμή αυτή ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνες που επιτεύχθηκαν με οποιοδήποτε άλλο σύνολο συνθηκών ($p < 0,05$) εκτός από εκείνη που επιτεύχθηκε με $C_{CA} = 10\%$ και $t = 300$ λεπτά (163,23 mg GAE g⁻¹ DM). Η διαφορά της σφοδρότητας αυτών των δύο μεταχειρίσεων ήταν στατιστικά μη σημαντική και, επομένως, το σύνολο των συνθηκών $C_{CA} = 10\%$ και $t = 300$ min μπορεί να θεωρηθεί ως η κατεργασία με τις υψηλότερες επιδόσεις.

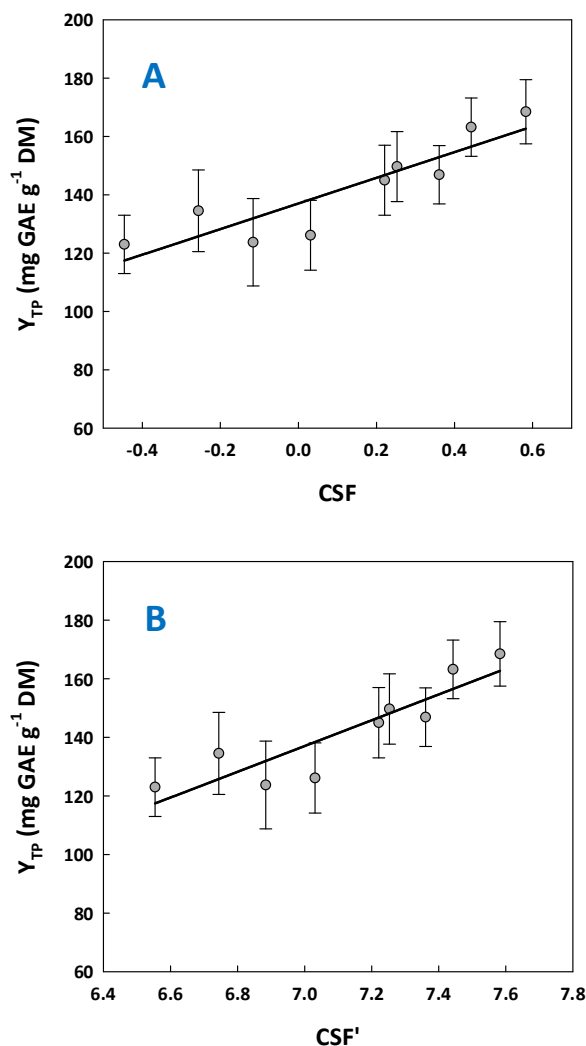
Πίνακας 4.1: Η επίδραση των διαφόρων συνδυασμών της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) και του χρόνου παραμονής (t) στη δριμύτητα της επεξεργασίας (CSF και CSF') και στη συνολική απόδοση πολυφαινολών (Y_{tp})

C_{CA} w/v)	(% t (min)	CSF	CSF'	Y_{tp} (mg GAE g ⁻¹ DM)
5	60	-		
		0.45 ^a	6.55 ^a	123.06 ^a

	180	0.03 ^c	7.03 ^c	126.13 ^a
	300	0.25 ^c	7.25 ^c	149.68 ^c
10	60	-0.26 ^a	6.74 ^a	134.52 ^c
	180	0.22 ^c	7.22 ^c	145.05 ^c
	300	0.44 ^b	7.44 ^b	163.23 ^b
15	60	-0.12 ^c	6.88 ^c	123.73 ^a
	180	0.36 ^c	7.36 ^c	145.09 ^c
	300	0.58 ^b	7.58 ^b	168.49 ^b

Οι τιμές εντός των στηλών με διαφορετικά υπερτιμημένα γράμματα (a, b, c), είναι στατιστικά διαφορετικές ($p < 0.05$).

Ένα άλλο ζήτημα που προέκυψε από τα δεδομένα που ελήφθησαν ήταν η συσχέτιση μεταξύ της δριμύτητας και της συνολικής απόδοσης πολυφαινολών. Για να εξεταστεί μια τέτοια υπόθεση, οι τιμές Y_{TP} απεικονίστηκαν σε συνάρτηση τόσο με το CSF όσο και με το CSF' (Εικόνα 4).



Σχήμα 4.4: Συσχέτιση μεταξύ του συνδυασμένου συντελεστή δριμύτητας (A) και του εναλλακτικού συντελεστή δριμύτητας (B), με την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες. Οι ράβδοι υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση.

Και στις δύο περιπτώσεις, η Y_{TP} βρέθηκε να συσχετίζεται με τη δριμύτητα της επεξεργασίας με γραμμικό τρόπο, που περιγράφεται από τα ακόλουθα τετραγωνικά μαθηματικά μοντέλα:

Λαμβάνοντας υπόψη την εξίσωση (6), η θεωρητική τιμή της Y_{TP} που υπολογίστηκε όταν $CSF = 0,44$, ήταν $156,41 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$. Η τιμή αυτή δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά με την τιμή $163,23$ που προσδιορίστηκε πειραματικά. Ομοίως, χρησιμοποιώντας την εξίσωση (7) με $CSF' = 7,44$, η θεωρητική τιμή Y_{TP} ήταν ίση με $156,41 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$. Συνεπώς, και

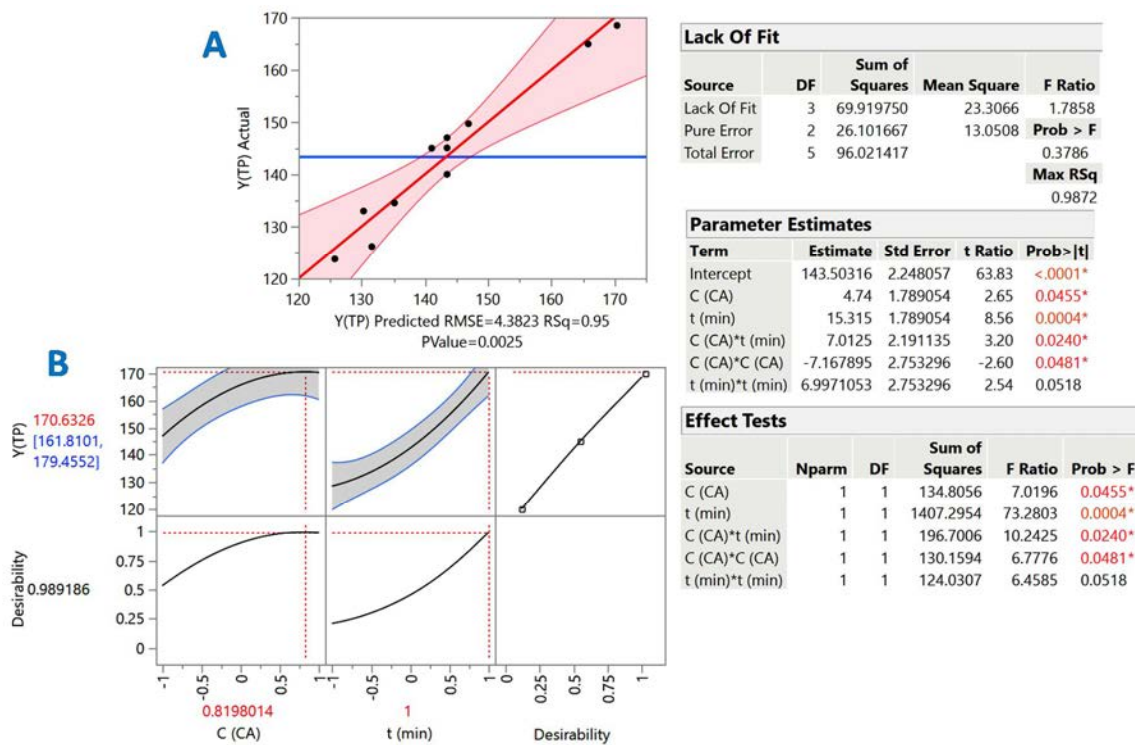
τα δύο μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αρκετά ακριβείς προβλέψεις. Για το λόγο αυτό, με την προσαρμογή του χρόνου παραμονής και του κιτρικού οξέος συγκέντρωσης ώστε να παρέχεται ένα συγκεκριμένο pH, τα μοντέλα που αντιπροσωπεύονται από τις εξισώσεις (6) και (7) θα μπορούσαν να παρέχουν κατά προσέγγιση τιμές για την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες.

4.3 Μοντελοποίηση με βάση την επιφάνεια απόκρισης

Λαμβάνοντας υπόψη τα στοιχεία που προέκυψαν από τα μοντέλα με βάση τη δριμύτητα, οι επιδράσεις του χρόνου παραμονής (t) και της συγκέντρωσης του όξινου καταλύτη (κιτρικό οξύ) (C_{CA}) αποδείχθηκε ότι είναι κρίσιμες για τη μεγιστοποίηση της συνολικής πολυφαινολικής απόδοσης ανάκτησης. Ως εκ τούτου, η βελτιστοποίηση της επεξεργασίας μέσω της ανάπτυξης της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης θεωρήθηκε ως κατάλληλο εργαλείο που θα μπορούσε να ρίξει περισσότερο φως στην επίδραση αυτών των δύο μεταβλητών. Αυτή η προσέγγιση αποσκοπούσε στην αξιολόγηση των επιδράσεων C_{CA} και t στην απόδοση της επεξεργασίας, αλλά και στην αποκάλυψη τυχόν διασταυρούμενων (συνεργιστικών) λειτουργιών. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και οι δοκιμές έλλειψης προσαρμογής χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της εγκυρότητας της μεταχείρισης μοντελοποίησης (Σχήμα 4.5). Οι προσδιορισθείσες (μετρούμενες) και προβλεπόμενες τιμές απόκρισης (Y_{TP}) παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2. Κάθε όρος του μοντέλου, που αξιολογήθηκε ως μη σημαντικός, αποκλείστηκε από την εξίσωση που προέκυψε. Έτσι, η εξίσωση με μόνο τους σημαντικούς όρους (Σχήμα 4.5, ένθετος πίνακας "Εκτιμήσεις παραμέτρων" είχε ως εξής:

$$Y_{TP} = 143.50 + 4.74X_1 + 15.32X_2 + 7.01X_1X_2 - 7.17X_{12} \quad (R^2 = 0.95, p = 0.0025) \quad (8)$$

Δεδομένου του R^2 και της σημαντικής τιμής p για την έλλειψη προσαρμογής (διάστημα εμπιστοσύνης τουλάχιστον 95%), θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το μοντέλο είχε εξαιρετική προσαρμογή στις πειραματικές μετρήσεις. Επιπλέον, το διάγραμμα περιγράμματος παρείχε μια οπτικοποίηση της επίδρασης των μεταβλητών της μεταχείρισης στην απόκριση/επεξεργασία (Y_{TP}) (Σχήμα 4.6).



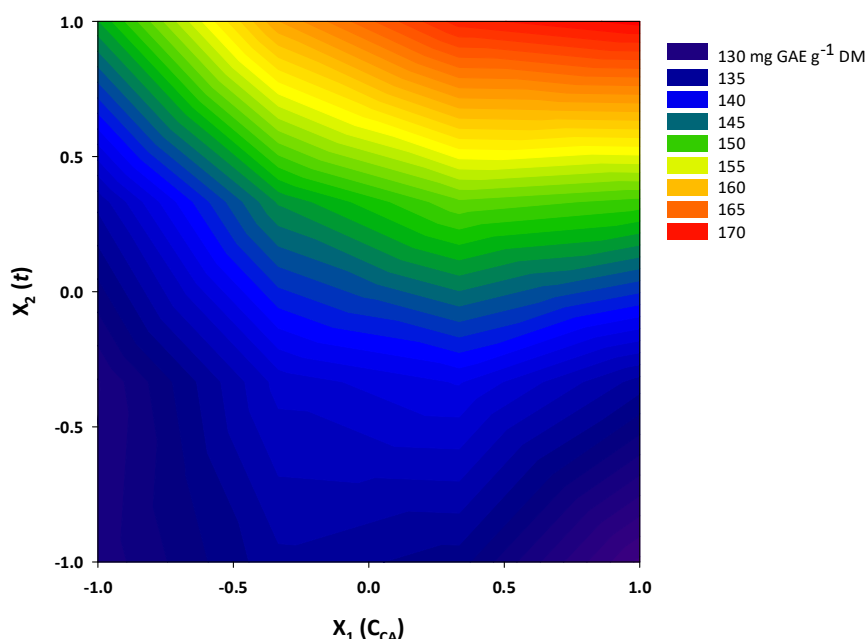
Σχήμα 4.5: Διάγραμμα που παρουσιάζει τη συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών της απόκρισης (Y_{TP}), που προέκυψε μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης. Δίνονται επίσης ο τετραγωνικός συντελεστής συσχέτισης (R^2) και η τιμή p-value για το μοντέλο (A). Στο διάγραμμα (B) παρουσιάζεται ο συντελεστής επιθυμητότητας, η μέγιστη προβλεπόμενη Y_{TP} , καθώς και τα θεωρητικά βέλτιστα C_{CA} και t . Οι ένθετοι πίνακες περιέχουν τα στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται με την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Οι τιμές που επισημαίνονται με αστερίσκο είναι στατιστικά σημαντικές (κόκκινο: $p < 0,05$, πορτοκαλί: $p < 0,001$).

Το μοντέλο (εξίσωση (8)) που κατασκευάστηκε με την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης έδειξε ότι η επίδραση και των δύο μεταβλητών μεταχείρισης, C_{CA} (X_1) και t (X_2), ήταν θετική και στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η συνεργιστική επίδραση μεταξύ των δύο μεταβλητών ($X_1 X_2$) ήταν επίσης θετική και σημαντική ($p < 0,05$), αλλά η τετραγωνική επίδραση της C_{CA} (X_1) ήταν αρνητική ($p < 0,05$). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι, πέραν ενός ορισμένου ορίου, οι αυξήσεις στη συγκέντρωση του κιτρικού οξέος μπορεί να μην συμβάλλουν στην επίτευξη υψηλότερης Y_{TP} . Από την άλλη πλευρά, η τετραγωνική επιδράσεις του t ήταν μη σημαντικές ($p > 0,05$).

Πίνακας 4.2: Τιμές απόκρισης (Y_{TP}) που αντιστοιχούν στα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του πειραματικού σχεδιασμού.

Design point	Independent variables		Responses	
	X_1 (C_{CA} , %)	X_2 (t , min)	Y_{TP} (mg GAE g ⁻¹ DM)	
			Measured	Predicted
1	-1 (5)	-1 (60)	132.97	130.29
2	-1 (5)	1 (300)	149.68	146.89
3	1 (15)	-1 (60)	123.73	125.74
4	1 (15)	1 (300)	168.49	170.40
5	-1 (5)	0 (180)	126.13	131.60
6	1 (15)	0 (180)	145.61	141.08
7	0 (10)	-1 (60)	134.52	135.19
8	0 (10)	1 (300)	164.94	165.82
9	0 (10)	0 (180)	145.05	143.50
10	0 (10)	0 (180)	147.11	143.50
11	0 (10)	0 (180)	140.06	143.50

Οι προβλεπόμενες βέλτιστες τιμές τόσο για το C_{CA} όσο και για το t μπορούσαν να προσδιοριστούν από τη συνάρτηση επιθυμητότητας (Σχήμα 4.5B), η οποία επέτρεψε επίσης την πρόβλεψη της μέγιστης απόκρισης. Έτσι, υπό βέλτιστες συνθήκες που εκτιμήθηκαν ως $C_{CA} = 14,1\%$ και $t = 300$ λεπτά, η μέγιστη Y_{TP} θα ήταν $170,63 \pm 8,82$ mg GAE g⁻¹ DM. Για τη διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής του μοντέλου, πραγματοποιήθηκαν τρεις μεμονωμένες εκχυλίσεις υπό τις ανωτέρω βελτιστοποιημένες συνθήκες, δίνοντας μια Y_{TP} τιμή $165,52 \pm 5,84$ mg GAE g⁻¹ DM, η οποία δεν είχε σημαντική διαφορά με την προβλεπόμενη μέγιστη τιμή ($p < 0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε την εγκυρότητα του μοντέλου.



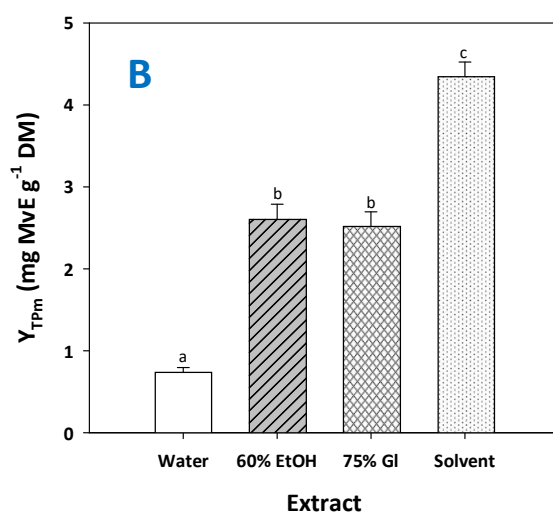
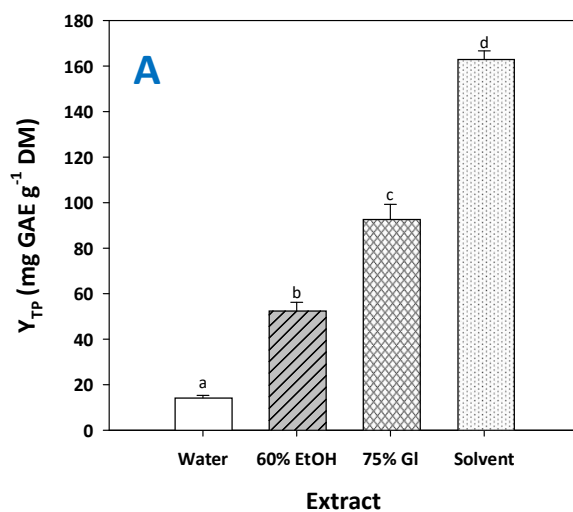
Σχήμα 4.6: Διάγραμμα περιγράμματος που απεικονίζει την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (Y_{IP}) συναρτήσει της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος (C_{CA}) και του χρόνου παραμονής (t).

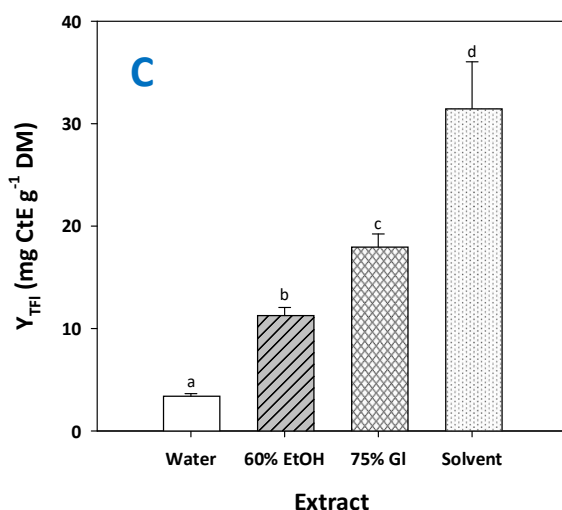
4.4 Αξιολόγηση της απόδοσης της επεξεργασίας

Για να διαμορφωθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα του πολυφαινολικού φορτίου του εκχυλίσματος που παράγεται υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν επίσης εκχυλίσσεις ελέγχου με τη χρήση νερού, υδροαιθανολικών και υδρογλυκερολικών διαλυτών, όπως προτείνεται σε προηγούμενη μελέτη (Khiari & Jeguirim, 2018), και τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν συγκριτικά με βάση τη συνολική απόδοση σε πολυφαινόλες. Ωστόσο, επειδή τα εκχυλίσματα RGP μπορεί να είναι εμπλουτισμένα σε χαρακτηριστικές κατηγορίες φλαβονοειδών, όπως οι ανθοκυανίνες και οι φλαβανόλες, εξετάστηκαν επίσης πρόσθετοι δείκτες, ώστε να υπάρξει μια ευρύτερη προσέγγιση όσον αφορά την ανάκτηση πολυφαινολών.

Ο διαλύτης με τη βελτιστοποιημένη σύσταση (νερό/αιθανόλη/γλυκερόλη 1/3/6, 14,1% κιτρικό οξύ), που αποδόθηκε από εδώ και στο εξής ως "διαλύτης", αποδείχθηκε πολύ πιο αποδοτικός από οποιοδήποτε άλλο σύστημα που δοκιμάστηκε, παρέχοντας σημαντικά υψηλότερη συνολική απόδοση πολυφαινολών ($p < 0,05$) (Σχήμα 4.7A). Ομοίως, η επεξεργασία RGP με το διαλύτη παρήγαγε εκχυλίσματα σημαντικά εμπλουτισμένα σε ολικές χρωστικές (Εικόνα 4.7B) και ολικές φλαβανόλες (Εικόνα 4.7Γ). Αυτά τα ευρήματα

υπογράμμισαν την αποτελεσματικότητα του διαλύτη για την ανάκτηση πολυφαινολών από τις κύριες κατηγορίες που απαντώνται σε RGP. Επιπλέον, για να έχουμε μια εικόνα της ικανότητας του διαλύτη, τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν με επιλεγμένα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.





Σχήμα 4.7: Απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (A), ολικές χρωστικές (B) και ολικές φλαβονόλες (Γ) που επιτυγχάνεται με την επεξεργασία RGP με τον διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ($C_{CA} = 14,1\%$, $t = 300$ min). Οι στήλες που αντιστοιχούν σε 60% EtOH και 75% GI αντιστοιχούν σε επεξεργασίες που πραγματοποιήθηκαν με υδατική αιθανόλη και υδατική γλυκερόλη. Η αντιστοίχιση με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) υποδηλώνουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

Όσον αφορά τις ολικές πολυφαινόλες, η συμβατική εκχύλιση σε δεξαμενή ανάδευσης με υδροαιθανολικό διαλύτη έδωσε απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (Llobera & Canellas, 2007) και $68,46 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ (Mäkelä et al. (2017), ενώ ο συνδυασμός υδροαιθανολικού διαλύτη και της εκχύλισης με τη βοήθεια μικροκυμάτων έδωσε απόδοση ολικών πολυφαινολών πάνω από $100 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ (McGovern et al. 2004) Άλλοι συγγραφείς χρησιμοποίησαν υδροαιθανολικό διαλύτη και εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων και βρήκαν αποδόσεις που δεν ξεπέρασαν τα $50 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$, ακόμη και μετά από ενζυμική επεξεργασία (Mendes Lopes et al., 2014). Συνδυασμός υδρογλυκερινικού διαλύτη και υπερήχων έδωσε απόδοση $66,70 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ (Katalinić et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, επίπεδα απόδοσης που έφτασαν τα $142,4 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ έχουν αναφερθεί για εξαντλητική εκχύλιση RGP με μείγματα νερού/αιθανόλης (Mendes Lopes et al., 2014), αλλά σε παρόμοιες διεργασίες η απόδοση ήταν περίπου $40 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ (Nellemann, 2009). Επιτεύχθηκε ακόμη υψηλότερη απόδοση $153,8 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DM}$ με μείγμα νερού/ακετόνης (OIV, 2024) .

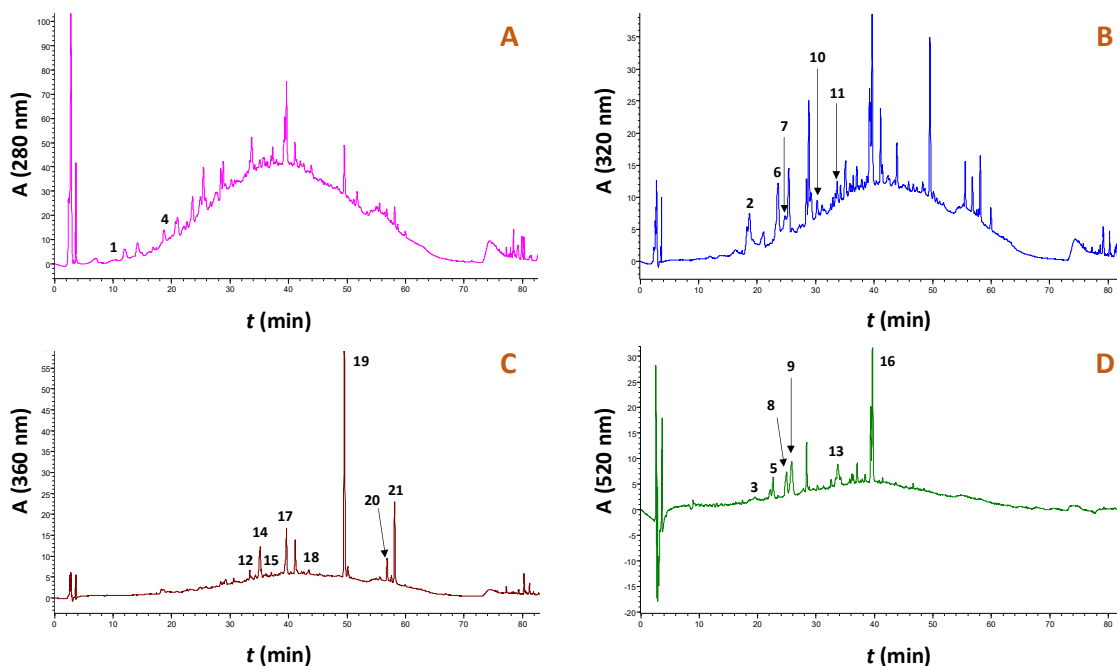
Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης αναδείξει το ρόλο της οξίνισης, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί να βοηθά την επεξεργασία βιομάζας με οργανικά διαλύματα και την απόδοση ανάκτησης των πολυφαινολών (Oliveira et al., 2013). Οι μεταβολές που η παρουσία οξέος θα μπορούσε να βοηθήσει, μπορεί να σχετίζονται με την αποτελεσματική διάσπαση του συμπλόκου κυτταρίνης-ημικυτταρίνης-λιγνίνης, επιτρέποντας την ευκολότερη και ταχύτερη εισχώρηση πολυφαινολών στον διαλύτη (υγρή φάση), όπως αναφέρθηκε για την επεξεργασία οργανικού διαλύματος με βάση τη γλυκερόλη με organosolv προεπεξεργασία καταλυόμενη με/από οξαλικό (Parpinello et al., 2019) και μυρμηκικό οξύ με βάση τη γλυκερόλη (Posadino et al., 2018). Συνεπώς, η διεξοδική διερεύνηση διαφόρων διαλυτών για την αποτελεσματική εκχύλιση ολικών πολυφαινολών από RGP έδειξε ότι η προσθήκη μυρμηκικού οξέος σε μείγματα νερού/μεθανόλης μπορεί να αυξήσει σημαντικά την απόδοση (Pretorius, 2000). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν για την εκχύλιση RGP με υδατική αιθανόλη, οξινισμένη με HCl (Ribéreau-Gayon et al., 2006), αλλά η χρήση του κιτρικού οξέος ως οξυντικό έχει επίσης αποδειχθεί ότι ευνοεί την αυξημένη ανάκτηση πολυφαινολών (Rockenbach et al., 2012).

Παρόλο που ο τύπος του χρησιμοποιούμενου οξέος, καθώς και η συγκέντρωση του οξέος είναι γνωστό από καιρό ότι ασκούν βαθιά επίδραση στην ανάκτηση χρωστικών ουσιών από RGP (Sagdic et al., 2011), αυτό επιβεβαιώθηκε από τις τελευταίες μελέτες που κατέδειξαν την επίδραση τόσο του κιτρικού όσο και του οξικού οξέος. (Gonzalez-Centeno et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, η οξίνιση του διαλύτη νερού/μεθανόλης με ανόργανο οξύ (HCl) αποδείχθηκε ότι παρέχει εξαιρετική απόδοση/επίδοση όσον αφορά την απόδοση ανθοκυανίνης, η οποία ανήλθε σε 13,8 mg MvE g⁻¹ DM (Scallan et al., 2011). Σχετικά υψηλή ανάκτηση ανθοκυανών έχει επίσης επιτευχθεί με υδροαιθανολικό διαλύτη και συμβατική εκχύλιση με ανάδευση σε δεξαμενή ανάδευσης (Souquet et al., 2000), ενώ άλλες εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν με υδροαιθανολικό διαλύτη ανέφεραν συνολική απόδοση ανθοκυανών που έφθασε σχεδόν τα 21 mg MvE g⁻¹ DM (Spatafora et al., 2013). Τα παραπάνω αναφερόμενα δεδομένα θα πρέπει να θεωρούνται απλώς ενδεικτικά, δεδομένου ότι η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το πολυφαινολικό φορτίο του υπό εξέταση RGP. Έτσι, οι διαφορές που προκύπτουν από γενετικούς (ποικιλιακούς) παράγοντες των σταφυλιών, καθώς και από τη μέθοδο οινοποίησης, θα μπορούσαν να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην απόδοση εκχύλισης.

4.5 Επίδραση στην πολυφαινολική σύνθεση και τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά

Εκτός από την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας όσον αφορά την ολική ανάκτηση πολυφαινολών, η αναλυτική σύνθεση είναι υψίστης σημασίας. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC για τη σκιαγράφηση των κύριων πολυφαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την επεξεργασία με τον διαλύτη, και αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα απεικονίζονται στην Εικόνα 8. Επιπλέον, για να αξιολογηθεί η ικανότητα του διαλύτη να εκχυλίζει πολυφαινόλες, πραγματοποιήθηκαν επίσης αναλύσεις στα εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν με 60% αιθανόλη, 75% γλυκερίνη και νερό, και τα ποσοτικά δεδομένα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Συνολικά, 21 ενώσεις μπόρεσαν να αναγνωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν. Επιπλέον, η εκτεταμένη αύξηση της βασικής γραμμής που καταγράφηκε στα 280 και 320 nm μαρτυρούσε την ύπαρξη πολυμερούς μη διαλυμένου υλικού, το οποίο πιθανώς αποτελείται από πολυμερείς φλαβονόλες (συμπυκνωμένες ταννίνες). Αναφορικά με τις επιμέρους ουσίες, η μαλβιδίνη 3-O-γλυκοσίδα p-κουμαρικό ήταν η επικρατέστερη σε όλα τα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν, ακολουθούμενη από την παιονιδίνη 3-O-γλυκοσίδα και την κατεχίνη. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε καλή συμφωνία με εκείνα που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τα πυρηνόκαρπα Syrah (Torres et al., 2022), Malbec (Varelas et al., 2006) και εκχυλίσματα από διάφορες ερυθρές ποικιλίες (Pretorius, 2000). Η εκλεκτικότητα του διαλύτη παρατηρήθηκε για κατεχίνη, το p-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και η δελφινιδίνη 3-O-γλυκοζίτη, ενώ η επεξεργασία με το διαλύτη έδωσε εκχυλίσματα εμπλουτισμένα σε μη χρωστικές πολυφαινόλες. Από την άλλη πλευρά, η επεξεργασία με 60% αιθανόλη απέδωσε εκχυλίσματα ιδιαίτερα εμπλουτισμένα σε χρωστικές ανθοκυανίνες, αλλά και ορισμένες φλαβονόλες, συμπεριλαμβανομένης της κερκετίνης 3-O-γλυκουρονίδης, μυρικετίνη και κερκετίνη.



Σχήμα 4.8: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα του εκχυλίσματος RGP που λαμβάνεται με επεξεργασία με το διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες. Τα χρωματογραφήματα A, B, C και D ανιχνεύθηκαν στα 280, 320, 360 και 520 nm, αντίστοιχα. Αντιστοίχιση κορυφών: 1, γαλλικό οξύ- 2, καφταρικό οξύ- 3, κυανιδίνη 3-O-γλυκοζίτης- 4, κατεχίνη- 5, δελφινιδίνη 3-O-γλυκοζίτης- 6, παράγωγο p-κουμαρικού- 7, παράγωγο φερουλάτης- 8, πετουνιδίνη 3-O-γλυκοζίτης- 9, παιονιδίνη 3-O-γλυκοζίτης, 10, p-κουμαρικό οξύ- 11, φερουλικό οξύ- 12, ρουτίνη- 13, μαλβιδίνη 3-O-γλυκοσίδιο- 14, κερκετίνη 3-O-γλυκουρονίδιο- 15, καεμφερόλη 3-O-ρουτινοσίδιο- 16, μαλβιδίνη 3-O-γλυκοσίδιο p-κουμαρικό- 17, μυρικετίνη- 18, ρεσβερατρόλη- 19, κερκετίνη- 20, καεμφερόλη- 21, ισοραμνετίνη

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν έδειξε ότι το εκχύλισμα που παράγεται από την επεξεργασία με το διαλύτη διαθέτει σημαντικά υψηλότερη ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) και αναγωγική ισχύς (P_R) (Σχήμα 4.9). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σύμφωνο με τα αποτελέσματα της συνολικής απόδοσης πολυφαινολών (Εικόνα 4.7A), γεγονός που υποδηλώνει ότι το πιο εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα εξέφρασε τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά αποτελέσματα. Ο πλούτος σε πολυφαινολικές ενώσεις έχει συσχετιστεί με ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση από διάφορες μελέτες (Vázquez-Armenta et al., 2017) (Spatafora et al., 2013) (Imbert, 2017), ωστόσο, η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έχει επίσης αποδοθεί σε συγκεκριμένα συστατικά

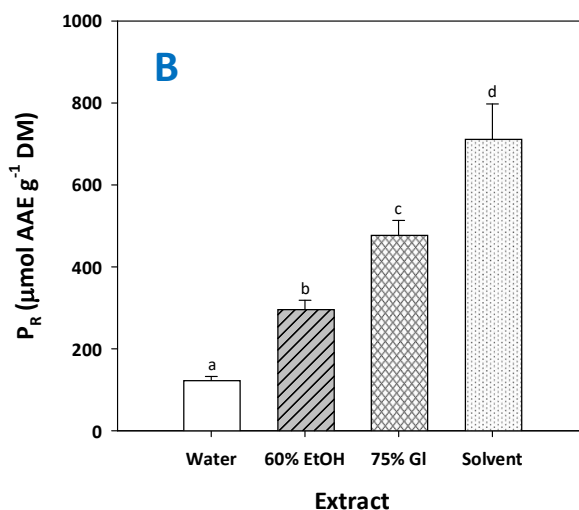
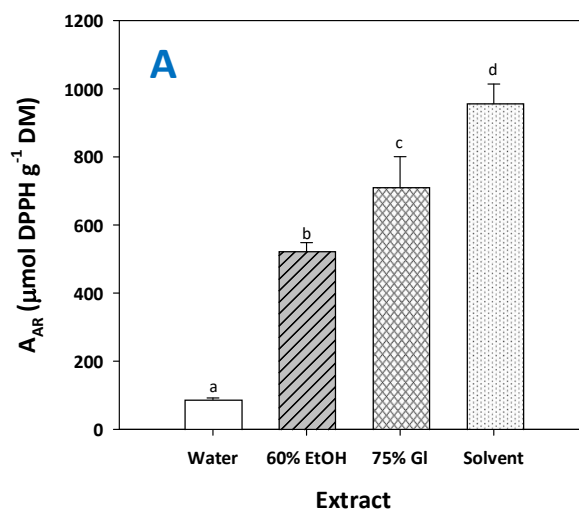
του εκχυλίσματος. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη και την επίδραση της φυσικής ενέργειας, εξαιρετικά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε για τους σπόρους σταφυλιών και αποδόθηκε στην υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονόλες (Maina et al., 2017) (Rodrigues Machado et al., 2023)

Πίνακας 4.3: Αναλυτική πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος που λαμβάνεται μετά την επεξεργασία με τον βελτιστοποιημένο διαλύτη καθώς και τα εκχυλίσματα που παρήχθησαν από τις μεταχειρίσεις ελέγχου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των τριπλών προσδιορισμών ($\pm$ τυπική απόκλιση).

Compound	Yield ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)			
	Water	60% EtOH	75% GI	Solvent
<i>Non-pigment polyphenols</i>				
Gallic acid	9.09 $\pm$ 0.11 ^a	nd	14.99 $\pm$ 1.52 ^b	nd
Caftaric acid	41.87 $\pm$ 0.78 ^a	28.95 $\pm$ 0.95 ^b	44.49 $\pm$ 1.56 ^{a, d}	39.65 $\pm$ 2.20 ^{a, c}
Catechin	136.49 $\pm$ 8.44 ^a	69.11 $\pm$ 3.33 ^b	253.22 $\pm$ 12.01 ^c	298.01 $\pm$ 24.36 ^d
<i>p</i> -Coumarate derivative	14.65 $\pm$ 0.85 ^a	nd	nd	15.96 $\pm$ 1.03 ^a
Ferulate derivative	44.04 $\pm$ 1.23 ^a	55.59 $\pm$ 1.76 ^b	54.87 $\pm$ 2.55 ^b	59.14 $\pm$ 5.88 ^b
<i>p</i> -Coumaric acid	12.46 $\pm$ 0.85 ^a	12.55 $\pm$ 0.47 ^a	14.22 $\pm$ 0.37 ^b	18.02 $\pm$ 1.53 ^c
Ferulic acid	17.94 $\pm$ 1.00 ^a	19.45 $\pm$ 1.92 ^a	19.22 $\pm$ 0.89 ^a	26.77 $\pm$ 0.38 ^b
Rutin	6.37 $\pm$ 0.34 ^a	16.03 $\pm$ 1.03 ^b	11.38 $\pm$ 0.44 ^c	16.51 $\pm$ 0.87 ^b
Quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	46.89 $\pm$ 1.32 ^a	98.78 $\pm$ 1.12 ^b	78.86 $\pm$ 0.86 ^c	82.90 $\pm$ 5.07 ^c
Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside	nd	6.72 $\pm$ 0.21 ^a	2.29 $\pm$ 0.08 ^b	3.47 $\pm$ 0.45 ^c
Myricetin	17.47 $\pm$ 0.38 ^a	92.23 $\pm$ 4.30 ^b	44.96 $\pm$ 0.71 ^c	50.08 $\pm$ 4.47 ^c
Resveratrol	9.37 $\pm$ 0.12 ^a	21.63 $\pm$ 0.79 ^b	17.08 $\pm$ 0.23 ^c	21.31 $\pm$ 1.07 ^b
Quercetin	19.23 $\pm$ 0.19 ^a	171.12 $\pm$ 5.21 ^b	108.78 $\pm$ 4.44 ^c	148.78 $\pm$ 8.64 ^d
Kaempferol	7.75 $\pm$ 0.39 ^a	32.27 $\pm$ 0.98 ^b	18.91 $\pm$ 0.27 ^c	30.82 $\pm$ 0.57 ^b

Isorhamnetin	9.84±0.11 ^a	93.14±1.02 ^b	46.43±0.41 ^c	89.51±5.07 ^b
Total	393.46	717.57	729.70	900.92
<i>Anthocyanin pigments</i>				
Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	24.17±0.39 ^a	27.48±2.71 ^a	5.27±0.42 ^b	12.76±1.66 ^c
Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside	64.95±5.63 ^a	78.21±3.29 ^b	60.63±6.62 ^c	114.94±2.39 ^d
Petunidin 3- <i>O</i> -glucoside	84.60±5.21 ^a	391.26±24.02 ^b	97.47±7.86 ^a	182.53±12.70 ^c
Paeonidin 3- <i>O</i> -glucoside	363.54±3.90 ^a	729.66±40.32 ^b	398.67±5.84 ^c	247.64±18.38 ^d
Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside	36.41±1.52 ^a	131.33±6.33 ^b	64.55±2.20 ^c	73.60±7.47 ^c
Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside <i>p</i> -coumarate	57.59±1.32 ^a	1,318.39±28.44 ^b	315.08±5.88 ^c	417.80±32.46 ^d
Total	631.26	2,676.33	941.66	1,049.25
Sum	1,024.72	3,393.90	1,671.36	1,950.17

Μελέτες σε καθαρές ενώσεις έχουν επίσης δείξει ότι οι φλαβανόλες, όπως η κατεχίνη, μπορεί να εκφράζουν υψηλότερη ικανότητα απόσβεσης σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες που απαντώνται στο RGP (Chowdhary et al., 2021). Για το λόγο αυτό, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η υψηλότερη A_{AR} και P_R που εμφανίζουν τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με διαλύτη θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση της κατεχίνης.



Σχήμα 4.9: Η ικανότητα απόσβεσης (A) και η αναγωγική ισχύς (B) του εκχυλίσματος που παράγεται μετά από RGP επεξεργασία με τον διαλύτη, υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες ($C_{CA} = 14,1\%$, $t = 300$ λεπτά). Στήλες που αντιστοιχίζονται ως 60% EtOH και 75% GI αντιστοιχούν σε επεξεργασίες που πραγματοποιήθηκαν με υδατική αιθανόλη και υδατική γλυκερόλη. Εκχώρηση με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d) υποδηλώνουν στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα εκχυλίσματα RGP είναι ιδιαίτερα σύνθετα μείγματα πολυφαινολών με μεταβλητή αντιοξειδωτική συμπεριφορά, και επομένως η απόδοση

αντιοξειδωτικών επιδράσεων σε ένα μόνο συστατικό μπορεί να είναι μια υπεραπλουστευμένη και παραπλανητική προσέγγιση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι προηγούμενες εξετάσεις έχουν προσφέρει ισχυρές ενδείξεις ότι, σε μείγματα πολυφαινολών, η εκδήλωση αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να είναι η ενσωμάτωση φαινομένων που περιλαμβάνουν συνεργισμό και ανταγωνισμό (Rivera et al., 2021) (Beres et al., 2017) . Συνεπώς, η εκτιμώμενη αντιοξειδωτική δραστηριότητα μπορεί κάλλιστα να αντανάκλα τέτοιες αλληλεπιδράσεις.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν καταρχάς η ανάπτυξη ενός νέου συστήματος τριτογενούς διαλύτη για την αποτελεσματική ανάκτηση πολυφαινολών από στέμφυλα κόκκινου σταφυλιού και, στη συνέχεια, η εφαρμογή και η βελτιστοποίηση μιας επεξεργασίας με οργανικούς διαλύτες για τη μεγιστοποίηση της ανάκτησης. Η αξιολόγηση της επεξεργασίας με τη χρήση του συντελεστή δριμύτητας έδειξε ότι η μέγιστη απόδοση μπορεί να επιτευχθεί σε σχεδόν 1 μέγιστη δριμύτητα, εντός των ορίων που δοκιμάστηκαν. Η ακόλουθη βελτιστοποίηση με βάση την επιφάνεια απόκρισης παρείχε ένα μοντέλο που προέβλεπε τον ιδανικό συνδυασμό κιτρικού οξέος συγκέντρωσης και χρόνου, για την επίτευξη της υψηλότερης ανάκτησης πολυφαινολών. Τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με τη χρήση του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου παρουσίασαν σημαντικά ενισχυμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να έχουν αξία για την παραγωγή εκχυλισμάτων που προορίζονται για χρήση ως αντιοξειδωτικά τροφίμων. Η μεταγενέστερη επεξεργασία για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη θα μπορούσε να παρακαμφθεί, αφαιρώντας μόνο την αιθανόλη και το νερό και λαμβάνοντας ουσιαστικά ένα εκχύλισμα με βάση τη γλυκερίνη. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να αποτελέσει μια στρατηγική για την εκμετάλλευση των στεμφύλων κόκκινου σταφυλιού που δεν θα πρέπει να αγνοηθεί. Υποθέτοντας ότι η γλυκερίνη θα μπορούσε να αποτελεί μέρος της τελικής σύνθεσης του προϊόντος, θα μπορούσε να υπάρξει μια απλή αξιοποίηση του εκχυλίσματος. Μια τέτοια επιλογή θα ήταν ιδιαίτερα ελκυστική, δεδομένου ότι οι σημερινές τάσεις υπαγορεύουν τη λειτουργικότητα και όχι συστατικά με βάση την καθαρότητα. Έτσι, τα παραγόμενα εκχυλίσματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για συγκεκριμένες εφαρμογές (π.χ. τρόφιμα/καλλυντικά πρόσθετα) παρά για γενική χρήση. Η ιδέα αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη διεργασιών που θα μπορούσαν να επεκταθούν, για την παραγωγή νεωτερικών βιομηχανικών προϊόντων μέσω βιώσιμων διαδρομών. Επί του παρόντος, βρίσκονται σε εξέλιξη εργασίες για την αξιολόγηση της σταθερότητας του εκχυλίσματος σε μήτρες με βάση τη γλυκερίνη, οι οποίες θα μπορούσαν να επιφέρουν περαιτέρω τη χρησιμότητα της προτεινόμενης επεξεργασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abou Samra M, Chedea VS, Economou A, Calokerinos A, Kefalas P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chem.* (2011) 125(2):622-9.
2. Almela Camañas, C., Espert, M., Ortolá Ortolá, M., & Castelló Gómez, M. L. (2014). Influence of minimally processed grapes washing with lemon essential oil. *International Food Research Journal*, 21(5), 1851-1857.
3. Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 316-322.
4. Antonioli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* (2015) 178:172-8.
5. Antonioli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, 178, 172-178.
6. Athanasiadis V, Palaogiannis D, Bozinou E, Lalas SI, Makris DP. β -Cyclodextrin-aided aqueous extraction of antioxidant polyphenols from peppermint (*Mentha $\times$ piperita* L.). *Oxygen.* (2022) 2(4):424-36.
7. Ayala-Zavala, J. F. N., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., ... & González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
8. Balea ȘS, Pârvu AE, Pârvu M, Vlase L, Dehelean CA, Pop TI. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of the *Vitis vinifera* L. var. Fetească Neagră and Pinot Noir pomace extracts. *Front Pharmacol.* (2020) 11:990.
9. Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Rodrigues, D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & Godoy, H. T. (2014). Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food research international*, 62, 500-513.

10. Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D. A., Gil-Izquierdo, A., ... & Domínguez-Perles, R. (2014). Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly) phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International*, 65, 375-384.
11. Bates, R. P., Morris, J. R., & Crandall, P. G. (2001). *Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing* (No. 146). Food & Agriculture Org..
12. Bautista-Ortín, A. B., Fernández-Fernández, J.I., A., López-Roca, J. M. and Gómez-Plaza, E. (2005). The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds, and wine colour and their relationship with the characteristics of the grapes used', *Journals of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16)pp. 6040-6045.
13. Beres C, Costa GN, Cabezudo I, da Silva-James NK, Teles AS, Cruz AP, et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* (2017) 68:581-94.
14. Bertran, E., Sort, X., Soliva, M. and Trillas, I., 2004. Composting winery waste: Sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 95(2), pp.203-208.
15. Bisha, B., Weinsetel, N., Brehm-Stecher, B. F., & Mendonca, A. (2010). Antilisterial effects of gravinol-s grape seed extract at low levels in aqueous media and its potential application as a produce wash. *Journal of Food Protection*, 73(2), 266-273.
16. Bodoira, R., Rossi, Y., Montenegro, M., Maestri, D., Velez, A., (2017). Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. *J. Supercrit. Fluids* 128, 57–65.
17. Bondancia TJ, de Aguiar J, Batista G, Cruz AJ, Marconcini JM, Mattoso LHC, et al. Production of nanocellulose using citric acid in a biorefinery concept: effect of the hydrolysis reaction time and techno-economic analysis. *Ind Eng Chem Res.* (2020) 59(25):11505-16.
18. Bordenave, G., (2003). Louis Pasteur (1822-1895). *Microbes and Infection* 5, 553-560.
19. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265.
20. Botelho, T., Costa, M., Wilk, M., & Magdziarz, A. (2018). Evaluation of the combustion characteristics of raw and torrefied grape pomace in a thermogravimetric analyzer and in a drop tube furnace. *Fuel*, 212, 95-100.

21. Bozinou E, Lakka A, Poulianiti K, Lalas S, Makris DP. Cyclodextrins as high-performance green cosolvents in the aqueous extraction of polyphenols and anthocyanin pigments from solid onion waste. *Eur Food Res Technol.* (2021) 247:2831-45.
22. Brahim, M., Gambier, F., & Brosse, N. (2014). Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products*, 52, 18-22.
23. Brazinha C, Cadima M, Crespo JG. Optimization of extraction of bioactive compounds from different types of grape pomace produced at wineries and distilleries. *J Food Sci.* (2014) 79(6):E1142-E9.
24. Broome, J. C., & Warner, K. D. (2008). Agro-environmental partnerships facilitate sustainable wine-grape production and assessment. *California Agriculture*, 62(4).
25. Caldas TW, Mazza KE, Teles AS, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Ind Crops Prod.* (2018) 111:86-91.
26. Caponio GR, Minervini F, Tamma G, Gambacorta G, De Angelis M. Promising application of grape pomace and its agri-food valorization: source of bioactive molecules with beneficial effects. *Sustainability.* (2023) 15(11):9075.
27. Chauhan, A., Deep, A. and Kumar, P., 2017. Citrus waste utilization: A step towards sustainability. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(2), pp.522-531.
28. Chemat, F., Vian, M.A. and Cravotto, G., 2012. Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), pp.8615–8627.
29. Cheng VJ, Bekhit AE-DA, McConnell M, Mros S, Zhao J. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chem.* (2012) 134(1):474-82.
30. Chotirotsukon C, Raita M, Champreda V, Laosiripojana N. Fractionation of sugarcane trash by oxalic acid catalyzed glycerol-based organosolv followed by mild solvent delignification. *Ind Crops Prod.* (2019) 141:111753.
31. Chotirotsukon C, Raita M, Yamada M, Nishimura H, Watanabe T, Laosiripojana N, et al. Sequential fractionation of sugarcane bagasse using liquid hot water and formic

- acid-catalyzed glycerol-based organosolv with solvent recycling. *BioEn Res.* (2021) 14:135-52.
32. Choueiri, L. Chedea, V.S., Calokerinos, A. Kefalas, P. (2012) Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC–MS. *Food Chem.* (2012) 133(3):1039-44.
 33. Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. Current trends and possibilities for exploitation of grape pomace as a potential source for value addition. *Environ Pol.* (2021) 278:116796.
 34. Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J.* (2009) 91(1):107-10.
 35. Da Porto C, Natolino A. Optimization of the extraction of phenolic compounds from red grape marc (*Vitis vinifera* L.) using response surface methodology. *J Wine Res.* (2018) 29(1):26-36.
 36. Del Pino-García, R., Rivero-Pérez, M. D., González-SanJosé, M. L., Croft, K. D., & Muñiz, P. (2017). Antihypertensive and antioxidant effects of supplementation with red wine pomace in spontaneously hypertensive rats. *Food & function*, 8(7), 2444-2454.
 37. Díaz-de-Cerio, E., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Ferranti, P., Nicoletti, R., Perrotta, G. M., & Gómez-Caravaca, A. M. (2018). Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, 3547-3557.
 38. Drevelegka I, Goula AM. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chem Eng Proc-Process Intens.* (2020) 149:107845. In review 27
 39. FAOSTAT, F. (2015). Statistical Databases and Data-Sets. *Food and Agriculture Organization of the United Nations.*
 40. Filippi K, Papapostolou H, Alexandri M, Vlysidis A, Myrtilis ED, Ladakis D, et al. Integrated biorefinery development using winery waste streams for the production of bacterial cellulose, succinic acid and value-added fractions. *Biores Technol.* (2022) 343:125989.

41. Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 8987-9003.
42. Gao Y, Zietsman AJ, Vivier MA, Moore JP. Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. *Molecules*. (2019) 24(1):165.
43. García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(1), 3-22.
44. Garcia-Montalvo J, Garcia-Martín A, Ibañez Bujan J, Santos Mazorra VE, Yustos Cuesta P, Bolivar JM, et al. Extraction of antioxidants from grape and apple pomace: Solvent selection and process kinetics. *Applied Sci*. 2022 12(10):4901.
45. Gawel, R., Day, M., Van Sluyter, S. C., Holt, H., Waters, E. J., & Smith, P. A. (2014). White wine taste and mouthfeel as affected by juice extraction and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10008–10014. <https://doi.org/10.1021/jf503082>
46. Gómez-Muñoz, B., Hatch, D.J., Bol, R. and García-Ruiz, R., 2017. Green applications for winery waste: From waste to fertilizer. *Science of the Total Environment*, 601-602, pp.85-93.
47. Gonzalez-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rossello, C., & Teissedre, P. L. (2013). Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11579-11587.
48. González-Vázquez, M. P., García, R., Pevida, C., & Rubiera, F. (2017). Optimization of a bubbling fluidized bed plant for low-temperature gasification of biomass. *Energies*, 10(3), 306.
49. Gowman, A. C., Picard, M. C., Lim, L. T., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2019). Fruit waste valorization for biodegradable biocomposite applications: A review. *BioResources*, 14(4), 10047-10092.
50. Harsha PS, Gardana C, Simonetti P, Spigno G, Lavelli V. Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking byproducts. *Biores Technol*. (2013) 140:263-8.

51. Heuzé, V., & Tran, G. (2020). Grape pomace. *Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO*.
52. Imbert E. Food waste valorization options: Opportunities from the bioeconomy. *Open Agric.* (2017) 2(1):195-204.
53. Iora SR, Maciel GM, Zielinski AA, da Silva MV, Pontes PVdA, Haminiuk CW, et al. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Inter J Food Sci Technol.* (2015) 50(1):62-9.
54. Kaltsa O, Lakka A, Grigorakis S, Karageorgou I, Batra G, Bozinou E, et al. A green extraction process for polyphenols from elderberry (*Sambucus nigra*) flowers using deep eutectic solvent and ultrasoundassisted pretreatment. *Molecules.* (2020) 25(4):921. In review 26
55. Katalinić V, Možina SS, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* (2010) 119(2):715-23.
56. Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., ... & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food chemistry*, 119(2), 715-723.
57. Khiari, B., & Jeguirim, M. (2018). Pyrolysis of grape marc from Tunisian wine industry: Feedstock characterization, thermal degradation and kinetic analysis. *Energies*, 11(4), 730.
58. Lafka, T.I., Sinanoglou, V. and Lazos, E.S., 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), pp.1206-1214.
59. Li Z, Smith KH, Stevens GW. The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications—a review. *Chin J Chem Eng.* (2016) 24(2):215-20. In review 25
60. Liu W, Du H, Liu H, Xie H, Xu T, Zhao X, et al. Highly efficient and sustainable preparation of carboxylic and thermostable cellulose nanocrystals via FeCl₃-catalyzed innocuous citric acid hydrolysis. *ACS Sustain Chem Eng.* (2020) 8(44):16691-700.

61. Llobera, A., & Canellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food chemistry*, 101(2), 659-666.
62. Maicas, S., 2020. The role of biotechnology in wine production. *Foods*, 9(4), p.565.
63. Maina S, Kachrimanidou V, Koutinas A. A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Cur Op Green Sustain Chem.* (2017) 8:18-23.
64. Mäkelä, M., Kwong, C. W., Broström, M., & Yoshikawa, K. (2017). Hydrothermal treatment of grape marc for solid fuel applications. *Energy conversion and management*, 145, 371-377.
65. Makris D, Kefalas P. Characterization of polyphenolic phytochemicals in red grape pomace. *Int J Waste Resour.* (2013) 3:126.
66. Makris DP, Lalas S. Glycerol and glycerol-based deep eutectic mixtures as emerging green solvents for polyphenol extraction: The evidence so far. *Molecules.* (2020) 25(24):5842.
67. Makris DP, Psarra E, Kallithraka S, Kefalas P. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Res Inter.* (2003) 36(8):805-14.
68. McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., et al. (2004). '*Fermented beverages of pre- and proto-historic China*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), pp. 17593-17598.
69. Melo PS, Massarioli AP, Denny C, dos Santos LF, Franchin M, Pereira GE, et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chem.* (2015) 181:160-9.
70. Mendes Lopes, M. L., Miguel, M. A. L., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2014). Grape juice obtained using steam extraction and other small-scale extraction methods: phenolic content, antioxidant capacity and stability during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1696-1702.
71. Metivier R, Francis F, Clydesdale F. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J Food Sci.* (1980) 45(4):1099-100. In review 28
72. Mirabella, N., Castellani, V. and Sala, S., 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, pp.28-41.

73. Moro KIB, Bender ABB, da Silva LP, Penna NG. Green extraction methods and microencapsulation technologies of phenolic compounds from grape pomace: A review. *Food Bioproc Technol.* (2021) 14:1407-31.
74. Morsli F, Grigorakis S, Halahlah A, Poulianiti KP, Makris DP. Appraisal of the combined effect of time and temperature on the total polyphenol yield in batch stirred-tank extraction of medicinal and aromatic plants: The extraction efficiency factor. *J Applied Res Med Arom Plants.* (2021) 25:100340.
75. Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J. J., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. Á. (2014). Recovery of aromatic aglycones from grape pomace winemaking by-products by using liquid-liquid and pressurized-liquid extraction. *Food analytical methods*, 7, 47-57.
76. Nellemann, C. (Ed.). (2009). *The environmental food crisis: the environment's role in averting future food crises: a UNEP rapid response assessment*. UNEP/Earthprint.
77. OIV (2024). 12 months, 12 resolutions: The definition of wine. Available online: [https:// www.oiv.int/press/12-months-12-resolutions-definition-wine](https://www.oiv.int/press/12-months-12-resolutions-definition-wine)
78. OIV, 2023. *Statistical Report on World Vitiviniculture*. International Organisation of Vine and Wine.
79. Oliveira, D. A., Salvador, A. A., Smânia Jr, A., Smânia, E. F., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of biotechnology*, 164(3), 423-432.
80. Overend RP, Chornet E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Phil Trans Royal Soc London Series A, Math Phys Sci.* (1987) 321(1561):523-36.
81. Palma, M. and Barroso, C.G., 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of phenolic compounds in red grape must and wine. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), pp.119–130.
82. Parpinello, G. P., Ricci, A., Arapitsas, P., Curioni, A., Moio, L., Segade, S. R., et al. (2019). Multivariate characterisation of Italian monovarietal red wines using MIR spectroscopy. *OENO One*, 53, 741–751.
<https://doi.org/10.20870/oenoone.2019.53.4.2558>
83. Pedersen M, Meyer AS. Lignocellulose pretreatment severity–relating pH to biomatrix opening. *New Biotech.* (2010) 27(6):739-50.

84. Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., & Ghiselli, A. (2006). Polyphenols and cardiovascular health: Lessons from the Mediterranean diet. *Circulation*, 113(13), e420-e426
85. Pintać D, Majkić T, Torović L, Orčić D, Beara I, Simin N, et al. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. *Ind Crops Prod.* (2018) 111:379-90.
86. Płotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namieśnik J. Extraction with environmentally friendly solvents. *Trends Anal Chem.* (2017) 91:12-25.
87. Posadino, A. M., Biosa, G., Zayed, H., Abou-Saleh, H., Cossu, A., Nasrallah, G. K., ... & Pintus, G. (2018). Protective effect of cyclically pressurized solid–liquid extraction polyphenols from Cagnulari grape pomace on oxidative endothelial cell death. *Molecules*, 23(9), 2105.
88. Pretorius, I.S., (2000). 'Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking'. *Yeast* 16(8), pp. 675-729.
89. Putnik P, Bursać Kovačević D, Dragović-Uzelac V. Optimizing acidity and extraction time for polyphenolic recovery and antioxidant capacity in grape pomace skin extracts with response surface methodology approach. *J Food Proc Preserv.* (2016) 40(6):1256-63.
90. Rajha HN, El Darra N, Hobaika Z, Boussetta N, Vorobiev E, Maroun RG, et al. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food Nutr Sci.* (2014) 2014.
91. Ravindran R, Desmond C, Jaiswal S, Jaiswal AK. Optimisation of organosolv pretreatment for the extraction of polyphenols from spent coffee waste and subsequent recovery of fermentable sugars. *Biores Technol Rep.* (2018) 3:7-14.
92. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
93. Rivera OMP, Leos MDS, Solis VE, Domínguez JM. Recent trends on the valorization of winemaking industry wastes. *Cur Op Green Sustain Chem.* (2021) 27:100415.

94. Rockenbach II, Gonzaga LV, Rizelio VM, Gonçalves AEDSS, Genovese MI, Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res Inter.* (2011) 44(4):897-901.
95. Rockenbach, I. I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., & Galensa, R. (2012). Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. *Food research international*, 48(2), 848-855.
96. Rodrigues Machado A, Atatoprak T, Santos J, Alexandre EM, Pintado ME, Paiva JA, et al. Potentialities of the extraction technologies and use of bioactive compounds from winery by-products: a review from a circular bioeconomy perspective. *Applied Sci.* (2023) 13(13):7754.
97. Romboli, Y., Romani, A. and Rodríguez-Gutiérrez, G., 2021. Advances in winery by-products: From waste to resources for a sustainable future. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), pp.1567-1580.
98. Sagdic, O., Ozturk, I., Yilmaz, M. T., & Yetim, H. (2011). Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *Journal of food science*, 76(7), M515-M521.
1. Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S.
99. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
100. Sidiras D, Politi D, Giakoumakis G, Salapa I. Simulation and optimization of organosolv based lignocellulosic biomass refinery: A review. *Biores Technol.* (2022) 343:126158.
101. Singh, R.P., Agrawal, M. and Kumar, S., 2020. Composting of vegetable waste: Methods, benefits, and future challenges. *Waste Management*, 102, pp.39-49.
102. Souquet, J. M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1076-1080.

103. Spatafora, C., Barbagallo, E., Amico, V., & Tringali, C. (2013). Grape stems from Sicilian *Vitis vinifera* cultivars as a source of polyphenol-enriched fractions with enhanced antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 542-548.
104. Torres, N., Yu, R., Martinez-Luscher, J., Girardello, R. C., Kostaki, E., Oberholster, A., & Kurtural, S. K. (2022). Shifts in the phenolic composition and aromatic profiles of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) wines are driven by different irrigation amounts in a hot climate. *Food Chemistry*, 371, 131163.
105. Tournour HH, Segundo MA, Magalhaes LM, Barreiros L, Queiroz J, Cunha LM. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind Crops Prod.* (2015) 74:397- 406.
106. Trasanidou D, Apostolakis A, Makris DP. Development of a green process for the preparation of antioxidant and pigment-enriched extracts from winery solid wastes using response surface methodology and kinetics. *Chem Eng Com.* (2016) 203(10):1317-25.
107. Tsakona, S., Galanakis, C.M. and Oreopoulou, V., 2018. Valorization of winery by-products. *Waste Biomass Valorization*, 9(5), pp.897-908.
108. Tzima K, Kallithraka S, Kotseridis Y, Makris DP. Kinetic modelling for flavanol extraction from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace using aqueous organic acid solutions. *Inter Food Res J.* (2014) 21(5).
109. Varelas, V., Tataridis, P., Liouni, M., & Nerantzis, E. T. (2006). Valorization of winery spent yeast waste biomass as a new source for the production of β -glucan. *Waste and biomass valorization*, 7, 807-817.
110. Vázquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Nazzaro, F., Fratianni, F., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *Journal of food science and technology*, 54, 3192-3200.
111. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso A, García-Parrilla M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.* (2007) 71(1):230-5. In review 29
112. Wani TA, Majid D, Dar B, Makroo HA, Allai FM. Utilization of novel techniques in extraction of polyphenols from grape pomace and their therapeutic potential: a review. *J Food Measur Character.* (2023) 17(5):5412-25.

113. Xu Y, Burton S, Kim C, Sismour E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Sci Nutr.* (2016) 4(1):125-33.
114. Zhou D-D, Li J, Xiong R-G, Saimaiti A, Huang S-Y, Wu S-X, et al. Bioactive compounds, health benefits and food applications of grape. *Foods.* (2022) 11(18):2755.