



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΙΓΑΙΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Αξιοποίηση και χαρακτηρισμός των μη εδώδιμων μερών φρούτων και  
μανιταριών για τη δημιουργία νέου τύπου συσκευασίας με  
αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Λαδερός Δημήτριος-Παναγιώτης (fns19063)

Επιβλέπων καθηγητής : Ζαχαρίας Ιωάννου

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Ιωάννου Ζαχαρίας : Επίκουρος καθηγητής

Σαρρής Δημήτριος : Επίκουρος καθηγητής

Γκιαούρης Ευστάθιος : Αναπληρωτής καθηγητής

Ιούνιος 2023, Λήμνος

## Περίληψη

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο μάθημα της πτυχιακής του Πανεπιστημίου Αιγαίου στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και διατροφής. Στόχος της εργασίας αυτή ήταν να εξεταστούν καινοτόμες μέθοδοι μέσω των οποίων τα μη εδώδιμα μέρη φρούτων (φλούδες) και συγκεκριμένα των πορτοκαλιών να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλες ουσίες που προέρχονται από τον αγροδιατροφικό τομέα, και πιο συγκεκριμένα τα μανιτάρια, με στόχο την δημιουργία νέων τύπου συσκευασιών οι οποίες θα προσδίδουν νέες ιδιότητες και πιο συγκεκριμένα θα έχουν αντιμικροβιακή δράση. Στην σημερινή εποχή τα απόβλητα των εσπεριδοειδών αποτελούν έναν βιολογικό κίνδυνο για το οικοσύστημα και ως εκ τούτου θα πρέπει να αξιοποιούνται περαιτέρω. Πέραν της δημιουργίας συσκευασιών, οι φλούδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες εφαρμογές όπως η χρήση τους στην διατροφή ζώων και η δημιουργία ζωοτροφών, η εφαρμογή τους στην παραγωγή βίο-καύσιμων έναντι των συμβατικών αερίων καύσης αλλά και στην παραγωγή προϊόντων άνθρακα μέσω εφαρμογής πυρόλυσης. Από την άλλη πλευρά, τα μανιτάρια τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι πέραν της σημασίας τους στην διατροφή του ανθρώπου μπορούν να αξιοποιηθούν και για την παραγωγή ενώσεων με φυσική αντιμικροβιακή δράση, οι οποίες είναι ασφαλές για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Επομένως, στόχος της εργασίας αυτής ήταν να εξετάσει την συνύπαρξη ουσιών που προέρχονται από τις φλούδες των πορτοκαλιών και πιο συγκεκριμένα των πηκτινών οι οποίες έχουν ικανότητα δημιουργίας φιλμ, αλλά και των πολυσακχαριτών που παράγονται από μανιτάρια οι οποίοι είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου β-γλυκάνες. Τα αποτελέσματα ήταν ανάμεικτα καθώς βρέθηκε αντιμικροβιακή δράση σε κάποιες ενώσεις ενώ σε άλλες δεν βρέθηκε, γεγονός που σημαίνει ότι πρέπει να γίνουν περισσότερες έρευνες τόσο στις ενώσεις που παράγουν τα μανιτάρια όσο και στην δημιουργία εδώδιμων συσκευασιών.

## Abstract

This work was carried out in the undergraduate course of the University of the Aegean in the Department of Food Science and Nutrition. The aim of this work was to examine innovative methods through which the non-edible parts of fruits (peels) and specifically of oranges can be used in combination with other substances from the agri-food sector, and more specifically mushrooms, with the aim of creating new types packages which will give new properties and more specifically will have an antimicrobial effect. In today's time citrus waste is a biological hazard to the ecosystem and should therefore be further utilized. In addition to the creation of packaging, peels can be used in a variety of applications such as their use in animal nutrition and the creation of animal feed, their application in the production of biofuels against conventional combustion gases and also in the production of carbon products through the application of pyrolysis. On the other hand, mushrooms in recent years have shown that beyond their importance in human nutrition, they can also be used to produce compounds with natural antimicrobial activity, which are safe for human consumption. Therefore, the objective of this work was to examine the coexistence of substances derived from orange peels and more specifically pectins which have the ability to create films, but also polysaccharides produced by mushrooms which are almost entirely  $\beta$ -glucans. The results were mixed as antimicrobial activity was found in some compounds while others were not, which means that more research needs to be done both in the compounds that the mushrooms produce and in the creation of edible packaging.

## Ευχαριστίες

Η δημιουργία της παρούσας πτυχιακής εργασίας δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια κάποιων ανθρώπων οι οποίοι μου προσέφεραν γνώσεις και τεχνογνωσία για να καταφέρω να την υλοποιήσω. Αυτούς τους ανθρώπους θέλω να τους ευχαριστήσω ξεχωριστά τον καθένα. Ευχαριστώ πολύ τον κύριο Ρηγόπουλο Νικόλαο, Δρ. φυσικής για την καθοδήγησή του τόσο στην προετοιμασία των πρώτων υλών όσο και στην βοήθεια απομόνωσης των πολυμερών πηκτίνης. Θέλω να ευχαριστήσω των Πιλαφίδη Σωτήριο, υποψήφιο διδάκτορα ο οποίος με βοήθησε εξ ολοκλήρου στο κομμάτι των μανιταριών αλλά και απομόνωσης των β-γλυκανών αλλά και την διδάκτωρ Τσούκο Έρη που με βοήθησε στις φυγοκεντρίσεις και στην διήθηση υπό κενό. Θέλω να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή μικροβιολογίας, Γκιαούρη Ευστάθιο ο οποίος ασχολήθηκε μαζί μου παρά τον αυξημένο φόρτο εργασίας του και με βοήθησε να πραγματοποιήσω το κομμάτι μικροβιολογίας το οποίο ήταν και το σημαντικότερο σε αυτή την εργασία. Τέλος, δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή της πτυχιακής αλλά και μέντορά μου, διδάκτωρ Ιωάννου Ζαχαρία ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα πτυχιακής και με συμβούλευε καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	2
Abstract .....	3
Ευχαριστίες.....	4
Θεωρητικό μέρος.....	9
1. Πορτοκάλι .....	9
1.1 Γενική περιγραφή .....	9
1.2 Βοτανολογική περιγραφή .....	9
1.3 Καλλιέργεια-Συγκομιδή .....	9
1.4 Το πορτοκάλι στην Ελλάδα.....	10
1.5 Φυσιολογία-Μορφολογία .....	10
1.6 Χημική σύσταση-θρεπτική αξία.....	12
1.6.1 Σάκχαρα και οργανικά οξέα .....	12
1.6.2 Λιπίδια.....	12
1.6.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	12
1.6.4 Καροτενοειδή .....	13
1.6.5 Αλκαλοειδή .....	13
2. Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού .....	14
2.1 Εισαγωγή.....	14
2.2 Χρήση αποβλήτων πορτοκαλιού στην παρασκευή ζωοτροφών.....	15
2.2.1 Μελέτες περιπτώσεις χρήσης φλούδας στην παρασκευή ζωοτροφών .....	15
2.3 Βιοκαύσιμα.....	17
2.3.1 Μελέτες περιπτώσεις παραγωγής βιοκαυσίμων από απόβλητα πορτοκαλιού .....	18
2.4 Πηκτίνες .....	22
2.4.1 Εισαγωγή.....	22
2.4.2 Πηκτίνη και σχηματισμός πηκτών .....	23
2.4.3 Μηχανισμός σχηματισμού πηκτής .....	23
2.4.4 Διατροφική αξία πηκτίνης.....	24
2.4.5 Βιομηχανικές εφαρμογές πηκτίνης.....	24
2.4.6 Μελέτες περιπτώσεις απομόνωσης πηκτινών από πορτοκάλια.....	25
3. Μύκητες .....	31
3.1 Εισαγωγή.....	31
3.2 Χαρακτηριστικά Μυκήτων.....	31
3.3 Αναπαραγωγή Μυκήτων .....	32

3.4 Κατηγορίες σπορίων.....	33
3.4.1 Ασεξουαλικά σπόρια.....	33
3.4.2 Σεξουαλικά σπόρια.....	33
3.4.3 Διατροφικές προσαρμογές.....	34
4. Μανιτάρια.....	34
4.1 Εισαγωγή.....	34
4.2 β-γλυκάνες.....	35
4.3 Μελέτες περίπτωσης β-γλυκανών .....	35
4.3.1 Εκχύλιση β-γλυκανής από μανιτάρια.....	35
5. Συσκευασία Τροφίμων .....	48
5.1 Εισαγωγή.....	48
5.2 Βασικές λειτουργίες συσκευασίας τροφίμου .....	49
5.2.1 Συγκράτηση προϊόντος :.....	49
5.2.2 Προστασία προϊόντος :.....	50
5.2.3 Προμήθεια και χρήση προϊόντος από τον καταναλωτή : .....	50
5.2.4 Επικοινωνία με τον καταναλωτή :.....	50
5.3 Γενική διάκριση συσκευασιών.....	51
5.3.1 Άμεσες και εξωτερικές συσκευασίες.....	51
5.3.2 Επίπεδα συσκευασίας.....	51
5.3.3 Προσχηματισμένα δοχεία και δοχεία που μορφοποιούνται κατά την συσκευασία.....	51
5.3.4 Συσκευασίες ερμητικά και μη ερμητικά κλεισμένες.....	52
5.3.5 Δύσκαμπτες, ημίσκληρες και εύκαμπτες συσκευασίες.....	52
6. Βρώσιμες – Εδώδιμες συσκευασίες τροφίμων.....	53
6.1 Εισαγωγή.....	53
6.2 Μεμβράνες πολυσακχαριτών .....	54
6.2.1 Άμυλο .....	54
6.2.2 Κυτταρίνη.....	55
6.2.3 Ημικυτταρίνη.....	55
6.2.4 Χιτοζάνη.....	55
6.2.5 Κόμμεα .....	56
6.3 Λιπιδιακές επικαλύψεις.....	56
6.4 Πρωτεϊνικές μεμβράνες.....	57
6.4.1 Κολλαγόνο.....	58
6.4.2 Ζελατίνη .....	58
6.4.3 Πρωτεΐνες γάλακτος.....	58

6.4.4 Ζεΐνη .....	58
6.5 Μεμβράνες από σύνθετα υλικά .....	59
6.6 Πρόσθετα μεμβρανών .....	59
6.6.1 Πλαστικοποιητές .....	59
6.6.2 Γαλακτωματοποιητές.....	59
6.6.3 Αντιμικροβιακές ουσίες.....	60
6.6.4 Νανοϋλικά .....	60
6.7 Μέθοδοι παραγωγής.....	60
6.7.1 Χύτευση διαλύματος .....	60
6.7.2 Εξώθηση.....	61
6.7.3 Χύτευση τήγματος.....	61
6.8 Μελέτες περιπτώσεις εδωδιμων συσκευασιών τροφίμων .....	61
Πειραματικό μέρος.....	68
7. Εκχύλιση πηκτίνης από πορτοκάλια .....	68
7.1 Εισαγωγή.....	68
7.2 Υλικά και αντιδραστήρια .....	69
7.3 Μεθοδολογία.....	69
8. Παραγωγή β-γλυκανών από βιομάζα .....	84
8.1 Εισαγωγή.....	84
8.2 Υλικά και αντιδραστήρια .....	85
8.3 Μεθοδολογία.....	86
8.3.1 Καλλιέργεια βασιδιομύκητα.....	86
8.3.2 Εκχύλιση πολυσακχαριτών από τον μύκητα.....	91
8.4 Συλλογή πολυσακχαριτών.....	95
8.4.1 Ενδοπολυσακχαρίτες.....	95
8.4.2 Εξωπολυσακχαρίτες.....	97
9. Παρασκευή των βιοφίλμ .....	97
9.1 Υλικά και αντιδραστήρια .....	97
9.2 Μεθοδολογία.....	98
10. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης μεμβράνης πηκτίνης από φλούδα πορτοκαλιού με ενθυλακωμένους πολυσακχαρίτες (β-γλυκάνες) από βασιδιομύκητα Schizophyllum commune μαζί με PEG 200 ως μέσο συσσωμάτωσης ενάντια στο βακτήριο Escherichia coli .....	103
10.1 Υλικά εξοπλισμός.....	103
10.2 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα.....	104
10.3 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία καλλιεργείων εργασίας .....	104

10.4 Πειραματική διαδικασία.....	105
10.5 Φωτογραφικό υλικό.....	106
11. Αποτελέσματα .....	112
11.1 Παραγωγή πηκτίνης .....	112
11.2 Παραγωγή β-γλυκανών .....	113
11.3 Δημιουργία βιοφίλμ.....	115
11.4 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης.....	116
Συμπεράσματα-Συζήτηση .....	117
Βιβλιογραφία.....	119



## Θεωρητικό μέρος

### 1. Πορτοκάλι

#### 1.1 Γενική περιγραφή

Το πορτοκάλι με την επιστημονική ονομασία *Citrus sinensis* η αλλιώς γλυκό πορτοκάλι είναι το πιο ευρέως γνωστό εσπεριδοειδές του κόσμου. Έχει τις ρίζες του στην ανατολική Ασία, ωστόσο καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο ως μία άριστη πηγή βιταμινών, κυρίως της βιταμίνης C αλλά και αντιοξειδωτικών και φυτοχημικών (Etebu & Nwauzoma, 2014). Πέραν των πολλών οφελών που έχει για την υγεία των καταναλωτών, το πορτοκάλι είναι ένα πολύ εύγευστο φρούτο το οποίο χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην παρασκευή χυμών, αναψυκτικών, γλυκών ακόμη και στην δημιουργία γκουρμέ πιάτων. Η ετήσια παραγωγή πορτοκαλιών ανέρχεται σε 102 εκατομμύρια τόνους (Zou et al., 2016) με την Βραζιλία να κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή του με 22% και έπειτα να ακολουθεί η Κίνα και η Ινδία καθιστώντας το πολύ σημαντικό για την οικονομική ανάπτυξη των χωρών που το παράγουν.

#### 1.2 Βοτανολογική περιγραφή

Η πορτοκαλιά πρόκειται για μικρό έως μετρίου αναστήματος αειθαλές δέντρο που φτάνει σε ύψος συνήθως τα 7,5 μέτρα ωστόσο μπορεί να φτάσει και τα 15 μέτρα. Προέρχεται από περιοχές τις νότιας Κίνας όπου και καλλιεργείται πολλά χρόνια και πλέον έχει επεκταθεί η καλλιέργεια του σε όλον τον κόσμο κυρίως σε περιοχές με τροπικό, υποτροπικό και γενικά θερμό περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξή του. Το δέντρο φέρει αειθαλή φύλλα με δερματώδη αφή διάφορων σχημάτων και μεγεθών που κυμαίνονται από κυρτά έως και επιμήκη και οβάλ μήκους 6,5 με 15 εκατοστά και πλάτους 2,5 με 9,5 εκατοστά, με αυτά που βρίσκονται κοντά στον μίσχο του κλαδιού να είναι εμφανώς μικρότερα. Πέραν των πράσινων φύλλων του επάνω στα κλαδιά υπάρχουν αρωματικά λευκά λουλουδάκια είτε μόνα τους είτε σε μπουκέτο των 6 με πλάτος 5 εκατοστά αποτελούμενα από 5 πέταλα και 20 με 25 κίτρινους στήμονες. Τα λευκά ή μωβ αρωματικά λουλουδάκια είναι εκείνα στα οποία γίνονται η παραγωγή του νέκταρ το οποίο αξιοποιείται από τα έντομα για επικονίαση. Από την άλλη ο καρπός είναι σφαιρικός ή οβάλ και έχει πλάτος 6,5 έως 9,5 εκατοστά και ωριμάζει αποκτώντας πορτοκαλί ή κίτρινο χρώμα (Etebu & Nwauzoma, 2014).

#### 1.3 Καλλιέργεια-Συγκομιδή

Σε γενικές γραμμές η καλλιέργεια πορτοκαλιών δεν είναι μία δύσκολη υπόθεση, ωστόσο όπως και σε κάθε δέντρο πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κάποιες προϋποθέσεις

ώστε να έχουμε επιτυχή ανάπτυξη. Το έδαφος όπου θα γίνει η φύτευση των δενδρυλλίων ή αλλιώς η τοποθέτηση σπόρων πρέπει να είναι ζεστό με αρκετή υγρασία και πλούσιο σε χώμα με αρκετή οργανική ύλη. Τα δέντρα παρουσιάζουν αδυναμία στις χαμηλές θερμοκρασίες κάτω των 7°C, επομένως τους χειμερινούς μήνες θα πρέπει να προστατεύονται σε κάποιο χώρο όπως ένα θερμοκήπιο. Την άνοιξη και το καλοκαίρι όπου γίνεται η ανάπτυξη του φυτού χρειάζεται λίπανση του φυτού με οργανικά λιπάσματα και ιδιαίτερα αν παρατηρηθεί κίτρινο χρώμα στα φύλλα τότε υπάρχει ανάγκη για εμπλουτισμό με άζωτο. Τα δενδρύλλια φυτεύονται σε παράλληλες σειρές και μεταξύ των αυτών πρέπει να υπάρχει ελάχιστη απόσταση των 5 μέτρων προς κάθε κατεύθυνση καθώς οι πορτοκαλιές είναι δέντρα με πολλές θρεπτικές ανάγκες και πρέπει να υπάρχει αρκετός χώρος μεταξύ των ριζών για επάρκεια θρεπτικών συστατικών. Το κλάδεμα του δέντρου πραγματοποιείται την άνοιξη ή το καλοκαίρι και η συγκομιδή πραγματοποιείται όταν οι καρποί αποκτήσουν πλούσιο πορτοκαλοκίτρινο χρώμα (Orange growing guide from GrowVeg)

<https://www.growveg.com/plants/us-and-canada/how-to-grow-oranges/>

#### 1.4 Το πορτοκάλι στην Ελλάδα

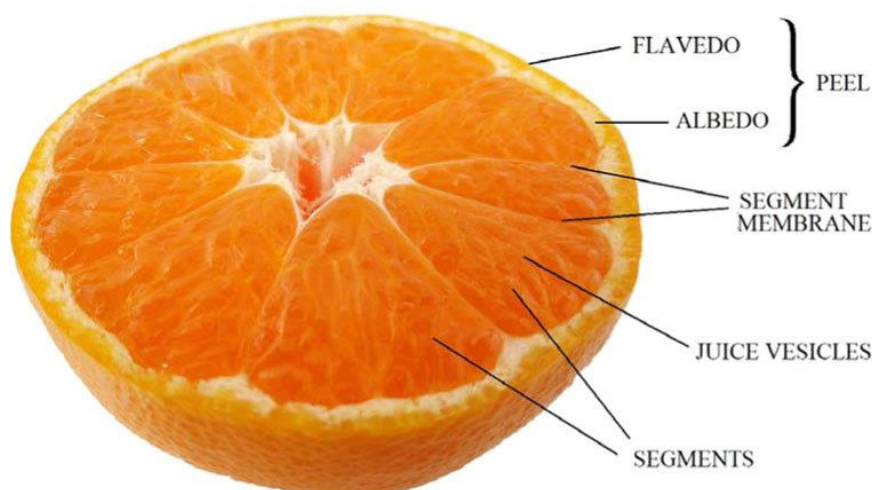
Τα πορτοκάλια προήλθαν από την Κίνα ή Ινδία και έφτασαν στην Ελλάδα από τους Πορτογάλους από τους οποίους πείρε και το όνομα πορτοκάλι, και εντατική καλλιέργειά του ξεκίνησε τον 15<sup>ο</sup> αιώνα. Επί την περίοδο της τουρκοκρατίας η Χίος εξήγαγε προς την Κωνσταντινούπολη πορτοκάλια αλλά και χυμό και το 1925 ο Άγγλος βοτανολόγος Σίδνεϋ Μέρλιν έφερε από την Καλιφόρνια το ομφαλοφόρο πορτοκάλι ή αλλιώς ποικιλία Μέρλιν ή κοινό ομφαλοφόρο πορτοκάλι το οποίο θεωρείται το πιο ευρέως γνωστό προς πώληση πορτοκάλι. Στην Ελλάδα η συνολική έκταση καλλιέργειας πορτοκαλιών ανέρχεται στα 294,5 χιλιάδες στρέμματα και η ετήσια παραγωγή ανέρχεται στους 740,5 χιλιάδες τόνους (ΕΛΣΤΑΑΤ 2019) από τους οποίους οι 350 χιλιάδες τόνοι εξάγονται σε χώρες του εξωτερικού.

<https://www.greekgastronomyguide.gr/item/portokali/>

#### 1.5 Φυσιολογία-Μορφολογία

Η δομή του καρπού επιτρέπει τον διαχωρισμό του σε 4 μέρη. Το flavedo, το albedo, το τμήμα μεμβράνης και τους χυμώδεις σάκους (Liu et al., 2007). Ανατομικά το περικάρπιο ή αλλιώς η λεγόμενη φλούδα αποτελείται από από μία επιδερμίδα από επιδερμικό κερί το οποίο στην επιφάνειά του φέρει πολλούς μικρούς αρωματικούς αδένες η οποίοι προσδίδουν στην φλούδα την ιδιαίτερη μυρωδιά που έχει. Η ποσότητα

κεριού που έχει ο καρπός εξαρτάται από πολλούς παράγοντες με τους κυριότερους να είναι η ποικιλία και συνεπώς η γενετική προδιαγραφή, οι κλιματολογικές συνθήκες αλλά και ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η ανάπτυξη του καρπού. Στην επιφάνεια βρίσκεται μία πληθώρα μικροχλωρίδας η οποία αυξάνει σε κλίματα με υψηλή υγρασία. Για αυτό τον λόγο πρέπει πριν την κατανάλωση ή την παραγωγή αιθέριων ελαίων ο καρπός να πλένεται με άφθονο νερό ώστε να μην αλλοιωθούν τα προϊόντα που θέλουμε να παραλάβουμε. Το εξωτερικό μέρος της φλούδας το οποίο έχει και το ζωηρό πορτοκαλοκίτρινο χρώμα ονομάζεται αποτελείται κυρίως από παρεγχυματώδη κύτταρα τα οποία παράγουν έλαια που περιέχουν χημικές αρωματικές ενώσεις τερπενοϊδών όπως το βαλεντένιο και την λεμονίνη. Το εσωτερικό τμήμα της επιδερμίδας έχει συνήθως κιτρινοπράσινο χρώμα και ονομάζεται flavedo. Το flavedo (εξωκάρπιο) είναι λεπτό και εύθραυστο και περιέχει ελαιώδη κυστίδια. Έχει συνήθως σπογγώδη δομή και το πάχος μεταβάλλεται καθόλη την ανάπτυξη του καρπού. Στην έσω πλευρά βρίσκεται μία λευκή σε χρώμα επιφάνεια η οποία ονομάζεται albedo (εσωκάρπιο). Το albedo η αλλιώς μεσοκάρπιο βρίσκεται κάτω από το flavedo και αποτελείται από κύτταρα σωληνοειδής μορφής. Τα κύτταρά του περιέχουν μεγάλο ποσοστό σε πηκτίνες αλλά και φλαβονοειδή τα οποία προσδίδουν πικρή γεύση αν βρεθούν εντός του χυμού.



Εικόνα 1 Δομή καρπού

Η σάρκα η οποία αποτελεί το φαγώσιμο μέρος του καρπού είναι συνήθως ζουμερή και γλυκιά και αποτελείται από 10 έως 14 τμήματα τα οποία έχουν χρώμα από κίτρινο έως πορτοκαλί και κόκκινο. Ο ώριμος καρπός ταξινομείται ως εσπεριδοειδές και ανήκει

την κατηγορία των μούρων. Οι χυμώδεις σάκοι περιέχουν το χυμό του φρούτου ο οποίος αποτελείται από νερό, σάκχαρα και οργανικά οξέα.

## 1.6 Χημική σύσταση-θεραπευτική αξία

### 1.6.1 Σάκχαρα και οργανικά οξέα

Τα πορτοκάλια περιέχουν μόνο και δι-σακχαρίτες όπως η γλυκόζη, η ρουτινόζη και η νεοεσπεριδόζη με το γλυκό πορτοκάλι να έχει τα υψηλότερα ποσοστά σε αυτά. Η περιεκτικότητα των πορτοκαλιών σε σάκχαρα εκφράζεται μέσω του ποσοστού σε βαθμούς Brix, οι οποίοι ορίζονται ως η περιεκτικότητα σακχάρων σε γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια χυμού του φρούτου. Τα ώριμα πορτοκάλια έχουν μεγαλύτερο βαθμό Brix από τα άγουρα και ο δείκτης μεταξύ σακχάρων προς ολικά οξέα εκφράζει την ωριμότητα και την γευστικότητα του φρούτου. Επιπρόσθετα το ποσοστό σε ολικά στερεά (TSS-Total Soluble Solids) αποτελεί έναν πρακτικό δείκτη ωριμότητας ο οποίος αυξάνεται όσο επέρχεται η ωρίμανση του καρπού. Σε γενικές γραμμές ο TSS αποτελείται από 80% σάκχαρα, 10% οξέα και 10% ενώσεις που περιέχουν άζωτο, όπως αμινοξέα και πρωτεΐνες. Ωρίμανση του φρούτου συνεπάγεται με βιοχημική μετατροπή των οργανικών οξέων προς απλά σάκχαρα. Όσον αφορά την περιεκτικότητα των οξέων το κιτρικό και το μηλικό οξύ έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ μπορούν να ανιχνευθούν οξαλικό, τρυγικό και ηλεκτρικό (Frag et al., 2020).

### 1.6.2 Λιπίδια

Τα λιπίδια του πορτοκαλιού βρίσκονται κυρίως στα κουκούτσια τα οποία θεωρούνται πολλά υποσχόμενη πηγή φυτικών ελαίων και φυτοχημικών λιπιδιακής φύσεως όπως φυτοστερόλες, καροτενοειδή και τοκοφερόλες. Μετά από ερευνητικές αναλύσεις, τα κύρια λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται είναι λινολεϊκό και παλμιτικό οξύ. Σε μικρότερες αναλογίες έχουν ανιχνευθεί υδρογονάνθρακες, εστέρες κηρών, στερόλες, ακυλογλυκερόλες και αλκοόλες. Τέλος, η πλειοψηφία των λιπαρών οξέων που απαντώνται στο πορτοκάλι είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα (Frag et al., 2020).

### 1.6.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Στους δευτερογενείς μεταβολίτες του πορτοκαλιού ανήκουν ενώσεις της κατηγορίας των αντιοξειδωτικών τα οποία φαίνεται πως έχουν πολλά οφέλη για την υγεία και ευζωία των καταναλωτών. Οι πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων και κατανέμονται σε διάφορες υποκατηγορίες με κυριότερες να είναι τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα.

Στα φλαβονοειδή ανήκουν ενώσεις όπως οι φλαβόνες (πχ διοσμετίνη και απγενίνη), πολυμεθόξυ-φλαβανόνες (πχ νοβιλετίνη και ταυγκερετίνη) και ανθοκυανίνες (Farag et al., 2020). Παρόλου που θεωρούνται μη θρεπτικοί παράγοντες καθώς δεν αποδίδουν θερμίδες, αλλά και ούτε συμμετέχουν στην ανάπτυξη και επιβίωση του οργανισμού, έχουν πολλά σημαντικά οφέλη και πρέπει να τους δίνετε μεγάλη προσοχή. Τα φαινορικά οξέα από την άλλη μπορούν να βρεθούν είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ενωμένα με άλλες χημικές ενώσεις και συμβάλλουν κυρίως μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης τόσο στους ίδιους τους καρπούς, όσο και στα τρόφιμα που τα περιέχουν. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως έχουν αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και νευροπροστατευτική δράση.

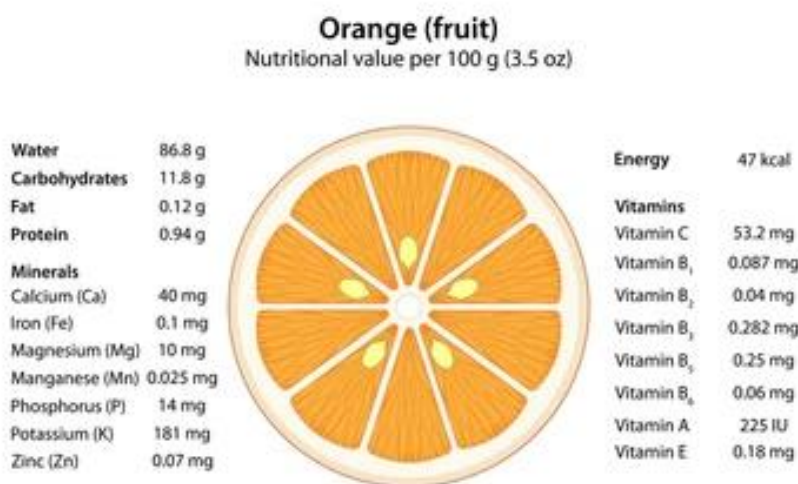
#### 1.6.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι διαδεδομένα στα φρούτα, κυρίως στα εσπεριδοειδή και εκτός του ότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τον σχηματισμό βιταμινών, έχουν μεγάλη συνεισφορά στο χρώμα του καρπού, δηλαδή λειτουργούν ως χρωστικές προσδίδοντας το πορτοκαλοκίτρινο χρώμα. Γενικότερα τα φρούτα ταξινομούνται σε κατηγορίες αναλόγως το περιεχόμενο και τον τρόπο κατανομής των καροτενοϊδών. Το πορτοκάλι ανήκει στην τάξη εκείνη που περιλαμβάνει καρπούς με σχετικά μεγάλη περιεκτικότητα σε β-καροτένιο, κρυπτοξανθίνη και ζεαξανθίνη (H. D. Belitz, W. Grosh, P. Schrieberle, 2012).

#### 1.6.5 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή πρόκειται για μία ιδιαίτερη κατηγορία ενώσεων που φέρουν στα μόρια τους άτομα αζώτου και μπορούν να παραληφθούν με όξινη εκχύλιση. Εντοπίζονται κυρίως σε φυτά και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των φαρμακολογικών επιδράσεών τους. Εμφανίζουν ποικίλες δράσεις όπως διεγερτική δράση, ναρκωτική δράση, ψυχεδελική και μυοχαλαρωτική δράση, αγγειοσυσταλτική και καρδιοτονωτική δράση και τέλος δηλητηριώδη δράση.

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE>



shutterstock.com · 2213414963

Εικόνα 2 Σύσταση πορτοκαλιού

## 2. Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού

### 2.1 Εισαγωγή

Στην ευρωπαϊκή ένωση η παραγωγή πορτοκαλιών συγκεντρώνεται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου με περισσότερους από 6 εκατομμύρια τόνους να παράγονται ετησίως. Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό καταλήγει ως μορφή αποβλήτων με το 50 έως και 60% των αποβλήτων από συνολικά απόβλητα εσπεριδοειδών να οφείλεται σε φλούδες και κουκούτσια πορτοκαλιών, τα οποία συνηθίζεται να απορρίπτονται σε Χώρους Υγειονομική Ταφής-ΧΥΤΑ. Η απόρριψη των αποβλήτων είναι όχι μόνο ενάντια στις αντιθέσεις των ευρωπαϊκών κανονισμών, αλλά οδηγεί και σε μεγάλη απώλεια πολύτιμων βιολογικών πόρων οι οποίοι με κατάλληλη αξιοποίηση μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της κυκλικής οικονομίας μέσω της αξιοποίησής τους στην παραγωγή νέων καινοτόμων προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Η αξιοποίηση των στερεών αποβλήτων από τους καρπούς των πορτοκαλιών και κυρίως της φλούδας μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην παραγωγή ζωοτροφών, στην παραγωγή ενέργειας μέσω βιο-καυσίμων αλλά και στην τεχνολογία και ανάπτυξη νέων τροφίμων ή και καινοτομιών στον χώρο του τροφίμου, μέσω της χρήσης πηκτινών οι οποίες μπορούν να σχηματίσουν βιοφίλμ τα οποία αυξάνουν την μακροζωία των τροφίμων στα ράφια των καταστημάτων. Δεν είναι δυνατόν λοιπόν στις μέρες μας που ο κόσμος μαστιζείται από οικονομική κρίση και ανεπάρκεια αγαθών και ενέργειας τα απόβλητα που μπορούν

να επαναχρησιμοποιηθούν να πετούνται και να μην αξιοποιούνται προς όφελός μας. (Α. Αναστασιάδη 2020.)

## 2.2 Χρήση αποβλήτων πορτοκαλιού στην παρασκευή ζωοτροφών

Η τεχνολογία ζωοτροφών περιλαμβάνει όλες εκείνες τις διαδικασίες που αφορούν την επεξεργασία συστατικών στην δημιουργία τροφών (feedstock) που προορίζονται για ζώα και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στην παγκόσμια αλυσίδα τροφίμων και συγκεκριμένα στο κομμάτι των συστημάτων ζωικής παραγωγής όπως είναι ο κλάδος της κτηνοτροφίας (Α. Αναστασιάδη 2020). Στόχος λοιπόν είναι η εκ του μηδενός δημιουργία ή η τροποποίηση των είδη υπάρχων ζωοτροφών οι οποίες θα εμπεριέχουν τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά με στόχο την σίτιση, την ανάπτυξη και την ευζωία των ζώων έως ότου την κατανάλωσή τους. Σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ζωοτροφών κατέχουν τα απόβλητα τροφίμων όπως είναι οι φλούδες των φρούτων. Είναι γεγονός πως τα ζώα φάρμας καταναλώνουν φλούδες, κουκούτσια και μαλακά κλαδιά φυτών. Ωστόσο η μεταποίηση των αποβλήτων σε feedstock μέσω τεχνολογικών εφαρμογών είναι πιο ικανή δημιουργήσει τροφές με καλύτερη εμπορική και θρεπτική αξία αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τον κλάδο της βιο-οικονομίας μέσω αξιοποίησης των υποπροϊόντων βιομηχανιών τροφίμων οι οποίες πλέον αντί να πετάνε απόβλητα θα πουλάνε πρώτη ύλη σε βιομηχανίες μεταποίησης.

### 2.2.1 Μελέτες περίπτωσης χρήσης φλούδας στην παρασκευή ζωοτροφών

#### 1<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Η μελέτη των (Hosseini et al., 2020) είχε σκοπό να παρουσιάσει τα πιθανά οφέλη που μπορούν να προσδώσουν οι ψαροτροφές που έχουν εμπλουτιστεί με πηκτίνες από φλούδες πορτοκαλιού, στο ψάρι κυπρίνος (*Cyprinus Carpio*). Κατά την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκαν 300 ψάρια τα οποία ταΐζονταν επί δύο βδομάδες με ψαροτροφή η οποία είχε εμπλουτιστεί με πηκτίνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα ψάρια που κατανάλωσαν την συγκεκριμένη τροφή είχαν μία αξιοσημείωτη ανάπτυξη στο μέγεθος έναντι εκείνων που ακολούθησαν μία συμβατική δίαιτα. Ακόμη παρατηρήθηκε βελτίωση των ανοσολογικών αποκρίσεων του βλεννογόνου εξ αιτίας της ανοσορυθμιστικής δράσης των πηκτινών. Συνεπώς, γίνεται ξεκάθαρο μέσω αυτής της έρευνας πως είναι προτιμότερο να γίνεται χρήση των αποβλήτων του πορτοκαλιού στην παραγωγή ψαροτροφών, διότι μπορεί να αυξηθεί η απόδοση σε κιλά ψαριού αλλά και η ποιότητά τους, συμβάλλοντας παράλληλα στην κυκλική οικονομία μέσω αξιοποίησης υποπροϊόντων.

## 2<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Το άρθρο των (Vlaicu et al., 2020) εστίασε στην μελέτη της επίδρασης που έχουν οι φλούδες πορτοκαλιού στην ανάπτυξη, την υγεία και την ποιότητα κρέατος των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής. Για την διεξαγωγή του πειράματος αγοράστηκαν πορτοκάλια από την τοπική αγορά τα οποία ξεπλύθηκαν με ζεστό νερό. Τα πορτοκάλια κόπηκαν στην μέση και στύφτηκαν μέσω πατήματος και οι φλούδες που παρέμειναν κόπηκαν σε μικρά και λεπτά κομμάτια και αφέθηκαν για μία βδομάδα σε στέγνωμα στον αέρα. Αφού ξηράθηκαν οι φλούδες, αλέσθηκαν σε έναν ηλεκτρικό μύλο και η σκόνη αποθηκεύτηκε σε χάρτινη σακούλα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου χρησιμοποιηθεί στην διατροφή των κοτόπουλων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη είναι πως η χορήγηση ζωοτροφών που περιέχουν 2% σκόνη φλούδας, μπορεί να τροποποιήσει την εντερική μικροχλωρίδα και τα συστατικά του ορού του αίματος. Ωστόσο η πιο σημαντική πληροφορία είναι πως βελτιώθηκε η ποιότητα του κρέατος εξ αιτίας της αναστολής υπεροξειδάσης των λιπαρών του κρέατος.

## 3<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Στο άρθρο των (Bakr, 2020) πραγματεύεται η χρήση φλούδας πορτοκαλιού ως μία καινοτόμα μέθοδος σίτισης στην παραγωγή μηρυκαστικών ζώων. Τα πλεονεκτήματα που αναφέρονται στο κείμενο ορίζονται ως εξής :

A) Αρχικά, τα ζώα ανεξαρτητοποιούνται από τα σιτηρά και επομένως η εισαγωγή καλαμποκιού περιορίζεται.

B) Γίνεται χρήση αποβλήτων τα οποία δεν ανταγωνίζονται την ανθρώπινη διατροφή

Γ) Μειώνεται η ρύπανση του περιβάλλοντος και το κόστος διατροφής των ζώων.

Δ) Οι νέες καινοτόμες ζωοτροφές, είναι πιο πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά τα οποία ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού των μηρυκαστικών

E) Ενισχύονται οι μικρομεσαίες επιχειρήσεις μέσω πώλησης των αποβλήτων τους σε εταιρείες μεταποίησης

Ο τρόπος χορήγησης φλούδας πορτοκαλιού μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Ο πρώτος αφορά φρέσκες φλούδες που περιέχουν υγρασία, ωστόσο αναλογικά έχουν μικρότερη συγκέντρωση σε στερεή μάζα. Τα πλεονεκτήματα χρήσης νωπής φλούδας είναι η αυξημένη γευστικότητα που έχει, οπότε διευκολύνει την κατανάλωση από τα ζώα, είναι



πλούσιες σε αντιοξειδωτικά και υδατοδιαλυτές βιταμίνες που βρίσκονται στο νερό. Τα μειονεκτήματα είναι πως η αποθήκευσή τους γίνεται δυσκολότερη λόγω ευαισθησίας σε αλλοίωση από μικροοργανισμούς αλλά προβλήματα λόγω αυξημένου όγκου. Ο δεύτερος τρόπος αφορά την ξήρανση της φλούδας. Οι αποξηραμένες φλούδες παρέχουν αναλογικά περισσότερη ενεργεία ανά κιλά και πέπτονται ευκολότερα από τα μηρυκαστικά. Παρουσιάζουν επιπρόσθετα μεγαλύτερη αντοχή σε αλλοιώσεις, και δεν ελκύουν τόσο ανεπιθύμητους οργανισμούς όπως τρωκτικά και πουλιά. Τέλος, είναι πολύ καλή πηγή ασβεστίου, ενώ το μόνο αρνητικό είναι η χαμηλότερη γευστικότητα.

### 2.3 Βιοκαύσιμα

Η ανάγκη για την χρήση εναλλακτικών και ανανεώσιμων πηγών καυσίμων έναντι του πετρελαίου και των παραγώγων του, έχει αρχίσει να παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον αναπτυσσόμενο κόσμο, τόσο για περιβαλλοντικούς όσο και οικονομικούς λόγους. Ως βίο-καύσιμα ορίζονται από την παγκόσμια βιβλιογραφία και τους συγγραφείς, τα στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα τα οποία προέρχονται από την βιομάζα, δηλαδή το βιολογικό και βιοδιασπώμενο υλικό το οποίο είναι ένας συνδυασμός προϊόντων ή αποβλήτων που προέρχονται από μεταποιητικές διαδικασίες. Η βιομάζα αποτελεί πηγή ενέργειας καθώς αποτελείται από οργανικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να οξειδωθούν μέσω βιοχημικών διεργασιών των μικροοργανισμών οι οποίοι θα αναπτυχθούν και θα παράγουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα πιο γνωστά βίο-καύσιμα που παράγονται έως τώρα είναι :

A) Το βιοντίζελ, το οποίο προέρχεται από βιομάζα πλούσια σε τριγλυκερίδια, όπως φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Έχει παρόμοιες φυσικές ιδιότητες με το κοινό πετρέλαιο και μπορεί να αναμιχθεί με αυτό. Παράγεται μέσω μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων και εστεροποίησης των ελευθέρων λιπαρών οξέων με αλκοόλες (Agroenergy-ιστοσελίδα)

<http://www.agroenergy.gr/categories/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AF%CE%B6%CE%B5%CE%BB>

B) Η βιοαιθανόλη, η οποία παράγεται από την ζύμωση σακχάρων μέσω αλκοολικής ζύμωσης. Πρόκειται ουσιαστικά για το κοινό οινόπνευμα το οποίο προέρχεται από απόβλητα βιομηχανιών. Έχει υψηλή ενεργειακή περιεκτικότητα, είναι βιο-αποικοδομησιμη και καθαρότερη από την βενζίνη (Agroenergy-ιστοσελίδα).

<http://www.agroenergy.gr/categories/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%B1%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CF%8C%CE%BB%CE%B7>

Γ) Το βιοαέριο, το οποίο παράγεται από αναερόβια ζύμωση αποβλήτων των βιομηχανιών όπως φλούδες εσπεριδοειδών, απόβλητα σφαγείων, ζυθοποιίας κλπ. Η παραγωγή και η χρήση του βιοαερίου προερχόμενο από αναερόβια ζύμωση παρέχει πολλά περιβαλλοντικά και κοινωνικό-οικονομικά οφέλη ιδιαίτερα στις μικρές οικονομικά κοινωνικές τάξεις όπως είναι οι αγρότες και οι κτηνοτρόφοι, οι οποίοι πλέον θα μπορούν να επωφελούνται από την πώληση των αποβλήτων τους (Agroenergy-ιστοσελίδα).

<http://www.agroenergy.gr/content/%CF%80%CE%BB%CE%B5%CE%BF%CE%BD%CE%B5%CE%BA%CF%84%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B1>

### 2.3.1 Μελέτες περιπτώσεις παραγωγής βιοκαυσίμων από απόβλητα πορτοκαλιού 1<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Η εργασία των (Patsalou et al., 2019) ασχολήθηκε με την ανάπτυξη ενός βιοδιλυστηρίου το οποίο θα χρησιμοποιεί φλούδες πορτοκαλιού ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης και βιοαερίου.

#### Α) Παραγωγή αιθανόλης :

Για την παραγωγή αιθανόλης τα σάκχαρα μπορούν να μετατραπούν απευθείας σε αιθανόλη ενώ τα κυτταρινούχα υλικά πρέπει πρώτα να προεπεξεργαστούν με ένζυμα ή με χημικές ουσίες ώστε τα πολυμερή να υδρολυθούν σε σάκχαρα. Στην παρούσα εργασία οι φλούδες υδρολύθηκαν μέσω όξινης αλλά και ενζυμικής υδρόλυσης. Παράχθηκαν 6 προϊόντα υδρόλυσης χρησιμοποιώντας 3 θερμοκρασίες (108, 116 και 125°C) για 10 και 20 λεπτά. Ως βέλτιστες τιμές για σακχαροποίηση των πολυμερών μέσω όξινης υδρόλυσης ορίστηκαν οι 116°C για 10 λεπτά. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση και μετέπειτα αλκοολική ζύμωση από τρία στελέχη ζυμομυκήτων.

#### Επεξεργασία φλούδας πορτοκαλιού

Η φλούδα διατηρούταν κατεψυγμένη, επομένως αποψύχθηκε και αλέστηκε σε κόκκους με ένα εργαστηριακό μπλέντερ. Η χημική ανάλυση της φλούδας έδειξε 22% κυτταρίνη, 11,08% ημικυτταρίνη, 2,19% λιγνίνη, 8,10% γλυκόζη, 12% φρουκτόζη, 2,8% σακχαρόζη, 25% πηκτίνη, 6,07 πρωτεΐνες και 3,78% λεμονίνη. Παρατηρούμε δηλαδή

πως μεγάλο ποσοστό αποτελείται από ενώσεις πολυσακχαριτών ενωμένους σε αλυσίδες οπότε η υδρόλυση είναι απαραίτητη.

#### Εκχύλιση ελαίων και πηκτίνης

Μέσω απόσταξης εκχυλίστηκαν και συλλέχθηκαν τα αιθέρια έλαια με απόδοση 0,43% w/w. Αυτά ξηράθηκαν στους 70°C για 24 ώρες και πραγματοποιήθηκε υδρόλυση αραιού οξέος στους 108, 116 και 125°C για 10 και 20 λεπτά χρησιμοποιώντας 0,5% v/v θειικό οξύ. Το διάλυμα φυγοκεντρίθηκε και έγινε διήθηση για να ληφθεί το υπερκείμενο το οποίο αναμίχθηκε με ίσο όγκο αιθανόλης 96% ώστε να καθιζάνει η πηκτίνη. Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρίθηκε για 30 λεπτά στις 3000rpm και το ίζημα που ανακτήθηκε πλύθηκε πέντε φορές με αιθανόλη 45% και ακολούθησε ξήρανση στους 50°C για να ληφθεί η πηκτίνη.

#### Ενζυμική υδρολυση

Τα προϊόντα όξινης υδρόλυσης που προέκυψαν προχώρησαν σε επιπλέον ενζυμική υδρόλυση με ένζυμα κυτταρινασών, β-γλυκοσιδασών και πηκτινασών. Το pH ρυθμίστηκε στο 4,8 και η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 50°C για 2 μέρες υπό ανάδευση 100rpm. Στο τέλος της υδρόλυσης τα ένζυμα καταστράφηκαν μέσω θέρμανσης στους 105°C για 44 λεπτά.

#### Αλκοολική ζύμωση

Για την αλκοολική ζύμωση χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη ζυμομυκήτων, ο *S.cerevisiae*, ο *P.kudriavzevii* KVMP10 και ο *K.marxianus*. Ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το προϊόν όξινης και ενζυμικής υδρόλυσης της φλούδας πορτοκαλιού. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες των 100ml με όγκο υγρής καλλιέργειας 60ml και θερμοκρασία 42°C υπό ανάδευση 100rpm.

#### B) Παραγωγή βιοαερίου :

##### Αναερόβια ζύμωση

Η αναερόβια ζύμωση έχει στόχο την παραγωγή βιοαερίου. Για την αναερόβια παραγωγή έγινε χρήση των παραπροϊόντων που προέκυψαν από την όξινη υδρόλυση, δηλαδή τα <<απόβλητα βιοδιλυστηρίου>>. Η παραγωγή αερίου έγινε σε θερμοκρασία 37°C μέσα σε φιάλες των 250ml με όγκο διαλύματος 150ml και το οξυγόνο

απομακρύνθηκε με 100% CO<sub>2</sub>. Τέλος, η συλλογή του αερίου πραγματοποιήθηκε για 121 ημέρες.

### Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας φαίνεται πως υπάρχουν δυνατότητες δημιουργίας βιοδιλυστηρίου που θα χρησιμοποιεί απόβλητα εσπεριδοειδών όπως οι φλούδες πορτοκαλιών, για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας με πολύ χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Η ταυτόχρονη όξινη υδρόλυση μαζί με ενζυμική υδρόλυση των αποβλήτων ενίσχυσε την ζυμοτική παραγωγή αιθανόλης. Από τα τρία στελέχη ζυμομυκήτων το θερμοανθεκτικό P.Kudriavzenii KVMP10 παρήγαγε μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης. Όσον αφορά την παραγωγή βιοαερίου, η χρήση υπολειμμάτων βιοδιλυστηρίου, δηλαδή ότι παρέμεινε στο τέλος της όξινης και ενζυμικής υδρόλυσης, έδειξε αυξημένη παραγωγή βιοκαυσίμου, γεγονός που σημαίνει ότι τα απόβλητα των βιοδιλυστηρίων μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για παραγωγή άλλων βιο-καυσίμων.

### 2<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Οι συγγραφείς (Taghizadeh-Alisaraei et al., 2017) μελέτησαν την αξιοποίηση αποβλήτων πορτοκαλιών στην περιοχή του Ιράν, όπου τα πορτοκάλια αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες της χώρας και κάθε χρόνο παράγονται μεγάλες ποσότητες απόβλητων από τις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται στην παραγωγή βιοαιθανόλης, βιοαερίου αλλά και στην διαδικασία της πυρόλυσης των φλουδών από πορτοκάλι. Η παραγωγή βιοαιθανόλη μπορεί να γίνει με δύο τρόπου. Είτε με καταλυτική μετατροπή του αιθυλενίου σε αλκοόλη, είτε μέσω ζύμωσης σακχάρων που βρίσκονται στα απόβλητα φρούτων από ζυμομύκητες. Από έναν τόνο νωπών αποβλήτων πορτοκαλιού με στερεή μάζα τα 200kg, δύναται να παραχθούν 39,64L αιθανόλης, κάτι το οποίο είναι πολύ σημαντικό αν σκεφτεί κανείς ότι τα απόβλητα θα πετάγονταν, και δεδομένου πως η αιθανόλη είναι ένα πολύ ακριβό προϊόν με μεγάλη ζήτηση.

Η επεξεργασία αποβλήτων υπό αναερόβιες συνθήκες μπορεί να μας δώσει το βιοαέριο. Αυτή μέθοδος παραγωγής συμβάλει στην μείωση των περιβαλλοντικών επιβαρυντών και χρησιμοποιείται κατά κόρον στην επεξεργασία αγροτικών απορριμμάτων καθώς λόγω της ανάγκης απουσίας οξυγόνου τα προϊόντα που θα παραχθούν θα έχουν χαμηλό

COD και BOD. Οι μελέτες έχουν δείξει πως μια βιομηχανία οι οποία επεξεργάζεται 600 τόνους κάθε μέρα μπορεί να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες τις και να αποθηκεύσει περαιτέρω ενέργεια μέσω της αναερόβιας ζύμωση.

Η πυρόλυση από την άλλη είναι η απευθείας καύση των αποβλήτων για την παραγωγή θερμότητας με ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων ενεργού άνθρακα. Ο αρθρογράφος επισημαίνει πως οι επιστήμονες Miranda et al. πραγματοποίησαν πυρόλυση σε ξερές φλούδες πορτοκαλιού σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Φάνηκε πως οι φλούδες έχουν την δυνατότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας υγρών καυσίμων λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε πτητικές ενώσεις και χαμηλή περιεκτικότητα σε τέφρα. Μιλώντας με νούμερα, από φλούδες πορτοκαλιού μπορεί να παραχθεί βιοέλαιο 75% το οποίο ισοδυναμεί με 25% της συνολικής παραγωγής βιοελαίου της χώρας και αυτό να προέρχεται από απόβλητα εσπεριδοειδών.

### 3<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Οι αρθρογράφοι (Selvarajoo et al., 2022) μελέτησαν την παραγωγή άνυδρου ξυλάνθρακα (Biochar) που παράγεται από την πυρόλυση φλουδών πορτοκαλιού, ως μία ενδεχόμενη λύση για μελλοντικό βιοκαύσιμο.

### Υλικά και μεθοδολογία

Συλλέχθηκαν φλούδες από νοικοκυριά και ξηράθηκαν στον ήλιο για 1-2 ημέρες. Έπειτα, έγινε ξανά ξήρανση στους 110°C για 3 ώρες. Στην συνέχεια οι αποξηραμένες φλούδες έγιναν σκόνη και κοσκινίστηκαν σε μεγέθη 1,6-2,36mm και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η πυρόλυση πραγματοποιήθηκε σε σωληνοειδή φούρνο με θάλαμο από ανοξείδωτο χάλυβα. Κάθε φορά τοποθετήθηκαν 25gr σκόνης σε θερμοκρασίες 300, 400, 500, 600 και 700°C για 1 ώρα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα που περιέχει μόνο άζωτο. Αφού μετατράπηκε η σκόνη σε βιοκάβουνο αφαιρέθηκε από τον φούρνο και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να κρυώσει και μετέπειτα να πάει για ανάλυση φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.

### Αποτελέσματα

Φάνηκε λοιπόν, πως οι συνθήκες της πυρόλυσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό της φυσικοχημικές ιδιότητες της ανθρακικής ύλης που παράγεται. Όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 300 στους 500°C, η περιεκτικότητα σε άνθρακα αυξήθηκε από 72,11% σε 81,80% w/w και το ενεργειακό περιεχόμενο αυξήθηκε από 24,01 σε

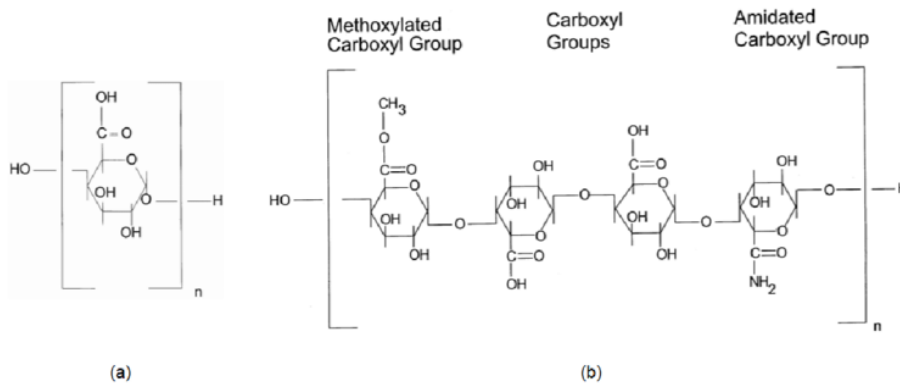
25,73MJ/kg. Τα δείγματα των 500°C καίγονται με πιο σταθερό ρυθμό και πλησιάζουν τις ιδιότητες του ορυκτού άνθρακα. Γίνεται πλέον αντιληπτό πως οι φλούδες πορτοκαλιού δείχνουν πολλές υποσχόμενες δυνατότητες στην χρήση τους ως βιοκαύσιμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση στην χρήση ορυκτών ανθράκων για την παραγωγή ενέργειας, οι οποίοι αποτελούν μη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας.

## 2.4 Πηκτίνες

### 2.4.1 Εισαγωγή

Οι πηκτίνες αποτελούν μία πολύ σημαντική ομάδα πολυσακχαριτών και πιο συγκεκριμένα ετεροπολυσακχαριτών. Η ιδιαίτερη ονομασία τους οφείλεται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν πηκτή. Πρόκειται για υδρόφιλα κολλοειδή τα οποία έχουν την ικανότητα να συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού. Οι πηκτίνες απαντώνται ως φυσικά συστατικά των φυτικών ιστών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υφή και συνεκτικότητα των φρούτων και λαχανικών. Οι μεταβολές που υφίστανται οι πηκτίνες έχουν ως αποτέλεσμα το μαλάκωμα της σάρκας των φρούτων κατά την ωρίμανση, μεταβολές στην θολερότητα πολτών και συμπυκνωμάτων φρούτων και απώλεια της κολλοειδούς σταθερότητας στους χυμούς. Επιπλέον χρησιμοποιούνται ως πρόσθετο τροφίμων εξ αιτίας της ικανότητας να σχηματίζουν πηκτές και να μεταβάλλουν το ιξώδες και συνεπώς την ρευστότητα των προϊόντων (Α. Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη 2003).

Χημικά, η πηκτίνη αποτελείται από μακριές ευθύγραμμες αλυσίδες πολυγαλακτουρονικού οξέος, του οποίου οι καρβοξυλικές ομάδες είναι εν μέρει εστεροποιημένες με μεθυλική αλκοόλη. Η δομή τους είναι σχετικά απλή με βασικό δεσμό α-1,4. Στα φυτική κύτταρα οι πηκτίνες βρίσκονται σε αδιάλυτη μορφή στο νερό, η οποία καλείται ως πρωτοπηκτίνη και πιστεύεται πως είναι ενωμένη με την κυτταρίνη των φυτικών ιστών.



Εικόνα 3 Μοριακή δομή πηκτίνης

#### 2.4.2 Πηκτίνη και σχηματισμός πηκτών

Η κύρια χρήση της πηκτίνης όπως προαναφέρθηκε είναι ο σχηματισμός σταθερών πηκτών που εφαρμόζεται στην βιομηχανία τροφίμων για την παρασκευή μαρμελάδων, ζελεδών, πελτέδων κλπ. Για να μπορέσει η πηκτίνη να σχηματίσει πηκτή πρέπει πρώτα να αφυδατωθεί. Η αφυδάτωση γίνεται με αφυδατωτικές ουσίες όπως αλκοόλες και κετόνες και κατάλληλη ρύθμιση pH. Στην περίπτωση παρασκευής τροφίμων όπως γλυκά, ζελέδες η αφυδάτωση προέρχεται φυσικά μέσω προσθήκης ζάχαρης. Γενικότερα για τον σχηματισμό πηκτής σημαντικό ρόλο παίζει το τρίπτυχο πηκτίνης-ζάχαρης-οξέος και η αναλογία μεταξύ τους.

#### 2.4.3 Μηχανισμός σχηματισμού πηκτής

Όλα τα λυόφιλα πολυμερή, όπως οι πηκτίνες παρουσιάζουν υψηλό ιξώδες στα διαλύματά τους, που εξαρτάται από το μοριακό βάρος, το βαθμό εστεροποίησης, τη συγκέντρωση, την παρουσία ιόντων στο διάλυμα και το pH. Όταν στα διαλύματα αυτά γίνεται προσθήκη μονοσθενών κατιόντων το ιξώδες μειώνεται διότι τα κατιόντα εξουδετερώνουν τα αρνητικά φορτία των ελεύθερων καρβοξυλομάδων τα οποία είναι υπεύθυνα για απωστικές δυνάμεις μεταξύ τους. Όσο πιο μικρός ο βαθμός εστεροποίησης, δηλαδή όσο περισσότερες οι ελεύθερες καρβοξυλομάδες τόσο πιο έντονα μειώνεται το ιξώδες. Ωστόσο όταν γίνεται προσθήκη αλάτων δισθενών ή τρισθενών κατιόντων το αποτέλεσμα είναι ακριβώς το αντίθετο.

Σε υψηλό pH οι ελεύθερες καρβοξυλομάδες δίστανται και τα μόρια των πηκτινών φορτίζονται αρνητικά, με συνέπεια οι αλυσίδες του πολυγαλακτουρονικού οξέος να απλώνουν σε ευθεία και άκαμπτη αλυσίδα με συνέπεια την αύξηση ιξώδους. Το ιξώδες σε αυτή την κατάσταση είναι υψηλό ωστόσο η δημιουργία πηκτής δεν είναι ικανή. Για να σχηματιστεί πηκτή πρέπει να σχηματιστεί τρισδιάστατη αλυσίδα η οποία δεσμεύει μεγάλη ποσότητα νερού στο πλέγμα που σχηματίζεται. Αυτή η δομή μπορεί να

σχηματιστεί μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων. Η παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης νερού στο διάλυμα αλλά και ιονισμένων πολυηλεκτρολυτών επιτρέπει τον δεσμό πηκτίνης-νερού και όχι πηκτίνης-πηκτίνης με συνέπεια την μη δημιουργίας πηκτής. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, οι πηκτίνες πρέπει να αφυδατωθούν μέσω προσθήκης ζάχαρης ως αφυδατικό μέσο, αλλά και δημιουργία χαμηλού pH, μέσω προσθήκης οξέων, το οποίο θα εξουδετερώσει την ιονική άπωση.

Στα διαλύματα πηκτινών, όπου ο βαθμός μεθοξυλίωσης είναι χαμηλός, η τρισδιάστατη δομή μπορεί να σχηματιστεί μέσω γεφυρών κατιόντος ασβεστίου μεταξύ των καρβοξυλομάδων, δημιουργώντας έτσι πιο σταθερή δομή και από πηκτή που σχηματίζεται από πηκτίνη-ζάχαρη-οξύ. Συνεπώς, σε αυτό τον τύπο πηκτής γίνεται προσθήκη ασβεστίου και όχι ζάχαρης και οι πηκτίνες με χαμηλό βαθμό μεθοξυλίωσης χρησιμοποιούνται στην παραγωγή διαιτητικών γλυκισμάτων (Α. Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη 2003).

#### 2.4.4 Διατροφική αξία πηκτίνης

Οι πηκτίνες ανήκουν στην κατηγορία διαλυτών μη πεπτικών φυτικών ινών, οι οποίες δεν απορροφούνται και δεν μεταβολίζονται από τον άνθρωπο διότι δεν διαθέτει κατάλληλα ένζυμα αποικοδόμησης. Το ενδιαφέρον γύρω από τις διαλυτές φυτικές είναι τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί λόγω των οφελών που έχουν για την υγεία. Οι διαλυτές φυτικές ίνες δημιουργούν τζελ στο λεπτό και παχύ έντερο και δεσμεύουν την λιποπρωτεΐνη LDL η ως γνωστόν κακή χοληστερόλη αλλά και την ολική χοληστερόλη και δεν επιτρέπουν την απορρόφησή τους. Ακόμη, οι πηκτίνες αυξάνουν τον όγκο σε ένα τρόφιμο λόγω της απορρόφησης νερού και αυτό έχει σαν συνέπεια να προκαλεί γρήγορα κορεσμό με λιγότερες θερμίδες συμβάλλοντας έτσι στον έλεγχο βάρους. Τέλος, διάφορες μελέτες θεωρούν πως οι πηκτίνες έχουν ευεργετική δράση έναντι παθήσεων του κατώτατου πεπτικού συστήματος (διάρροια, δυσκοιλιότητα) καθώς καλύπτουν επιφάνειες του εντέρου απορροφώντας τοξικές ουσίες και κάνοντας το περιβάλλον πιο γλιστερό για καλύτερη απέκκριση μειώνοντας έτσι και την πιθανότητα καρκίνων του παχέος εντέρου (Α.Γ. Χρόνη 2020).

#### 2.4.5 Βιομηχανικές εφαρμογές πηκτίνης

Η πηκτίνη ως πρόσθετο, χρησιμοποιείται σε πολλά τρόφιμα με τον κωδικό E440 και έχει ρόλο σταθεροποιητή, γαλακτωματοποιητή και πυκνωτικού μέσου. Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω οι πηκτίνες χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση τον βαθμό εστεροποίησης (Degree of Esterification, DE, %) που ορίζεται ως το ποσοστό



των εστεροποιημένων καρβοξυλομάδων στο μόριο μιας πηκτίνης και αποτελεί το σημαντικότερο μέγεθος για κατάταξη των πηκτινών. Έτσι λοιπόν χωρίζονται σε δύο κατηγορίες : σε πηκτίνες χαμηλής μεθοξυλίωσης < 50% που απαιτούν ασβέστιο για να σχηματίσουν πηκτή και επομένως χρησιμοποιούνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως οι κρέμες στιγμής και σε πηκτίνες υψηλής μεθοξυλίωσης > 50% οι οποίες χρειάζονται νερό και όξινο περιβάλλον και επομένως αξιοποιούνται στην παραγωγή μαρμελάδων, πελτέδων, ζελέδων και πολτών φρούτων. Πέραν της χρήσης τους στην βιομηχανία τροφίμων, οι πηκτίνες, λόγω των υποσχόμενων ευεργετικών ιδιοτήτων που φαίνεται να έχουν χρησιμοποιούνται και σε συμπληρώματα διατροφής αλλά και σε φάρμακα που αφορούν την πέψη και την κινητικότητα του εντέρου (Kazemi et al., 2019). Τέλος, τα τελευταία χρόνια οι πηκτίνες χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βιοφίλμ τα οποία θα επικαλύπτουν κυρίως τρόφιμα αλλά και θα λειτουργούν ως μέσα ενθυλάκωσης ουσιών με ευεργετικές ιδιότητες, κάτι στο οποίο θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση σε παρακάτω κεφάλαιο.

#### 2.4.6 Μελέτες περίπτωσης απομόνωσης πηκτινών από πορτοκάλια

##### 1<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Το άρθρο των (Zhongdong et al., 2006) μελετάει την παραγωγή πηκτινών από την φλούδα πορτοκαλιού μέσω χρήσης μικροκυμάτων καθώς θεωρείται ότι η συμβατική μέθοδος όξινης εκχύλισης υπό υψηλή θερμοκρασία προκαλεί αλλοιώσεις στο περιεχόμενο των πηκτινών. Ο τελικός έλεγχος των πηκτινών αλλά και η αξιολόγηση της διαδικασίας έγινε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM).

Υλικά και μέθοδοι :

- Πορτοκάλια από σουπερμάρκετ περιοχής
- Αιθυλική αλκοόλη 95%
- Απόλυτη αιθανόλη
- Υδατική γλουταραλδεΐδη 50% (w/v)
- Ωσμικό οξύ και οξικό ισοαμύλιο
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή SEM μάρκας Hitachi
- Συσκευή AFM της Digital Instruments

Μεθοδολογία :

### 1) Εκχύλιση πηκτινών :

Δείγμα 200gr από φλούδα πορτοκαλιού εμβαπτίστηκε σε διάλυμα όξινου θεικού νατρίου 0,3% w/v για 30 λεπτά και έπειτα ξεπλύθηκε με καθαρό νερό και τοποθετήθηκε για ξήρανση. Αφού ξηράθηκε, βυθίστηκε σε νερό (100ml) και το pH ρυθμίστηκε στο 2 με διάλυμα HCL 0,5M και παρέμεινε έτσι για 10 λεπτά. Αφού πέρασε ο χρόνος, το δείγμα μαζί με το υγρό τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στους 85°C για 5 λεπτά. Μετέπειτα το υγρό φιλτραρήθηκε και αφέθηκε να κρυσταλλώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστέθηκε κορεσμένο υδατικό διάλυμα  $Al_2(SO_4)_3$  50ml και διάλυμα αμμωνίας και το pH έγινε 4. Αυτό το διήθημα αναδεύτηκε για μισή ώρα και αφέθηκε σε ηρεμία ώστε να σχηματιστεί τζελ πηκτίνης-υδροξειδίου του αργιλίου το οποίο συλλέχτηκε με φυγοκέντριση. Το τζελ πλύθηκε με καθαρό νερό και στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια η πηκτική επεξεργάστηκε με οξινομένη αιθυλική αλκοόλη, διηθήθηκε με φίλτρο άμμου, πλύθηκε με 60% αιθανόλη και αφυδατώθηκε μέσω εμβάπτισης σε απόλυτη αιθανόλη όγκου 1000ml και στέγνωσε στους 50°C.

### 2) Προετοιμασία δειγμάτων για SEM και AFM :

Έγινε χρήση δειγμάτων ακέραιας φλούδας, δείγμα φλούδας που έχει επεξεργαστεί με τον κλασσικό τρόπο όξινης υδρόλυσης με θέρμανση και δείγμα φλούδας επεξεργασμένο με τα μικροκύματα. Και τα τρία δείγματα αφυδατώθηκαν και επιμεταλλώθηκαν με χρυσό ώστε να γίνει η σάρωση.

#### Αποτελέσματα :

Από την SEM φαίνεται ότι η επίδραση των μικροκυμάτων είναι πιο έντονη στην διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος της φλούδας με αποτέλεσμα η εκχύλιση πηκτίνης να είναι μεγαλύτερη μέσω κατεργασίας με μικροκύματα. Ωστόσο από την AFM τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά. Φάνηκε πως η πηκτίνη που εκχυλίστηκε μέσω μικροκυμάτων έχει αλλοιωθεί στην δομή, είναι σπασμένη και έχει σχηματίσει κρυστάλλους, ενώ πηκτίνη που έχει παραληφθεί με την κλασσική μέθοδο είναι πιο συμπαγής και διατηρεί πλέγμα.

#### 2<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Ο κύριος στόχος της μελέτης των (Prakash Maran et al., 2013) είναι η ανάπτυξη μίας διεργασίας εκχύλισης πηκτίνης από φλούδες πορτοκαλιού μέσω επίδρασης

μικροκυμάτων υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για μέγιστη απόδοση στην εκχύλιση πηκτινών. Κατά την εργασία αυτή έγινε ο σχεδιασμός ενός διαγράμματος ροής τύπου Box-Behnken το οποίο καταγράφει τις διεργασίες και τα προϊόντα της κάθε μίας, ώστε να μπορεί ο ερευνητής να αξιολογεί το κάθε σημείο της διεργασίας ξεχωριστά επεμβαίνοντας όποτε χρειαστεί.

Υλικά :

Πορτοκάλια αγοράστηκαν από την τοπική αγορά της Ινδίας και ξεφλουδίστηκαν. Οι φλούδες αφαιρέθηκαν, ψιλοκόπηκαν και στέγνωσαν σε φούρνο με αέρα στους 60°C μέχρι να φύγει το νερό. Στην συνέχεια οι φλούδες αλέστηκαν και κοσκινίστηκαν σε κόσκινο 40 mesh. Η σκόνη αποθηκεύτηκε σε σακουλάκι και διατηρήθηκε σε ξηρό περιβάλλον.

Εκχύλιση πηκτινών :

Περίπου 1g σκόνης τοποθετήθηκε σε κάθε ποτήρι ζέσεως της διεργασίας. Τα ποτήρια ήταν τόσα όσοι και οι συνδυασμοί που προέκυψαν από τις μεταβαλλόμενες συνθήκες. Οι παράμετροι αξιολόγησης είναι τρεις : pH, watt, time. Με τρεις τιμές η κάθε παράμετρος οπότε τα δείγματα είναι 3<sup>3</sup> άρα 27. Οι τιμές που έλαβε το pH είναι 1, 1.5, 2, οι τιμές της ισχύος είναι 160, 320, 480 watt αντίστοιχα και ο χρόνος επίδρασης των μικροκυμάτων είναι 60, 120 και 180 λεπτά. Το pH μειώθηκε μέσω θεικού οξέος. Τα ποτήρια αυτά τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό του φούρνου μικροκυμάτων με συχνότητα 2450MHz. Αφού τελείωσε η θέρμανση τα ποτήρια αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και το υγρό διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί. Το διήθημα φυγοκεντρίθηκε και το υπερκείμενο κατακρημνίστηκε με ίσο όγκο αιθανόλης 95%. Το τζελ που σχηματίστηκε πλύθηκε 3 φορές με αιθανόλη 95% για να απομακρυνθούν πλήρως οι μονο και δι-σακχαρίτες. Η τζελ αυτό ουσιαστικά είναι υγρή πηκτίνη και τοποθετήθηκε για ξήρανση στους 50°C υπό θερμό αέρα μέχρι να φύγει το υγρό (νερό και αιθανόλη) και ζυγίστηκε ώστε να βρεθεί η απόδοση σε πηκτίνη μέσω του τύπου :  $P=(m0/m)*100$  όπου m0 ξηρή πηκτίνη σε g και m σκόνη φλούδας.

Επίδραση συνθηκών :

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερη η ισχύς των μικροκυμάτων τόσο περισσότερη πηκτίνη εκχυλίζεται που είναι λογικό διότι η αυξημένη ισχύς προκαλεί μεγαλύτερη διάρρηξη των κυττάρων και επομένως μεγαλύτερη επαφή του

διαλύτη εκχύλισης με τις πηκτίνες. Όσον αφορά τον χρόνο θέρμανσης στα μικροκύματα, έγινε ξεκάθαρο πως όσο μεγαλύτερος ο χρόνος θέρμανσης τόσο μεγαλύτερη η απόδοση σε πηκτίνη. Τέλος όσον αφορά το pH και την ποσότητα του διαλύτη εκχύλισης, το χαμηλότερο pH δίνει μεγαλύτερες αποδόσεις ενώ όσο μεγαλύτερη η ποσότητα υγρού διαλύτη η εκχύλιση πηκτίνης αυξάνεται λόγω διόγκωσης των κυττάρων από το υγρό και συνεπώς εύκολης διάρρηξής τους.

### 3<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Σκοπός του αρθρογράφου (Yousuf et al., n.d.) ήταν η χρήση υπερήχων με σκοπό την εκχύλιση πηκτινών από φλούδες πορτοκαλιού ως μία καινοτόμα μέθοδος έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης. Εώς και τώρα ο συμβατικός τρόπος εκχύλισης πηκτινών σε βιομηχανική κλίμακα αφορούσε την χρήση διαλύματος οξέων υπό θέρμανση για μεγάλη χρονική διάρκεια ώστε οι πηκτίνες να εκχυλιστούν μέσα στο διάλυμα. Αυτή η μέθοδος είναι πολύ ενεργοβόρα διότι απαιτεί ενέργεια για την θέρμανση του διαλύματος είτε ηλεκτρική είτε ενέργεια μέσω καυσίμων. Ακόμη κι αν γίνει χρήση βίο-καυσίμων τα οποία προέρχονται από απόβλητα τροφίμων, όπως προαναφερθήκαμε παραπάνω, οι εκπομπές αερίων που προκαλούν το φαινόμενο του θερμοκηπίου είναι τεράστιες και δημιουργούν ακατάλληλο εργασιακό περιβάλλον. Οι υπέρηχοι έχουν δείξει ότι αποδεδειγμένα μειώνουν τον χρόνο εκχύλισης της πηκτίνης και μεγιστοποιούν την απόδοση συγκριτικά με την παραδοσιακή μέθοδο.

#### Διαδικασία :

Οι ερευνητές συγκέντρωσαν φλούδες πορτοκαλιών τις οποίες αφυδάτωσαν υπό θέρμανση και τις άλεσαν σε σκόνη. Μετέπειτα, φτιάξαν 3 διαλύματα κιτρικού οξέος όγκου 200ml τα οποία είχαν pH 1, 1.5, και 2 αντίστοιχα. Στην συνέχεια 10gr σκόνης τοποθετήθηκαν σε κάθε διάλυμα εκ των τριών και υποβλήθηκαν σε υπερήχους για 10 λεπτά το διάλυμα με pH 1, για 20 λεπτά το διάλυμα με pH 1.5 και για 30 λεπτά το διάλυμα με pH 2 με αντίστοιχη ισχύ υπερήχων 80, 90 και 100%. Αφού σταμάτησε η ultrasound εκχύλιση τα διαλύματα αφαιρέθηκαν μπήκαν στο ψυγείο για ψύξη και φυγοκεντρίθηκαν στα 30 λεπτά στις 6000rpm με σκοπό να φύγουν τα χοντρά κομμάτια φλούδας που έχουν παραμείνει. Έπειτα, μέσα στα διηθήματα έγινε προσθήκη ίσου όγκου προπανόλης οι οποία δεσμεύει τις πηκτίνες στην επιφάνεια. Το υγρά διηθήματα με προπανόλη διαχωρίστηκαν εκ νέου με διήθηση και οι πηκτίνες που παρέμειναν εισήλθαν για ξήρανση στους 45°C. Οι πηκτίνες απομονώθηκαν και αλέστηκαν.

Απόδοση σε πηκτίνη :

Ο τύπος που μας δίνει το ποσοστό απόδοσης σε πηκτίνη από πρώτη ύλη είναι ο εξής :

$$\text{Pectin Yield \%} = (x/y) * 100$$

Όπου x η ποσότητα ξηρής πηκτίνης στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας και y η αρχική ποσότητα σκόνης φλούδας πορτοκαλιού. Από τα αποτελέσματα της ερευνητικής διαδικασίας φάνηκε πως οι καλύτερες συνθήκες για παραλαβή πηκτίνης είναι 30 λεπτά υπέρηχοι με 100% ισχύ σε pH 1.5 και δίνει 20,92% απόδοση σε πηκτίνη.

#### 4<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης :

Οι συγγραφείς (Patience et al., 2021) μελέτησαν την εκχύλιση πηκτίνης από φλούδες πορτοκαλιού μέσω χρήσης συνεχών υπερήχων αλλά και παλμικό υπερήχων ως μία εναλλακτική μέθοδο εκχύλισης. Ο υπέρηχος επιταχύνει την διαδικασία της εκχύλισης μειώνοντας τον χρόνο επεξεργασίας μέσω μικροσκοπικής και μακροσκοπικής ανάμειξης του οξέος που είναι ο εκχυλιτής και των πηκτινών που είναι η ουσία που θέλουμε να εκχυλιστεί, λόγω ακουστικής σπηλαίωσης που προκαλείται στο κυτταρικό τοίχωμα του φυτικού ιστού προκαλώντας κατάρρευση. Πιο συγκεκριμένα η σπηλαίωση είναι η δημιουργία φυσαλίδων και κοιλοτήτων οι οποίες σπάνε εκλύοντας ενέργεια που καταστρέφει το τοίχωμα κυττάρων.

Πλεονεκτήματα υπερήχων :

Ο υπέρηχος αποτελεί μία πράσινη τεχνολογία η οποία μειώνει τον χρόνο αντίδρασης των αντιδράσεων και αυξάνει την επιλεκτικότητά τους. Ακόμη, ο υπέρηχος επιταχύνει πολύ την μεταφορά μάζας χωρίς να προκαλεί αλλοιώσεις στα τρόφιμα διατηρώντας ακέραια την ποιότητά τους. Στα φρούτα και λαχανικά η σπηλαίωση που προκαλεί μικροπίδακες στην επιφάνεια του φυτικού ιστού που σπάζουν το κυτταρικό τοίχωμα με διευκόλυνση εισαγωγής του διαλύτη στο εσωτερικό και έτσι διευκολύνεται η απελευθέρωση πηκτίνης. Η χρήση υπερήχων είναι ικανή να σκοτώσει τα βακτήρια και μας επιτρέπει να μειώσουμε την θερμοκρασία σε πολλές διεργασίες. Άρα λοιπόν μέσω χρήσης υπερήχων, μειώνονται τα ενεργειακά κόστη και δαπάνες αλλά και ενισχύεται οι αιφόρος ανάπτυξη.

Πειραματική διαδικασία :

Οι ερευνητές αγόρασαν όλα τους τα πορτοκάλια από ένα συγκεκριμένο μαγαζί ώστε να μειώσουν τις διαφορές μεταξύ των καρπών και να είναι όσο το δυνατόν παρόμοια. Τα πορτοκάλια ξεφλουδίστηκαν και οι φλούδες στέγνωσαν σε φούρνο στους 50°C για μία μέρα. Έπειτα οι αποξηραμένες φλούδες αλέστηκαν σε σκόνη με την βοήθεια ενός μύλου για καφέ και κοσκινίστηκαν σε μεγέθη από 300μm έως 75μm. Ποσότητα σκόνης ανακατεύτηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία στερεού από 1/30 έως 1/50 στερεό προς υγρό με το 1/50 να είναι το βέλτιστο. Παράλληλα φτιάχτηκε ένα πρότυπο διάλυμα νιτρικού οξέος με συγκέντρωση 70%. Σταγόνες από το διάλυμα νιτρικού οξέος ρίχνονταν μέσα στο 1/50 διάλυμα σκόνης στο οποίο είχε εμβαπτιστεί ένα πεχάμετρο και μόλις το pH έπεσε μεταξύ 2-3 η προσθήκη οξέος σταμάτησε και το υγρό αναδεύτηκε με μαγνήτη στα 500rpm περίπου. Το επόμενο και πιο σημαντικό βήμα ήταν η χρήση υπερήχων ώστε να εκχυλιστεί η πηκτίνη στο οξύ. Οι ερευνητές της εργασίας αυτής χρησιμοποίησαν μία κόρνα υπερήχων με στόμιο 13mm σε διάφορα ποσοστά ισχύος με χρήση παλμών είτε με συνεχή υπέρηχο. Οι παλμοί ρυθμίστηκαν σε 2-3 κύκλους ίδιας συχνότητας. Αφού γίνει η εκχύλιση το υγρό περνάει από διήθηση υπό κενό μέσω μίας διάταξης Erlennmeyer για να επιταχυνθεί η διαδικασία καθαρισμού από στερεά κομμάτια της φλούδας. Στο διηθημένο υγρό έγινε προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 95% και τοποθετήθηκε στο ψυγείο στους 4°C για να ανέβουν οι πηκτίνες στην επιφάνεια. Οι πηκτίνες διαχωρίστηκαν από το υγρό μέσω φυγοκέντρισης και πλύθηκε 3 φορές με αιθανόλη και ξανά φυγοκέντριση για μεγαλύτερο καθαρισμό. Τέλος, οι πηκτίνες στέγνωσαν στους 40°C έως ότου γίνουν στερεές.

Αποτελέσματα :

Η μελέτη αυτή έδειξε αρχικά πως βέλτιστη αναλογία νερού-στερεού για μεγαλύτερη απόδοση σε πηκτίνη είναι 1/50 στερεό προς υγρό. Ακόμη παρατηρήθηκε πως η χρήση παλμών κατά την επίδραση υπερήχων δίνει μηδαμινή διαφορά στην παραγωγή πηκτίνης σε ποσοστό μόλις 1.3% περισσότερο. Ωστόσο η παλμική συχνότητα είναι πιο αποτελεσματική μακροσκοπικά διότι καταναλώνει λιγότερη από την μισή ενέργεια που απαιτείται στους συνεχούς υπερήχους. Τέλος η χρήση στατιστικού μοντέλου με  $R^2$  να είναι 95.5%, επιβεβαίωσε πως η απόδοση αυξάνεται αναλογικά με το πλάτος υπερήχου/δυναμική πυκνότητα ισχύος αλλά και με την μείωση pH.

### 3. Μύκητες

#### 3.1 Εισαγωγή

Οι μύκητες (fungi) συγκροτούν ένα μεγάλο άθροισμα ευκαρυωτικών μη-φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που ταξινομούνται στα φύλα Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota και Basidiomycota. Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται υπό αερόβιες συνθήκες και παράγουν ενέργεια μέσω οξειδωσης οργανικών υποστρωμάτων. Κάποια είδη μυκήτων όπως ο γνωστός σε όλους μας *Saccharomyces cerevisiae* είναι προαιρετικά αναερόβια ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί και αναερόβιοι μύκητες στο εντερικό σύστημα των μηρυκαστικών. (Γ. Αγγελής, 2017).

#### 3.2 Χαρακτηριστικά Μυκήτων

Η ταυτοποίηση των βλαστικών μορφών μυκήτων περιλαμβάνει βιοχημικές δοκιμασίες παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Ωστόσο, οι πολυκύτταροι μύκητες ταυτοποιούνται με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών και τα σπόρια τα οποία συντελούν στην αναπαραγωγή τους. Οι αποικίες των μυκήτων χαρακτηρίζονται ως βλαστικές δομές επειδή αποτελούνται από κύτταρα που συμμετέχουν στον καταβολισμό και στην ανάπτυξη του μύκητα. Οι μύκητες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, στους υφομύκητες και στους ζυμομύκητες.

Στους υφομύκητες, ο θαλλός, δηλαδή το κυρίως σώμα του μύκητα αποτελείται από μακριές ίνες κυττάρων οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους και ονομάζονται υφές. Οι υφές των περισσότερων υφομυκήτων έχουν εγκάρσια τοιχώματα που ονομάζονται διαφραγμάτια τα οποία διαιρούν τις υφές σε μονοκυτταρικές μονάδες. Σε πολλές περιπτώσεις όπου οι υφές δεν περιέχουν διαφραγμάτια τότε αυτές εμφανίζονται ως μακριές με συνεχή κύτταρα υφές που ονομάζονται κοινοκυτταρικές. Οι υφές αυξάνονται σε μέγεθος μέσω επιμήκυνσης των άκρων τους, όπου κάθε κομμάτι υφής έχει ικανότητα αυξηθεί. Έτσι, κάθε υφή όταν χάσει κάποιο κομμάτι της, αυτό μπορεί να επιμηκυνθεί και να σχηματίσει νέα υφή. Οι θρεπτικές ουσίες που τρέφουν τον υφομύκητα επεξεργάζονται στο τμήμα της βλαστικής υφής, ενώ το τμήμα που ευθύνεται για την αναπαραγωγή του μύκητα ονομάζεται αναπαραγωγική ή αλλιώς αναέρια υφής καθώς ξεπροβάλλει στην επιφάνεια και συνήθως περιλαμβάνει τα σπόρια του μύκητα. Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ιδανικές οι υφές θα αυξηθούν

σχηματίζοντας μία μάζα η οποία καλείται μυκητύλλιο το οποίο είναι ορατό με γυμνό μάτι. (Α. Τσακρής, 2016).

Αντίθετα, οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι μύκητες με χαρακτηριστικό σφαιρικό σχήμα και δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν υφές. Είναι ευρέως διαδεδομένοι στην φύση και σχηματίζουν λευκή επίστρωση που μοιάζει με σκόνη επάνω σε οργανική ύλη όπως φρούτα και φύλλα. Μερικά είδη ζυμομυκήτων μπορούν να αναπαραχθούν και με εκβλάστηση. Κατά την εκβλάστηση το γονεϊκό κύτταρο δημιουργεί μία προεκβολή στην εξωτερική επιφάνεια. Ο πυρήνας του γονεϊκού κυττάρου αυξάνεται και διαιρείται σε έναν νέο δευτερο πυρήνα ο οποίος μεταναστεύει στην ολοένα και αυξανόμενη προεκβολή. Όταν ο πυρήνας εισέλθει με επιτυχία στην εκβλάστηση, τότε αυτή διαχωρίζεται και δημιουργείται ένα νέο κυτταρικό τοίχωμα. Το κύτταρο ενός ζυμομύκητα μπορεί να παράγει έως 24 θυγατρικά κύτταρα με την διαδικασία της εκβλάστησης. Κάποιες εκβλαστήσεις δεν αποχωρίζονται από το γονεϊκό κύτταρο και συνεχίζουν να παραμένουν σε αυτό και ονομάζονται ψευδοϋφές. Ένα είδος ζυμομυκήτων, οι σχιζομύκητες διαιρούνται επ ακριβώς σε δύο ίσα μέρη και παράγονται δύο νέα ίσα κύτταρα. Κατά την διαίρεση, το αρχικό κύτταρο επιμηκύνεται σε μέγεθος και ο πυρήνας του διχοτομείται στην μέση και έτσι παράγονται δύο θυγατρικά κύτταρα. Οι αποικίες αυτών των μυκήτων είναι οπτικά παρόμοιες με τις αποικίες των βακτηρίων (Α. Τσακρής, 2016).

Οι ζυμομύκητες έχουν την ικανότητα της προαιρετικά αναερόβιας ανάπτυξης. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε το οξυγόνο, είτε μία οργανική ένωση ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας. Πρόκειται για μία πολύτιμη ιδιότητα, διότι επιτρέπει στους μύκητες να επιζούν προσαρμόζοντας τις μεταβολικές τους ανάγκες αναλόγως του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται. Εάν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο, οι μύκητες θα στραφούν σε αερόβια αναπνοή για να μεταβολίσουν τους υδατάνθρακες προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Όταν όμως υπάρχει έλλειψη οξυγόνου, τότε θα επέλθει ζύμωση των υδατανθράκων με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων κάποια οργανική ένωση συνήθως του πυροσταφυλικού το οποίο θα γίνει αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Α. Τσακρής, 2016).

### 3.3 Αναπαραγωγή Μυκήτων

Οι υφομύκητες μπορούν να αναπαραχθούν σεξουαλικά με κατακερματισμό των υφών τους. Επιπλέον οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν σεξουαλικά και ασεξουαλικά



μέσω σχηματισμών σπορίων. Όταν ένας μύκητας σχηματίσει σπόρια, αυτά αποσυνδέονται από το κύτταρο και βλαστάνουν παράγοντας νέους μύκητες. Τα σπόρια διαμορφώνονται στις υφές με διάφορους τρόπους, αναλόγως το είδος του μύκητα. Αυτά μπορούν να προκύψουν είτε σεξουαλικά είτε ασεξουαλικά. Τα ασεξουαλικά σπόρια σχηματίζονται στις εναέριες υφές του μύκητα και όταν βλαστάνουν σχηματίζονται μύκητες που είναι γενετικά πανομοιότυποι με το γονεϊκό κύτταρο. Αντίθετα, τα σεξουαλικά σπόρια, προκύπτουν από συνένωση των πυρήνων των δύο στελεχών μύκητα του ίδιου είδους. Επομένως τα σπόρια αυτά θα περιέχουν γενετικό υλικό και από τα δύο στελέχη και οι μύκητες που θα προκύψουν θα έχουν χαρακτηριστικά και των δύο (Α. Τσακρής, 2016).

### 3.4 Κατηγορίες σπορίων

#### 3.4.1 Ασεξουαλικά σπόρια

Τα ασεξουαλικά σπόρια είναι απότοκα της μιτωτικής διαίρεσης ενός μύκητα. Δεν παρατηρείται σύντηξη πυρήνων. Οι μύκητες έχουν την δυνατότητα να παράγουν δύο τύπους ασεξουαλικών σπορίων. Ο ένας τύπος είναι τα κονιδιοσπόρια ή κονίδια τα οποία πρόκειται για μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα σπόρια που δεν περιλαμβάνονται από σάκο. Τα κονίδια σχηματίζονται στο άκρο ενός κονιδιοφόρου ως μία μικρή αλυσίδα. Τα κονίδια τα οποία προέρχονται από υφές που φέρουν διαφραγμάτια ονομάζονται αρθροκονίδια. Τα βλαστοκονίδια προέρχονται από εκβλαστήσεις γονεϊκών κυττάρων. Τα γλαμυδοκονίδια είναι σπόρια με παχύ τοίχωμα και σχηματίζονται από διόγκωση και στρογγυλοποίηση ενός τμήματος μιας υφής. Ένας άλλος τύπος μη σεξουαλικών σπορίων είναι τα σποραγγειοσπόρια, που σχηματίζονται μέσα σε σποραγγειοφόρα (Α. Τσακρής, 2016).

#### 3.4.2 Σεξουαλικά σπόρια

Τα σεξουαλικά σπόρια προκύπτουν από την σεξουαλική αναπαραγωγική η οποία συνίσταται από τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση καλείται πλασμογαμία. Σε αυτή την φάση ένας απλοειδής πυρήνας κυττάρου δότη διαπερνά το κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου δέκτη. Η δεύτερη φάση είναι η πυρηνογαμία, όπου ο πυρήνας του δότη και ο πυρήνας του δέκτη ενώνονται και σχηματίζουν έναν διπλοειδή πυρήνα. Η τρίτη και τελευταία φάση είναι η φάση της μείωσης, όπου ο διπλοειδής πυρήνας διαιρείται σε απλοειδείς πυρήνες οι οποίοι είναι γενετικώς ανασυνδυασμένοι. Τα φύλα των μυκήτων χαρακτηρίζονται από τα σεξουαλικά σπόρια τους, ενώ η μικροσκοπική παρατήρηση σε εργαστηριακό επίπεδο βασίζεται στην παρατήρηση ασεξουαλικών σπορίων καθώς δεν

είναι δυνατή η παραγωγή σεξουαλικών σπορίων, ειδικότερα στα παθογόνα στελέχη μυκήτων (Α. Τσακρής, 2016).

### 3.4.3 Διατροφικές προσαρμογές

Οι μύκητες είναι σε θέση να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα που δεν μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια. Πρόκειται για χημειοετερότροφους οργανισμούς οι οποίοι καταναλώνουν έτοιμες πηγές άνθρακα για να παράγουν ενέργεια. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά στα οποία διαφέρουν οι μύκητες από τα βακτήρια είναι πως αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλον με pH γύρω στο 5, μία τιμή απαγορευτική για τα περισσότερα βακτήρια. Επιπλέον, η πλειοψηφία των υφομυκήτων είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί ενώ οι ζυμομύκητες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Ακόμη, οι μύκητες παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην ωσμωτική πίεση και επομένως μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα με μεγάλη περιεκτικότητα στερεών, όπως πχ σάκχαρα και λιγότερη ποσότητα σε νερό, καθιστώντας τους ικανούς να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με χαμηλή υγρασία εν αντίθεση με τα βακτήρια. Όσον αφορά την πηγή αμινοξέων και γενικότερα αζώτου, οι μύκητες χρειάζονται εμφανώς λιγότερο άζωτο από τα βακτηρία και τέλος μπορούν να μεταβολίσουν σύνθετους πολυμερείς υδατάνθρακες όπως η λιγνίνη στο ξύλο, ενώ τα περισσότερα βακτήρια δεν έχουν αυτή την ικανότητα (Α. Τσακρής, 2016).

## 4. Μανιτάρια

### 4.1 Εισαγωγή

Τα μανιτάρια πρόκειται για κάποιες ομάδες Βασιδιομυκήτων και Ασκομυκήτων οι οποίες διακρίνονται περιγραφικά ως μακρομύκητες οι οποίοι φέρουν καρπόσωμα επίγειο ή υπόγειο και αρκετά μεγάλο μέγεθος ώστε να μπορεί να διακριθεί με γυμνό μάτι και να συλλεχθεί με το χέρι. Υπάρχουν περισσότερα από 56.000 είδη μακρομυκήτων και η αναλογία είδη φυτών ανά είδη μακρομυκήτων υπολογίζεται περίπου στο 1/53.000 με 1/110.000 (He et al., 2022). Τα μανιτάρια για πολλά χρόνια προτιμώνται ως λιχουδιές για κατανάλωση στην ανθρώπινη διατροφή καθώς έχουν πολύ μεγάλη θρεπτική αξία που οφείλεται τόσο στο αυξημένο περιεχόμενο πρωτεΐνης αλλά και στην ύπαρξη β-γλυκανών οι οποίες είναι αποδεδειγμένο με ισχυρισμό υγείας ότι μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης. Συνεπώς τα μανιτάρια αποτελούν σημείο αναφοράς στην τεχνολογία τροφίμων για την παραγωγή νέων βελτιωμένων τροφίμων που θα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία και ευζωία των καταναλωτών. Ωστόσο υπάρχουν πολλά είδη μανιταριών τα οποία είναι επικίνδυνα εάν

καταναλωθούν από τον άνθρωπο λόγω τοξινών που περιέχουν και τα οποία ονομάζονται δηλητηριώδη μανιτάρια. Υπολογίζεται ότι τα δηλητηριώδη είδη μανιταριών είναι περίπου στα 1000 και θα πρέπει η συγκομιδή τους να γίνεται μόνο από γνώστες και όχι από άτομα χωρίς εμπειρία.

## 4.2 β-γλυκάνες

Οι β-γλυκάνες πρόκειται για πολυμερή της γλυκόζης. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη έχουν διακλαδισμένη δομή, μικρότερο μέγεθος και οι δεσμοί μεταξύ των μονάδων ποικίλουν. Οι ιδιότητες αυτές τους δίνουν την δυνατότητα να σχηματίζουν υδατικά διαλύματα με αυξημένο ιξώδες. Η ικανότητα αυτή συνδέεται άμεσα με την αποδεδειγμένη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και προκύπτει από τις επιδράσεις που προκαλεί στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, οι β-γλυκάνες σχηματίζουν ένα ζελάδες πλέγμα στο λεπτό έντερο μέσα στο οποίο παγιδεύεται η χοληστερόλη και μετέπειτα αποβάλλεται κατά την εκκένωση. Δεν είναι τυχαίο εξάλλου πως οι β-γλυκάνες έχουν λάβει ισχυρισμό διατροφής και υγείας και όταν ανευρίσκονται σε τρόφιμο πάνω από μία συγκέντρωση, τότε το τρόφιμο αυτό μπορεί να αναγράφει στην ετικέτα ότι είναι πηγή β-γλυκάνη που μειώνει την χοληστερόλη. Οι β-γλυκάνες αποτελούν κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των σπόρων βρώμης, κριθαριού αλλά και φυσικά των μανιταριών, όπου τα τελευταία τις έχουν ως συστατικό των κυττάρων τους, είτε τις εκκρίνουν εξωκυτταρικά στο περιβάλλον που ζούνε. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πηγή διαλυτών ινών, λόγω της επίδρασής τους στην γλυκαιμική, ινσουλιναϊκή και χοληστερολαιμική απόκριση και τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές υποστηρίζουν μέσω μελετών ότι έχουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Αυτή η κυρίως ιδιότητα, αλλά και η ιδιότητα σχηματισμού αλυσίδων αλλά και η πολική υδατοδιαλυτή φύση των β-γλυκανών έχει ανοίξει νέους δρόμους στην δημιουργία βρώσιμων φιλμ τροφίμων με αντιμικροβιακές ιδιότητες αλλά και με ιδιότητες θρεπτικής σημασία για τους καταναλωτές. (Α.Ε Κουτελιδάκης, 2019).

## 4.3 Μελέτες περιπτώσεις β-γλυκανών

### 4.3.1 Εκχύλιση β-γλυκανής από μανιτάρια

#### 1<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Στον παρών άρθρο (Ren et al., 2014) οι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση των εκχυλισμάτων οκτώ βρώσιμων μανιταριών στον περιορισμό της ανάπτυξης πέντε καλλιεργειών βακτηρίων αλλά και στην επίδραση ενάντια σε οξειδωτικές ρίζες. Η αντιβακτηριακή δράση μελετήθηκε μέσω καλλιέργειας των βακτηρίων σε τρυβλία

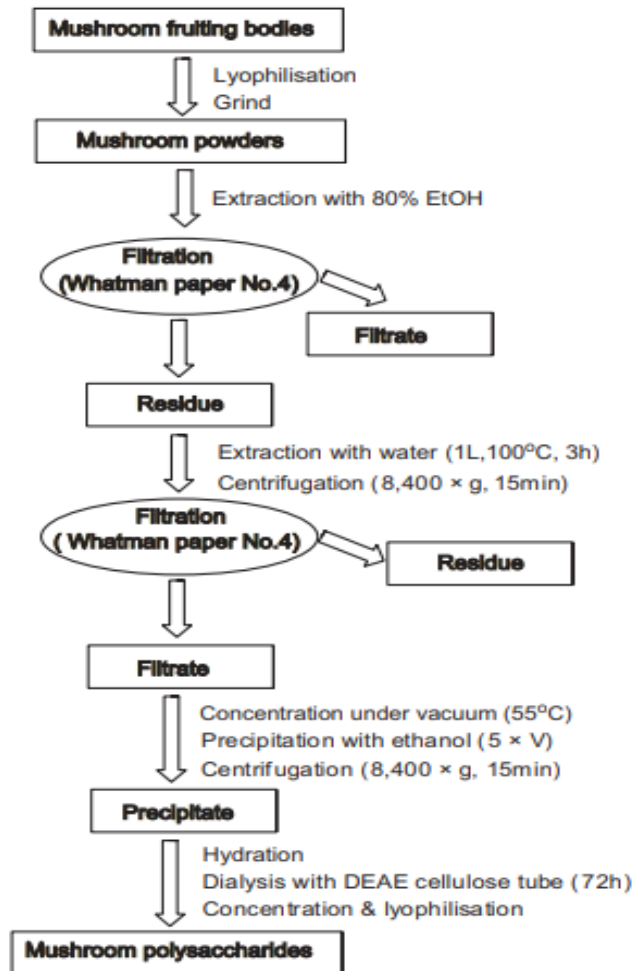
Petri μέσα στα οποία έχει γίνει διάχυση των εκχυλισμάτων. Τα εκχυλίσματα μανιταριών αποτελούνται κυρίως από β-γλυκάνη και επομένως αυτή η πειραματική εργασία μπορεί να δώσει μια εικόνα για την αντιμικροβιακή δράση της β γλυκάνης.

Υλικά και μέθοδοι :

Επιλέχθηκαν 8 είδη μανιταριών ώστε να αξιολογηθούν οι αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους. Τα τέσσερα εκ των οκτώ συλλέχθηκαν φρέσκα από δάση και πάρκα της Νέας Ζηλανδίας και είχαν αναπτυχθεί σε σάπια ξύλα. Τα υπόλοιπα 4 είδη αγοράστηκαν από σούπερ μάρκετ. Τέλος, αγοράστηκαν ελεύθερες ρίζες 1,1-διφαινυλο-2-πικρυδραζιλίου (DPPH) και βρωμιούχο κάλλιο (KBr).

Εκχύλιση πολυσακχαριτών :

Η μέθοδος εκχύλισης των υδατοδιαλυτών ουσιών είναι η εξής. Τα μανιτάρια καταψύχθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν ώστε να φύγει το νερό και αλέστηκαν για να γίνουν σκόνη βάρους 100g. Η σκόνη των 100g υπέστη μία πρώτη εκχύλιση με 150ml αιθανόλης 80% για μία ώρα, ώστε να απομακρυνθούν μικρά σε μέγεθος συστατικά της επιφανείας όπως μόνο, δι-σακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπίδια και φαινόλες. Αφού τελείωσε η πρώτη αυτή εκχύλιση το διήθημα που προέκυψε υπέστη υδατική εκχύλιση υπό ανάδευση στα 150rpm με μαγνητικό αναδευτήρα υπό βρασμό με αναλογία 1L νερού ανά 100g σκόνης για 3 ώρες. Μόλις τελείωσε ο βρασμός το διάλυμα φυγοκεντρίθηκε στα 8.400g για 15 λεπτά ώστε να διαχωριστεί το υγρό από τα στερεά υπολείμματα και διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί Whatman No.4. Το υπερκείμενο υγρό μετά την διήθηση συμπυκνώθηκε στα 10ml υπό κενό και σε αυτό προστέθηκαν 5 όγκοι αιθανόλης και τοποθετήθηκε για ψύξη στους 4°C για όλη τη νύχτα. Οι πολυσακχαρίτες που κατακρημνίστηκαν συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση και το ίζημα ξανά εκχυλίστηκε με απεσταγμένο νερό και διαπίδυση μέσω μεμβρανών κυτταρίνης DEAE μέσω αντιροής με απεσταγμένο νερό για 72 ώρες ώστε να συλλεχθούν και οι πολυσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους. Το υγρό συμπυκνώθηκε και λυοφιλοποιήθηκε. Τέλος τα εκχυλίσματα όλων των διαδικασιών διαλύθηκαν σε απεσταγμένο στείρο νερό και παρασκευάστηκαν δύο μητρικά διαλύματα με συγκέντρωση 3 και 15 mg/ml αντίστοιχα τα οποία αποστειρώθηκαν στους 90°C για 3 ώρες.



Εικόνα 4 Μεθοδολογία εκχύλισης πολυσακχαριτών

Βακτήρια – αντιβιοτικά :

Πέντε είδη βακτηρίων ελέγχθηκαν για αναστολή ανάπτυξης λόγω επίδρασης πολυσακχαριτών. Αυτά είναι τρία θετικά Gram (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*) και 2 Gram αρνητικά στελέχη (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και 2 αντιβιοτικά, η πενικιλίνη και η γενταμικίνη τα οποία διαλύθηκαν σε στείρο νερό σε συγκεντρώσεις 1,2 και 50 mg/ml.

Καλλιέργεια βακτηρίων :

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων ελέγχθηκε μέσω διάχυσης σε τρυβλίο με άγαρ. Επομένως τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας και το διάλυμα βακτηρίων προσαρμόστηκε με ένα αιματοκυτταρόμετρο στα 10<sup>8</sup> cfu/ml. Από το διάλυμα, κλάσματα 100μL εναιωρήματος απλώθηκαν επάνω στο τρυβλίο. Έπειτα,

χάρτινοι δίσκοι που είχαν εμποτιστεί σε εκχυλίσματα μανιταριών (3 ή 15mg/ml) τοποθετήθηκαν στα τρυβλία. Κάθε τρυβλίο Petri είχε από 6 χαρτάκια για να εξαλειφθούν τυχόν λάθη. Τα τρυβλία επώαστηκαν αρχικά στους 41°C ώστε να βοηθήσει την διάχυση των πολυσακχαριτών και μετά επώαστηκα στους 37°C για 24 ώρες. Η αντιβακτηριακή δράση αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου της ζώνη αναστολής γύρω από κάθε χαρτάκι. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα θετικών μαρτύρων ενώ 0,9% αλατούχο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Παράλληλα, η ευαισθησία των βακτηρίων εκτιμήθηκε και με την μέθοδο απλής μικροαραίωσης. Σε πλάκες με 96 διάκενα απλώθηκαν 100μL θρεπτικού ζωμού, 50μl εκχυλίσματος μανιταριών και 50μL βακτηριακού εναιωρήματος. Μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες η απορρόφηση στα 750nm από κάθε πλάκα εκτιμήθηκε ως προς την ανάπτυξη βακτηρίων μέσω σύγκρισης οπτικών πυκνοτήτων.

Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης :

Η δοκιμή αντιοξειδωτικής δράση πραγματοποιήθηκε σε πλάκα με 96 εσοχές ως εξής. Παρασκευάστηκαν διαλύματα τεσσάρων συγκεντρώσεων 10mg/ml, 5mg/ml, 2,5mg/ml και 1,25mg/ml. Σε κάθε διάκενο τοποθετήθηκαν 30μL από τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, υδατικό διάλυμα μεθανόλης που περιέχει ρίζες DPPH σε 80/20 αναλογία. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 60 λεπτά στο σκοτάδι. Η αξιολόγηση της μείωσης των ριζών εκτιμήθηκε μέσω απορρόφησης στα 515nm αλλά και από τον αποχρωματισμό του DPPH μέσω της εξίσωσης :

$$RSA_{\text{radical scavenging activity}} = [A_{\text{DPPH}} \cdot (A_M - A_E)] / A_{\text{DPPH}} \cdot 100$$

Όπου :

$A_{\text{DPPH}}$  : απορρόφηση διαλύματος DPPH

$A_M$  : απορρόφηση μίγματος DPPH και πολυσακχαριτών

$A_E$  : απορρόφηση μόνο διαλύματος πολυσακχαριτών

Αποτελέσματα και συζήτηση :

Αντιβακτηριακή δράση

Οι ανασταλτικές ιδιότητες τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των αντιβιοτικών διαφέρουν σημαντικά. Όλα τα εκχυλίσματα μανιταριών και στις δύο συγκεντρώσεις δηλαδή 3 και 15mg/ml απέτυχαν να δείξουν ανασταλτική δράση στην μέθοδο διάχυσης. Ωστόσο στην μέθοδο μικροαραίωσης παρατηρήθηκε αντιβακτηριακή δράση έναντι *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus epidermidis*. Τα αντιβιοτικά ήταν πιο αποτελεσματικά στην μέθοδο διάχυσης με χαρτάκια. Η πενικιλίνη με συγκέντρωση 1,2mg/gl έδειξε μόνο περιορισμό του *Staphylococcus epidermidis* ενώ η γενταμικίνη με συγκέντρωση 50mg/dl ήταν αποτελεσματική σε όλα τα βακτήρια εκτός το *Enterococcus faecalis*. Όσον αφορά την μέθοδο απλής μικροαραίωσης σχεδόν όλα τα βακτήρια είναι ευαίσθητα και στα δύο αντιβιοτικά με εξαίρεση την πενικιλίνη στο *Bacillus subtilis*. Επιπρόσθετα, αναστολή στα εκχυλίσματα μανιταριών έδειξε το *Bacillus subtilis* και ο *Staphylococcus epidermidis* που είναι Gram θετικά ενώ τα Gram αρνητικά είναι ανθεκτικά. Αυτό αποδίδεται στην επιπλέον φωσφολιπιδιακή μεμβράνη των Gram αρνητικών η οποία αποτελεί έναν έξτρα φραγμό στην είσοδο ουσιών αλλά σχηματίζει περιπλασματικό χώρο μέσα στον οποίο δρουν ένζυμα που προστατεύουν από ξένες ουσίες. Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης των εκχυλισμάτων ενάντια στα βακτήρια δεν υπάρχει μία σίγουρη εξήγηση. Εικάζεται πως οι πολυσακχαρίτες αλληλοεπιδρούν ιοντικά με την κυτταρική μεμβράνη και την διαταράσσουν ενώ παράλληλα εισβάλλουν στον χώρο του γενετικού υλικού προκαλώντας αλλοιώσεις στην δομή του.

#### Ελάχιστη συγκέντρωση εκχυλισμάτων

Ο υπολογισμός του MIC για τα εκχυλίσματα έδειξε 938μg/ml για το μανιτάρι *C.sinensis* έναντι *Bacillus subtilis* και 469μg/ml για το μανιτάρι *P.australis* έναντι *Bacillus subtilis* και *Staphylococcus epidermidis*. Η γενταμικίνη ήταν αποτελεσματική έναντι του *B.subtilis* με συγκέντρωση 0,39μg/ml ενώ η πενικιλίνη είχε MIC 37,5μg/ml για *B.subtilis* και *S.epidermidis*.

#### Αντιοξειδωτική ικανότητα :

Όλα τα εκχυλίσματα έδειξαν εξάρτηση από την συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών DPPH. Στα 10mg/ml τα ποσοστά καθαρισμού τεσσάρων εκχυλισμάτων (*A.cornea*, *C.gigantea*, *C.sinensis*, *L.edodes*) ήταν λιγότερο από 40%. Το *A.cornea* είχε το χαμηλότερο ποσοστό καθαρισμού με μόλις 26%. Το μέγιστο ποσό καθαρισμού ήταν 36% στα 5mg/ml για το *L.edodes*.

Ανακεφαλαίωση :

Εν κατακλείδι οι πολυσακχαρίτες του μανιταριού *C.sinensis* ανέστειλαν την ανάπτυξη του *B.subtilis* και του *S.epidermidis* ενώ οι πολυσακχαρίτες του *P.australis* ανέστειλαν την ανάπτυξη μόνο του *S.epidermidis* και σε μόνο μία μικροβιολογική δοκιμή καθώς η διάχυση με χάρτινα δισκάκια ήταν αρνητική. Επομένως, πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες και δοκιμές. Ιδιαίτερη σημασία ωστόσο πρέπει να δοθεί στο γεγονός πως τα εκχυλίσματα δεν λειτουργούν έναντι Gram αρνητικών κάτι το οποίο είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας καθώς μας δεσμεύει και για χρήση επιπλέον αντιμικροβιακών ουσιών. Τέλος, όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα έχουν κάποιες ικανοποιητικές ιδιότητες εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε αυτό το κομμάτι προστασίας τροφίμων από οξειδώσεις.

## 2<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Εισαγωγή :

Το mini review των (Jaros et al., 2018) εστιάζει στην παραγωγή και τις ιδιότητες των εξωπολυσακχαριτών που παράγονται από βασιδιομύκητες υπό βυθισμένη καλλιέργεια. Η ανασκόπηση αυτή συνοψίζει τις διαδικασίες καλλιέργειας και απομόνωσής των πολυσακχαριτών αλλά και τις ιδιότητες τους στην βιομηχανία των τροφίμων.

Καλλιέργεια μανιταριών :

Η ανάπτυξη μανιταριών από μικρά μικκύλια σε μεγάλα καρποσώματα απαιτεί αρκετό χρόνο, σύνθετα υποστρώματα και συγκεκριμένο περιβάλλον που παραπέμπει στο φυσικό τους οικοσύστημα. Ωστόσο η βυθισμένη καλλιέργεια των μικκυλίων είναι μία ελκυστική εναλλακτική για την παραγωγή βιομάζας και την απόκτηση μεταβολιτών υψηλής αξίας όπως οι εξωπολυσακχαρίτες. Αυτοί απελευθερώνονται είτε στο υγρό της ζύμωσης είτε βρίσκονται μέσα σε ζελάδη ουσία που περιβάλλει τα μικκύλια. Σχηματίζονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω δράσης πολλών ενζύμων. Οι εξωπολυσακχαρίτες είναι προϊόντα ύψιστης προστιθέμενης αξίας διότι έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι β-γλυκάνες οι οποίες αποτελούν τον κύριο έσω και έξω-πολυσακχαρίτη των μανιταριών και μπορούν να μειώσουν αποδεδειγμένα την χοληστερόλη αλλά και να προστατέψουν τα τρόφιμα από οξειδώσεις.



Μία βυθισμένη καλλιέργεια μανιταριών γίνεται συνήθως με χρήση τυπικών συστατικών όπως εκχύλισμα πατάτας, γλυκόζης, άγαρ, βύνη ως πηγές άνθρακα. Παράλληλα προστίθενται και πηγές αζώτου όπως πεπτόνη αλλά και μικροσυστατικά όπως ιχνοστοιχεία. Οι καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα συνήθως σε κωνικές φιάλες υπό συνεχή ανάδευση ώστε να εξασφαλιστεί αρκετή οξυγόνωση και καλή διαλυτότητα των συστατικών. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της καλλιέργειας ποικίλει και εξαρτάται από το στέλεχος. Ωστόσο το σύννηθες εύρος είναι θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 30°C και από 3 έως 18 ημέρες. Γενικότερα προτιμάται η χρήση γλυκόζης σε ποσότητες από 10-60g/L και πηγές αζώτου μπορεί να είναι είτε οργανικές είτε ανόργανες. Το pH της καλλιέργειας ρυθμίζεται μέσω ρυθμιστικών διαλυμάτων οξέων και βάσεων γύρω στο 4 με 6. Τα μικκύλια που αναπτύσσονται έχουν σχήμα είτε νηματώδες είτε είναι σε μορφή σφαιριδίων και οφείλεται κυρίως σε μηχανικές τάσεις που δέχονται οι καλλιέργειες εκτός φιάλης.

Απομόνωση και διαχωρισμός εξωπολυσακχαριτών :

Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την απομόνωση και των διαχωρισμό των εξωπολυσακχαριτών από άλλες ενώσεις της ζύμωσης. Αυτό το βήμα είναι άκρως απαραίτητο ώστε να γίνει ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων μεταβολιτών. Πρίν την απομόνωση απαιτείται η αφαίρεση της βιομάζας από τον ζυμό ζύμωσης. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω φυγοκέντρησης, είτε μέσω διήθησης υπό κενό. Μετέπειτα η βιομάζα ξεπλένεται και ξηραίνεται. Η απόδοση σε στερεά βιομάζα εξαρτάται κυρίως από το στέλεχος. Ο διαχωρισμός των εξωπολυσακχαριτών στα μη κυτταρικά συστήματα γίνεται με χρήση οργανικών διαλυτών και ψύξης που προκαλεί καθίζηση των πολυσακχαριτών. Τέτοιοι διαλύτες είναι η αιθανόλη η ακετόνη και προστίθενται σε ποσότητες 65-80%. Η καθίζηση γλυκανών ωστόσο απαιτεί 100% όγκο διαλύτη. Μετέπειτα μέσω φυγοκέντρησης χωρίζονται πλήρως οι πολυσακχαρίτες από το υγρό και κατακρημνίζονται εύκολα.

Υδατοδιαλυτότητα εξωπολυσακχαριτών :

Η υδατοδιαλυτότητα των εξωπολυσακχαριτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύνθεση των μονοσακχαριτών, την δομή και το μέγεθος των μορίων που σχηματίζονται. Η διαλυτότητα γενικώς μειώνεται με αύξηση του μοριακού βάρους της ουσίας αλλά μπορεί να βελτιωθεί με την χρήση αλάτων και ρυθμιστικών διαλυμάτων είτε ακόμα με διαφοροποιήσεις στην θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν

πως οι β-γλυκάνες από μανιτάρια *Pleurotus* διαλύονται εύκολα όταν γίνεται χρήση θειικού διμεθυλεστερά.

Τεχνολογικές ιδιότητες στα τρόφιμα :

Πολλές μελέτες αφιερωμένες στους εξωπολυσακχαρίτες έχουν αναδείξει την σημασία τους στην διατροφή και στην ιατρική γενικότερα. Οι β-γλυκάνες αλλά και οι γλυκομανάνες είναι διαιτητικές ίνες διότι δεν μπορούν να μεταβολιστούν στο λεπτό έντερο και επομένως διατηρούν τις ωφέλιμες ιδιότητές τους. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες στην διατροφή είναι η ρύθμιση της χοληστερόλης, του σακχάρου αλλά και η αντιφλεγμονώδης δράση που διαθέτουν. Μεταξύ των σημαντικότερων τεχνολογικών ιδιοτήτων είναι οι ρεολογικές ιδιότητες. Οι εξωπολυσακχαρίτες έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το ιξώδες διαλυμάτων ενώ μεταβάλλεται η θερμοκρασία. Οι β-γλυκάνες συγκεκριμένα έχουν δείξει ότι ενώ αυξάνεται η θερμοκρασία εκείνες σε συγκεντρώσεις 0,5g/L κρατούν σταθερό το ιξώδες. Ακόμη, οι γλυκάνες μπορούν να σχηματίσουν άκαμπτη αλυσίδα και να λειτουργήσουν ως πυκνωματοποιητές. Τέλος η εφαρμογή εξωπολυσακχαριτών στην επικάλυψη τροφίμων έδειξε επιτυχημένη ενσωμάτωση σε ποσοστό 15% το οποίο αύξησε την διάρκεια ζωής του προϊόντος αλλά και μείωσε την γλυκαιμική απόκριση.

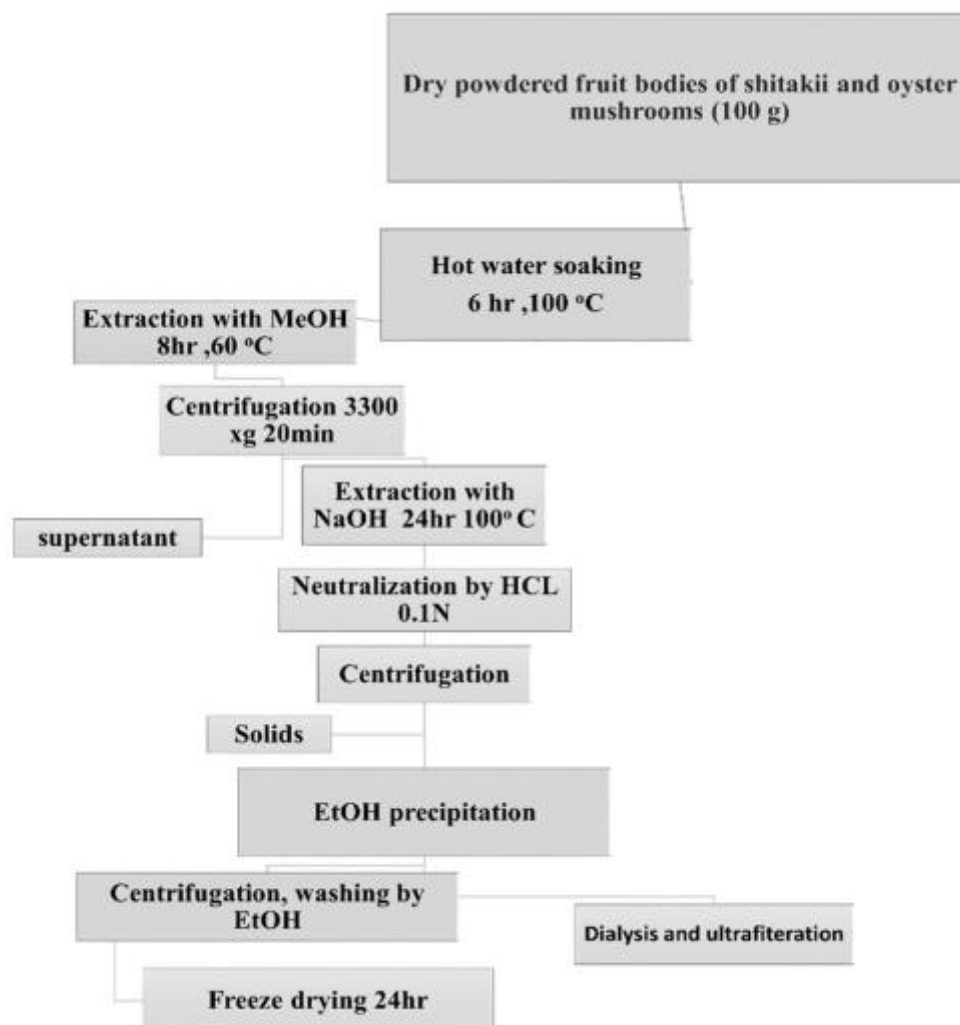
### 3<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Τον τελευταίο καιρό έχει αναφερθεί ότι οι β-γλυκάνες με σφαιρικό μικρό μέγεθος προσδίδουν υψηλή αντοχή έναντι ασθενειών λόγω αυξημένης ανοσοτροποποιητικής δράσης. Στο άρθρο των (Shaheen et al., 2022) αναφέρεται ο σχεδιασμός μίας μεθόδου οξέος-βάσης η οποία βοηθάει στην άμεση εξαγωγή β γλυκανών από μανιτάρια. Τα μανιτάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική εργασία είναι το *Lentinula edodes* (shiitake) και το *Pleurotus ostreatus* (oyster). Η μέθοδος αυτή εξυπηρετεί στην παραγωγή γλυκανών για ποικίλες πειραματικές εργασίες πέραν της υγείας καθώς οι β γλυκάνες που παράγονται μέσω αυτής της μεθόδου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στα τρόφιμα.

Υλικά και μέθοδοι :

- 1) Παραλαβή ξηρής σκόνης των μανιταριών βάρους 100g
- 2) Διάλυση σε βραστό νερό για 6 ώρες

- 3) Εκχύλιση με μεθανόλη 8 ώρες στους 60°C με σκοπό την απομάκρυνση μικρών πολικών μοριών
- 4) Φυγοκέντρηση διηθήματος σε 3300\*g για 20 λεπτά
- 5) Διαχωρισμός υπερκείμενου και εκχύλιση ιζήματος με NaOH 0,5M για 24 ώρες στους 100°C
- 6) Εξουδετέρωση του προκύπτοντος διαλύματος με HCL 0,1M
- 7) Φυγοκέντρηση εκ νέου
- 8) Απομάκρυνση στερεών και κατακρήμιση με αιθανόλη
- 9) Φυγοκέντρηση και ξέπλυμα με αιθανόλη και διάλυση σε απιονισμένο νερό για 2 εβδομάδες για να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες
- 10) Κρυοξήρανση και λυοφιλίωση του δείγματος



Εικόνα 5 Αλκαλική εκχύλιση πολυσακχαριτών

Αποτελέσματα και συζήτηση :

Η απόδοση % ξηρής μάζας σε β-γλυκάνες για τα δύο μανιτάρια ήταν  $4,6 \pm 0,2$  για το shiitake και  $3,16 \pm 0,15$  για το oyster. Η μέθοδος LC-MS σύγκρινε πρότυπη β-γλυκάνη με τα προϊόντα της εκχύλισης των μανιταριών. Οι κορυφές των εμβαδών σχετιζόμενες με τον χρόνο διέφεραν για το δείγμα του oyster σε σχέση με την πρότυπη β-γλυκάνη ενώ οι κορυφές για το δείγμα του shiitake ήταν σχεδόν πανομοιότυπες με την πρότυπη ουσία. Παράλληλα οι πολυσακχαρίτες του oyster και του shiitake εμφάνισαν 4 κοινές κορυφές για τους χρόνους 10,23, 11,6, 12,3, και 13,4 λεπτά το οποίο δείχνει συνέπεια μεταξύ των δειγμάτων και επομένως η διαφορά στα εμβαδά των κορυφών αποδίδεται σε διάφορα θραύσματα που υπέστησαν οι πολυσακχαρίτες με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο χρόνος κατακράτησης. Ωστόσο τα φάσματα των δειγμάτων από την Mass Spectrometry έδειξαν παρόμοιο φάσμα με την πρότυπη ουσία. Η χημική δομή διερευνήθηκε σε σχέση με πρότυπη β-γλυκάνη. Τα αποτελέσματα έδωσαν έμφαση στην πανομοιότυπη δομή των δύο εκχυλισμένων πολυσακχαριτών σε σχέση με την πρότυπη ουσία και όπως φάνηκε από τις μεθόδους LC-MS, NMR και FTIR υπήρχε μεγάλη καθαρότητα. Η μορφολογική δομή καθορίστηκε χρησιμοποιώντας SEM και TEM που έδειξαν ότι τόσο το μέγεθος όσο και το σχήμα των νανογλυκάνων του shiitake ήταν εμφανώς μικρότερο από τις γλυκάνες του oyster. Τέλος το UV-vis έδειξε χαρακτηριστική κορυφή β-γλυκάνης στα 260-300nm. Όλες αυτές οι έρευνες επιβεβαίωσαν με επιτυχία την απόκτηση νανογλυκάνων από βρώσιμα μανιτάρια που έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού και παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα οι νανογλυκάνες του shiitake έδειξαν υψηλότερο δυναμικό αντικαρκινικής δράσης έναντι του oyster, ωστόσο θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες για ενθάρρυνση στην χρήση τέτοιων διαδικασιών για παραγωγή β-νανογλυκανών.

#### 4<sup>η</sup> Μελέτη περιπτώσεις

Στο 9<sup>ο</sup> κεφάλαιο του review των (Wang et al., 2018) γίνεται εκτενής περιγραφή των συμβατικών και μη μεθόδων εκχύλισης και καθαρισμού των πολυσακχαριτών (β-γλυκάνες) των μανιταριών με σκοπό την απομόνωσή και χρήση τους σε άλλες διαδικασίες.

#### Εκχύλιση β-γλυκανών

Υδατική εκχύλιση :

Συνήθως γίνεται σε μορφή προϊόντος υπό σκόνη και πολλές φορές λαμβάνει χώρα μια προγενέστερη εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (αιθανόλη, ακετόνη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο) ώστε να απομακρυνθούν τα οργανικά μόρια όπως λιπίδια, φαινόλες, τερπένια, χωρίς ωστόσο να είναι αναγκαίο αυτό το βήμα. Ωστόσο αυτή η αρχική εκχύλιση με οργανικό διαλύτη διευκολύνει τον πλήρη διαχωρισμό πολυσακχαριτών από άλλες ενώσεις. Η εκχύλιση αυτή πραγματοποιείται με χρήση νερού σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές ώστε να κλασματοποιηθούν σε μεγάλο βαθμό οι πολυσακχαρίτες. Η συλλογή των πολυσακχαριτών θα γίνει με φυγοκέντριση και θα συλλεχθεί το υπερκείμενο. Το υπερκείμενο μπορεί να ξανά-εκχυλιστεί με ζεστό νερό και να αυξηθεί ο βαθμός κλάσματος.

Αλκαλική εκχύλιση :

Λαμβάνει χώρα στο υπόλειμμα που παραμένει από την υδατική εκχύλιση, μέσω χρήσης απλών βασικών διαλυμάτων NaOH/KOH 2% w/v στους 100 βαθμούς. Το διάλυμα φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται το νέο βασικό σε οξύτητα υπερκείμενο το οποίο εκχυλίζεται με χρήση NaBH<sub>4</sub> για την προστασία των αναγωγικών άκρων των σακχάρων και προστασίας των αλυσίδων.

#### Μέθοδοι καθαρισμού

Κατάψυξη – απόψυξη :

Απλή και αποτελεσματική διαδικασία για λήψη καθαρών D-γλυκάνων. Το ακατέργαστο εκχύλισμα συμπυκνωμένο σε υδατικό διάλυμα καταψύχεται και αποψύχεται με αργό ρυθμό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντριση τόσο το ίζημα όσο και το υπερκείμενο καταψύχεται ξανά και αποψύχεται αργά μέχρι να μην υπάρχει καθόλου ίζημα στο υπερκείμενο. Αυτή η διαφορά καθίζησης οφείλεται στον αριθμό των κλάδων, στην δομή των μορίων όπου τα μόρια με γραμμική δομή και λίγους κλάδους καθιζάνουν σε κρύο νερό ενώ αντίθετα τα μόρια με μη γραμμική δομή και αρκετούς κλάδους δεν καθιζάνουν και παραμένουν διαλυμένα.

Επεξεργασία με διαλύτες :

Διαχωρισμός των γλυκανών από άλλους πολυσακχαρίτες με καθίζηση σε 2 ή 3 volumes (τομείς)? ψυχρής αιθανόλης. Η αιθανόλη αφυδατώνει τους πολυσακχαρίτες και έτσι καθιζάνουν διαχωρίζοντάς τους από μόρια χαμηλού μοριακού βάρους. Ακόμη οι D

γλυκάνες λόγω δομής είναι πιο διαλυτές σε πολικούς διαλύτες όπως διμέθυλοσουλφοξείδιο.

Διαχείριση με διάλυμα Fehling :

Ο χαλκός που υπάρχει στο αντιδραστήριο σχηματίζει σύμπλοκα με τις υδροξυλομάδες τις καρβοξυλομάδες και τις αμίνες. Ωστόσο είναι μία μέθοδος που δεν προτιμάται για τον διαχωρισμό γλυκανών λόγω πολυπλοκότητας.

Κλειστή διάλυση και υπερδιήθηση :

Όπως και με το Fehling αυτή η τεχνική δεν εφαρμόζεται συχνά για την παραλαβή γλυκανών καθώς χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση. Στην τεχνική αυτή γίνεται χρήση μεμβρανών με πόρους συγκεκριμένου μεγέθους που λειτουργούν σαν φίλτρα και διηθούν τα διαλύματα πολυσακχαριτών.

Κλασματοποίηση στήλης :

Πραγματοποιείται χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, η οποία διαχωρίζει τους πολυσακχαρίτες ανάλογα με το μέγεθος και επιτρέπει τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Είναι μία μέθοδος της οποίας η χρήση ολοένα και αυξάνεται τόσο σε βιομηχανίες όσο και σε εργαστήρια. Οι στήλες είναι κατασκευασμένες από δεξτράνες, αγαρόζη και πολυακρυλαμίδιο.

### 5<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Εισαγωγή :

Στην εργασία των (Pérez-Bassart et al., 2023) έλαβε χώρα ένα πρωτόκολλο διαδοχικής κλασματοποίησης τριών ειδών βρώσιμων μανιταριών (*Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*) και τα εκχυλίσματά που προέκυψαν υπέστησαν ανάλυση σύνθεσης τους. Στόχος της μελέτης είναι να κατανοηθεί ποια είναι η σειρά εκχύλισης των ουσιών μέσω της κλασμάτωσης αλλά και πως επηρεάζεται η εκχύλιση της β-γλυκάνης. Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα εκχυλίσματα του *P.ostreatus* περιείχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε β-γλυκάνη ενώ το *G.frondosa* είχε την μικρότερη συγκέντρωση σε β-γλυκάνη. Από την άλλη το *L.edodes* είχε την υψηλότερη συγκέντρωση πολυσακχαριτών μη γλυκανικής φύσεως και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε καθαρή χιτίνη.

Υλικά και μέθοδοι :

Για κάθε μανιτάρι χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο κλασματοποίησης. Σε 25γρ λυοφυλιοποιημένου μανιταριού προστέθηκε απεσταγμένο νερό και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ώρες. Στην συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρίθηκε για 15 λεπτά στις 8000 rpm σε θερμοκρασία 4 βαθμών και το ίζημα υποβλήθηκε δύο ακόμη φορές σε υδατική εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου με όγκο νερού 150ml και αναδεύτηκε για 7 ώρες. Τα υδατικά κλάσματα που προέκυψαν συμπυκνώθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν. Το ίζημα ελήφθη από την εκχύλιση και υποβλήθηκε σε υδατική επεξεργασία στους 100°C με αναρροή 3 φορές με όγκο 300ml απεσταγμένου νερού στην πρώτη πλύση και άλλες δύο φορές με όγκο 150ml. Το διαλυτό μέρος που προέκυψε από τις 3 εκχυλίσεις συμπυκνώθηκε και πάλι και καταψύχθηκε ως κλάσμα. Το ίζημα υποβλήθηκε σε μία πρώτη επεξεργασία αλκαλικής εκχύλισης σε θερμοκρασία δωματίου για όλη την νύχτα με 150ml NaOH 1M, και 0,05% NaBH<sub>4</sub> για να αποφευχθεί η οξείδωση του πολυσακχαρίτη. Το εναιώρημα φυγοκεντρίθηκε 15min στις 8000 rpm στους 4 βαθμούς και το υπερκείμενο δεσμεύτηκε και καθίζανε με 1/3 v/v αιθανόλη για να αφαιρεθούν τα συστατικά με χαμηλό μοριακό βάρος και στην συνέχεια έγινε εξουδετέρωση μέσω πλυσίματος με 0,4M HCL. Το εξουδετερωμένο ίζημα στέγνωσε σε αέρα και λυοφιλοποιήθηκε. Το υπόλοιπο ίζημα υπέστη δεύτερη αλκαλική επεξεργασία υπό τις ίδιες συνθήκες για την προώθηση της εκχύλισης των λιγότερων διαλυτών β-γλυκανών.

Αποτελέσματα :

Ο χαρακτηρισμός στην βιομάζα των μανιταριών έδειξε ποσοστό υγρασίας 87 με 88% περίπου με τιμές να κυμαίνονται από 67,2 έως 91,5 και για τα τρία μανιτάρια. Η περιεκτικότητα σε τέφρα ήταν από 5 έως 12%. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι γενικά μικρή και κυμαίνεται από 0,1 έως 16,3%. Το *P.ostreatus* είχε την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπίδια με 5,3% ακολουθούμενο από το *L.edodes* με 4,6% και τέλος το *G.fruondosa* με 4,2%. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη έγινε μέσω μέτρησης αζώτου και έδειξε 23 με 26% με το *P.ostreatus* να έχει και πάλι μεγάλη περιεκτικότητα. Όσον αφορά τις γλυκάνες και την χιτίνη πάλι το *P.ostreatus* έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε α και β-γλυκάνες αλλά και σε χιτίνη. Μιλώντας με ποσοστά η χιτίνη ανερχόταν από 2 έως 8,5%, η α-γλυκάνη 10% και η β-γλυκάνη 60,8%.

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες έδειξε πως *P.ostreatus* ξανά υπερτερεί και στα 2. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο περιεχόμενο β-γλυκάνης που δομεί το μανιτάρι η οποία έχει αντιοξειδωτική ικανότητα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα από την μέθοδο διαδοχικής εκχύλισης φάνηκε πως υψηλότερες αποδόσεις είχαν τα εκχυλίσματα όλων των μανιταριών όταν η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν θερμοκρασία δωματίου, με υψηλότερη απόδοση να έχει το *P.ostreatus* (82%) και χαμηλότερη το *G.fruondosa* (56%). Η δομή του πρώτου απαρτίζεται από υψηλό ποσοστό β-γλυκάνης (16g/100gr μανιταριού) και ως εκ τούτου καθιστά την υδατική εκχύλιση προσιτή έναντι αλκαλικών μεθόδων που απαιτούν διαλύτες, μειώνοντας έτσι κατά πολύ το κόστος. Το *L.edodes* ήταν κάπου στην μέση καθώς από αυτό εκχυλίστηκε αφθονία πολυσακχαριτών ωστόσο μη γλυκανικής φύσης. Το *G.fruondosa* καθώς έχει χαμηλό περιεχόμενο σε β-γλυκάνη, μόλις 8g/100g μανιταριού έδειξε υψηλότερη σε αλκαλική εκχύλιση. Συνεπώς το συμπέρασμα της εργασίας είναι πως οι πολυσακχαρίτες μπορούν να εκχυλισθούν υδατικά με μεγάλη απόδοση όταν το είδος του μανιταριού, δηλαδή τα γενετικά χαρακτηριστικά του ευνοούν την εκχύλιση. Ο πιο χρήσιμος δείκτης είναι το ποσοστό β-γλυκάνης σε g/100g μανιταριού, καθώς όσο περισσότερη γλυκάνη έχει στην δομή του το νωπό μανιτάρι, τόσο μεγαλύτερη απόδοση θα έχει στο τέλος της εκχύλισης.

## 5. Συσκευασία Τροφίμων

### 5.1 Εισαγωγή

Η συσκευασία των τροφίμων αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινότητας των ανθρώπων. Η εξέλιξή της βαδίζει παράλληλα με την εξέλιξη της τεχνολογίας αλλά και του βιοτικού επιπέδου της κάθε εποχής στην διάρκεια των χρόνων. Το Βρετανικό Ινστιτούτο Συσκευασίας ορίζει στον όρο συσκευασία το εξής τρίπτυχο : Συσκευασία αποτελεί ένα συντονισμένο σύστημα το οποίο προετοιμάζει τα αγαθά καθιστώντας τα κατάλληλα για διανομή, μεταφορά, πώληση και χρήση. Είναι ένας τρόπος που διασφαλίζει την ασφαλή διανομή των προϊόντων στον τελικό καταναλωτή με σχετικά χαμηλό κόστος και τέλος είναι μία τεχνοοικονομική διαδικασία που έχει ως σκοπό να μειώσει τα κόστη μεταφοράς και να μεγιστοποιήσει τις πωλήσεις. Ο Νόμος 2939/01 ορίζει την συσκευασία ως <<κάθε προϊόν κατασκευασμένο από οποιαδήποτε είδος υλικού και προοριζόμενο να χρησιμοποιηθεί για να παρέχει αγαθά. Σκοπός της είναι η προστασία, διακίνηση, διάθεση και η παρουσίαση



των αγαθών από τον παραγωγό μέχρι τον χρήστη ή τον καταναλωτή>> (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

Η συσκευασία των τροφίμων αποτελεί έναν διεπιστημονικό κλάδο διότι στηρίζεται στις αρχές πολλών επιστημών όπως η Χημεία, η Μηχανική Τροφίμων, και η Μικροβιολογία. Ο κύριος ρόλος της είναι η προστασία του τροφίμου από επιμέρους μολύνσεις που θα καταστήσουν το τρόφιμο ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση και θα μειώσουν την εμπορική του αξία. Σε δεύτερο χρόνο, η συσκευασία έχει στόχο να δίνει ιδιαίτερο σχήμα στο εκάστοτε τρόφιμο αλλά και να πείθει τον καταναλωτή να αγοράσει το προϊόν.

Η χρήση της είναι τόσο παλιά όσο και ο άνθρωπος. Το πρώτο είδος συσκευασίας ήταν τα φύλλα με τα οποία οι πρωτόγονοι τύλιγαν και συγκέντρωναν την τροφή τους. Με τα χρόνια, η εξέλιξη των ανθρώπων σηματοδότησε την εξέλιξη και της συσκευασίας. Αυτές γίνονταν από φυσικά υλικά σε σχήμα στερεών δοχείων από κορμούς δέντρων, λίθους, όστρακα και μετέπειτα από πηλό, μέταλλα, γυαλί, χαρτί και καταλήγουμε στο σήμερα, όπου τα πλαστικά είναι η κύρια μονάδα δημιουργίας συσκευασίας. Η εξέλιξη των συσκευασιών εκτός από σημαντική έγινε και αναγκαία καθώς έπαιξε σημαντικό ρόλο στην προστασία του ανθρώπου εναντίον της πείνας. Σήμερα, στις αναπτυγμένες χώρες, η συσκευασία εξασφαλίζει την προστασία της υγείας του ανθρώπου από διάφορες παθήσεις αλλά και της επιβίωσής του καθώς συντηρεί τα τρόφιμα υπό αποθήκευση σε περιόδους πολέμων και φυσικών καταστροφών. Η μεγάλη σπουδαιότητα της συσκευασίας αποδεικνύεται από το γεγονός πως σχεδόν όλα τα τρόφιμα πωλούνται συσκευασμένα. Είναι όμως και αυτοί που πιστεύουν οι διάφορες συσκευασίες κάνουν μόνο κακό στον πλανήτη καθώς η δημιουργία τους συνδέεται με αξιοποίηση και σπατάλη φυσικών πόρων αλλά και μετέπειτα η λανθασμένη απόρριψη της μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στο περιβάλλον. Για αυτό τον λόγο οι βιομηχανίες πλέον ολοένα και στρέφονται στην δημιουργία συσκευασιών από ανακυκλώσιμα υλικά αλλά και στην δημιουργία φιλικών προς το περιβάλλον συσκευασιών όπως είναι οι εδώδιμες συσκευασίες η αλλιώς τα λεγόμενα <<βιοφίλμ>> τα οποία θα εξηγήσουμε παρακάτω.

## 5.2 Βασικές λειτουργίες συσκευασίας τροφίμου

### 5.2.1 Συγκράτηση προϊόντος :

Η συγκράτηση του περιεχομένου προϊόντος αποτελεί ίσως και την πιο εμφανή βασική λειτουργία της συσκευασίας. Είναι προφανές πως για την μεταφορά υγρών τροφίμων

όπως γάλα, λάδι, νερό κλπ είναι απαραίτητη η χρήση περιεκτών οι οποίοι θα κρατούν το υγρό στοιχείο εντός υπό μία συγκεκριμένη μορφή η οποία θα εξυπηρετεί την διακίνησή τους (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.2.2 Προστασία προϊόντος :

Ο βασικότερος σκοπός της συσκευασίας των τροφίμων είναι η προστασία του τροφίμου σε όλα τα στάδια της αλυσίδας των τροφίμων. Από την παραγωγή έως και την κατανάλωση το τρόφιμο πρέπει να προστατευτεί από κάθε κίνδυνο ώστε να είναι ποιοτικά άρτιο. Συνεπώς η συσκευασία πρέπει να προσφέρει μηχανική ασφάλεια ώστε το σχήμα του τροφίμου να διατηρείται ακέραιο, να το προστατεύει από την υγρασία και τις εξωτερικές συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, ακτινοβολία), να προστατεύει από μικροβιακή επιμόλυνση, σκόνες, ξένες ύλες, τρωκτικά και να τα επιτυγχάνει όλα αυτά χωρίς να επιφέρει αλλοιώσεις στο ίδιο το τρόφιμο (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.2.3 Προμήθεια και χρήση προϊόντος από τον καταναλωτή :

Οι καταναλωτές πλέον σε σχέση με τα παλαιότερα χρόνια διαθέτουν λιγότερο χρόνο για την προμήθεια και τακτοποίηση των τροφίμων τους στο σπίτι τους. Επομένως θέλουν να προμηθεύονται τα τρόφιμά τους έτοιμα συσκευασμένα στις ποσότητες που χρειάζονται από τα καταστήματα λιανικής πώλησης με λιγότερο κόστος και γρηγορότερα σε σχέση με το παρελθόν. Πλέον πολλά τρόφιμα μπορούν να καταναλωθούν απευθείας από την συσκευασία και ο καταναλωτής δεν χρειάζεται να χρησιμοποιήσει οικιακά σκεύη. Επομένως, στην δημιουργία συσκευασιών επιδιώκεται η δυνατότητα εύκολου ανοίγματος και κλεισίματος αλλά και σχήματος τέτοιου το οποίο θα είναι εύκολο στην αποθήκευσή του σε οικιακά ράφια και ψυγεία (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.2.4 Επικοινωνία με τον καταναλωτή :

Η συσκευασία τροφίμων είναι η πρώτη επαφή του καταναλωτή με το τρόφιμο. Συνεπώς η πρώτη εικόνα είναι ύψιστης σημασίας στην τελική απόφαση του καταναλωτή για το αν αγοράσει το τρόφιμο. Πλέον οι συσκευασίες σχεδιάζονται με τρόπο τέτοιο ώστε να ελκύουν τους πιθανούς πελάτες. Μέσω των πληροφοριών και ενδείξεων που φέρει η συσκευασία προσφέρει πληροφορίες για την θρεπτική αξία, και τον τρόπο χρήσης του τροφίμου. Οι σύγχρονες πρακτικές μάρκετινγκ θα αποτύγχαναν εάν οι συσκευασίες δεν περνούσαν τα απαραίτητα μηνύματα. Επομένως η συσκευασία αποτελεί και μέθοδο διαφήμισης του προϊόντος και θα πρέπει να συμβαδίζει με τα στοιχεία της κάθε

εποχής. Για παράδειγμα, η τάση των ανθρώπων στην αυστηρώς χορτοφαγική διαίτα έχει οδηγήσει στην δημιουργία συσκευασιών με πράσινο χρώμα και τίτλους που επισημάνουν την πηγή φυτικής προέλευσης (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 5.3 Γενική διάκριση συσκευασιών

Οι συσκευασίες τροφίμων ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες με κριτήριο αν έρχονται απευθείας ή όχι σε επαφή με το τρόφιμο, αν αποτελούν ξεχωριστές μονάδες πώλησης ή αν περιλαμβάνουν ένα σύνολο μονάδων προς πώληση, αν είναι προσχηματισμένες ή αν μορφοποιούνται κατά την περιτύλιξη του προϊόντος, αν κλείνουν ερμητικά ή όχι, αν είναι εύπλαστες και αλλάζουν σχήμα με συμπίεση ή όχι (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.3.1 Άμεσες και εξωτερικές συσκευασίες

Κάποια τρόφιμα εκ φύσεως φέρουν αποτελεσματικές που τα προστατεύουν όπως είναι τα τσόφλια των αυγών και οι φλούδες των φρούτων. Επομένως αυτά τα τρόφιμα κατά την συσκευασία τους χρειάζονται μόνο έναν περιέκτη για να μπουν μέσα. Ωστόσο υπάρχουν τρόφιμα που τοποθετούνται σε περιέκτες οι οποίοι μετέπειτα συσκευάζονται σε εξωτερικές συσκευασίες όπως είναι χάρτινα κουτιά οι οποίες προσφέρουν μία έξτρα προστασία στην είδη υπάρχουσα συσκευασία (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.3.2 Επίπεδα συσκευασίας

Τα επίπεδα συσκευασίας αποτελούν μία επιπλέον σχετική διάκριση των συσκευασιών. Στα επίπεδα αυτά οι συσκευασίες χωρίζονται σε πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς. Με βάση το νομοθετικό πλαίσιο, πρωτογενής είναι η συσκευασία που αποτελεί στο σημείο αγοράς, χωριστή μονάδα προς πώληση στον τελικό πελάτη. Δευτερογενής, είναι η συσκευασία που αποτελεί στο σημείο αγοράς, σύνολο ορισμένου αριθμού μονάδων προς πώληση είτε αυτές πωλούνται ως έχουν είτε χρησιμεύουν μόνο για την πλήρωση εκθετηρίων στο σημείο πώλησης. Τέλος τριτογενής, είναι η συσκευασία που διευκολύνει τη διακίνηση και μεταφορά αριθμού μονάδων προς πώληση προκειμένου να αποφεύγεται η διά χειρός διακίνηση και οι ζημιές κατά την μεταφορά (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.3.3 Προσχηματισμένα δοχεία και δοχεία που μορφοποιούνται κατά την συσκευασία

Οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία τροφίμων μπορεί να είναι έτοιμοι προσχηματισμένοι όπως είναι τα κονσερβοκούτια και τα γυάλινα μπουκάλια, ή να σχηματίζονται κατά την διάρκεια της συσκευασίας. Τέτοιο παράδειγμα μορφοποιημένων συσκευασιών είναι τα πλαστικά σακίδια από πλαστικές μεμβράνες.

Αυτές οι μεμβράνες, μέσω χρήσης θέρμανσης αποκτούν ελαστικότητα και μορφοποιούνται στο επιθυμητό σχήμα και μετέπειτα κρύνουν αποκτώντας σταθερό σχήμα. Οι διαδικασίες θέρμανσης, γεμίματος και κλεισίματος γίνονται με αυτοματοποιημένες διαδικασίες επιτυγχάνοντας έτσι μεγάλη οικονομία λόγω μείωσης απασχόλησης εργατικού προσωπικού, αλλά και εξοικονόμησης χώρου καθώς δεν χρειάζονται δοχεία μεταφοράς (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.3.4 Συσκευασίες ερμητικά και μη ερμητικά κλεισμένες

Οι ερμητικά κλεισμένες συσκευασίες αφορούν συσκευασίες στις οποίες το κλείσιμο είναι τέτοιο ώστε το δοχείο να είναι απολύτως αδιαπέραστο από αέρια και ατμούς σε οποιοδήποτε σημείο ακόμα και στις ραφές. Μία τέτοια συσκευασία προστατεύει αυτομάτως από ξένες ύλες και μικροοργανισμούς του εξωτερικού περιβάλλοντος. Τα ερμητικά κλειστά δοχεία μπορούν να εξασφαλίσουν και την ύπαρξη κενού αέρος αλλά και της επιθυμητής πίεσης στο εσωτερικό. Τέτοιες συσκευασίες είναι συνήθως μεταλλικές οι οποίες έχουν αντοχή στις διαφορές πίεσης, αλλά και γυάλινες οι οποίες έχουν πλήρη προστασία από εισχώρηση αέρα και υγρασίας. Από την άλλη μη ερμητικά κλεισμένες συσκευασίες, πρόκειται για συσκευασίες οι οποίες έχουν μικροσκοπικούς πόρους από τους οποίους είναι δυνατή η διέλευση αερίων και υδρατμών. Τέτοιες συσκευασίες αφορούν συνήθως συσκευασίες με μεγάλες επιστρώσεις υλικού μέσα στο οποίο μπορούν να δημιουργηθούν σχισμές (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 5.3.5 Δύσκαμπτες, ημίσκληρες και εύκαμπτες συσκευασίες

Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται με κριτήριο με το αν οι συσκευασίες αλλάζουν σχήμα όταν πιεστούν με τα χέρια. Δύσκαμπτες είναι οι συσκευασίες οι οποίες έχουν σταθερό σχήμα το οποίο δεν μπορεί να παραμορφωθεί με τα χέρια. Τέτοιες συσκευασίες είναι τα γυάλινα δοχεία και τα μεταλλικά κουτιά. Ημίσκληρες καλούνται οι συσκευασίες οι οποίες έχουν ένα ορισμένο σχήμα το οποίο αλλάζει μετά από συμπίεση με τα χέρια αλλά επανέρχεται στο φυσιολογικό όταν αποχωρήσει η συμπίεση. Τέτοιες συσκευασίες είναι διάφορα χαρτόκουτα και μεταλλικά δοχεία. Τέλος εύκαμπτες συσκευασίες είναι οι συσκευασίες οι οποίες φτιάχνονται από εύκαμπτα υλικά τα οποία αλλάζουν σχήμα και παραμένουν στην νέα διαμόρφωση που τους δόθηκε (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

## 6. Βρώσιμες – Εδώδιμες συσκευασίες τροφίμων

### 6.1 Εισαγωγή

Οι βρώσιμες ή αλλιώς εδώδιμες συσκευασίες είναι μεμβράνες και επικαλύψεις που κατασκευάζονται από εδώδιμα υλικά και χαρακτηριστικά και λειτουργία παρόμοια με τα συνθετικά πολυμερή. Αυτές οι συσκευασίες μπορούν άφοβα να καταναλωθούν από τον αγοραστή μειώνοντας έτσι τα ποσοστά συσκευασιών που απορρίπτονται και δημιουργούν αστικά απόβλητα. Είναι εξ ολοκλήρου βιοαποικοδομήσιμες και συνήθως παράγονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες όπως είναι τα απόβλητα τροφίμων συμβάλλοντας έτσι στην αειφόρο ανάπτυξη και στην ενίσχυση της πράσινης κυκλικής οικονομίας. Όταν οι συσκευασίες αυτές προέρχονται από απόβλητα τότε συνεισφέρουν στην μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλείται όταν τα απόβλητα θάβονται στο έδαφος ή πετιούνται στην θάλασσα. Υφίστανται υπό μορφή μεμβρανών με πάχος μικρότερο των 254μm και ως φύλλα με πάχος μεγαλύτερο των 254μm, και χρησιμοποιούνται κυρίως ως περιτυλίγματα τροφίμων ενώ μπορούν μέσω ειδικών διαδικασιών να μορφοποιηθούν σε θήκες ή να συγκολληθούν σε σακίδια (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

Οι κύριες λειτουργίες τους είναι να αποτελούν έναν κατάλληλο φραγμό στην διαπερατότητα υγρασίας, λιπών, ελαίων και αερίων εντός και εκτός τροφίμου. Σε δεύτερο βαθμό οι εδώδιμες συσκευασίες χρησιμοποιούνται με στόχο την μηχανική αντοχή, την συγκράτηση πτητικών συστατικών, χρήση ως μέσου μεταφοράς συντηρητικών και προσθέτων στο τρόφιμο προστατεύοντας το από οξειδωτικές βλάβες καθιστώντας το φρέσκο για μεγαλύτερο διάστημα. Η ιδέα για χρήση τέτοιων συσκευασιών ξεκίνησε πριν δεκαετίες και το 1930 τα εσπεριδοειδή καλύπτονταν με κηρούς παραφίνης που ήταν πλέον διαθέσιμοι στο εμπόριο για να επιβραδυνθεί η μεταφορά υγρασίας. Με την πάροδο των χρόνων η χρήση τέτοιων συσκευασιών προχώρησε σε διάφορα είδη τροφίμων όπως είναι το βρώσιμο κολλαγόνο το οποίο προστίθεται στα λουκάνικα αλλά και πολλές επικαλύψεις γλυκών αποτελούνται από είδη ζαχαροπλαστικής.

Ωστόσο θα πρέπει να γίνει κατανοητό πως οι εδώδιμες συσκευασίες δεν αποτελούν πανάκεια και δεν μπορούν σε καμία περίπτωση να σταματήσουν την παραγωγή συμβατικών συσκευασιών. Ο λόγος είναι πολύ απλός. Τα προϊόντα τα οποία θα επικαλύπτονται από βρώσιμη συσκευασία η οποία θα εκτίθεται στο περιβάλλον θα είναι μη ασφαλή και μη αποδεκτά για ανθρώπινη κατανάλωση. Επομένως θα πρέπει να

φέρουν μία έξτρα συσκευασία οι οποία θα προστατεύει την βρώσιμη συσκευασία. Σκοπός των εδώδιμων συσκευασιών είναι να προσφέρουν επιπλέον ιδιότητες στο τρόφιμο και να λειτουργούν συμπληρωματικά με την συμβατή συσκευασία με σκοπό την ολική βελτίωση και αποδοχή του τροφίμου από τους πελάτες.

## 6.2 Μεμβράνες πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες και αποτελούνται από μονομερή, τους μονοσακχαρίτες οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς, σχηματίζοντας έτσι μακριές πολυμερείς οργανικές αλυσίδες. Οι πολυσακχαρίτες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στο παρελθόν για την δημιουργία εδώδιμων μεμβρανών καθώς βρίσκονται σε τεράστια αφθονία στην φύση, έχουν πολύ χαμηλό κόστος, είναι εύκολοι στην επεξεργασία τους και διαθέτουν κατάλληλες ιδιότητες για επικάλυψη τροφίμων. Οι μηχανικές τους ιδιότητες είναι αρκετά καλές και μπορούν να κατακρατούν σε ικανοποιητικό βαθμό λίπη και έλαια. Ωστόσο ένα μεγάλο μειονέκτημα που παρουσιάζουν είναι η διαπερατότητα σε νερό και υδρατμούς λόγω πολικής φύσης που αυξάνει την υδροφιλία του μορίου. Επομένως οι συσκευασίες πολυσακχαριτών επηρεάζονται από την υγρασία και συνεπώς δεν είναι κατάλληλοι για υδαρά τρόφιμα. Παρακάτω θα αναλύσουμε κάποια είδη πολυσακχαριτικών ουσιών που σχηματίζουν εδώδιμα φιλμ.

### 6.2.1 Άμυλο

Το άμυλο είναι μίγμα αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης. Η αμυλόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές 200 με 2000 μονάδων D-γλυκόζης συνδεδεμένων με  $\alpha$ -1,4-γλυκοζιτικό δεσμό σε γραμμική ευθεία διάταξη. Η αμυλοπηκτίνη από την άλλη είναι μία πολύ διακλαδισμένη αλυσίδα που αποτελείται από έναν κύριο σκελετό αμυλόζης μαζί με πλευρικές αλυσίδες D-γλυκόζης ενωμένες με  $\alpha$ -1,6-γλυκοζιτικό δεσμό επάνω στην γραμμική αλυσίδα, ο οποίος προκαλεί και την διακλάδωση στο μόριο. Τα βιοφίλμ που σχηματίζονται από αμυλόζη είναι έχουν ομοιόμορφη δομή και είναι ανθεκτικά. Ενώ αντίθετα τα βιοφίλμ αμυλοπηκτίνης είναι πολύ εύθραυστα. Για να αυξηθεί η συνεκτικότητα του αμύλου, αυτό θα υποστεί μερική αιθεριοποίηση με προπυλενοξειδίο να ληφθούν υδρόξυπροπυλιωμένα παράγωγα. Αυτά τα παράγωγα έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά προϊόντα τροφίμων όπως προϊόντα ζαχαροπλαστικής και παναρίσματα για κρέατα ώστε να προσφέρουν φραγμό στην δίοδο του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και συνεπώς να βελτιωθεί η ολική ποιότητα (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.2.2 Κυτταρίνη

Πρόκειται για ένα γραμμικό πολυμερές το οποίο έχει ως δομική μονάδα την D-γλυκόζη η οποία συνδέεται με β-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό. Η ύπαρξη πολλών ατόμων υδρογόνων στις αλυσίδες ανεβάζει κατά πολύ το σημείο ζέσεως της και επομένως δεν λιώνει εύκολα ενώ παράλληλα την κάνει και αδιάλυτη στο νερό. Για να λάβει την απαραίτητη πλαστικότητα τα υδροξύλια πρέπει να αντικατασταθούν με αιθερομάδες μέσω χημικών τροποποιήσεων. Οι πιο συνηθισμένες χημικές τροποποιήσεις είναι αρχικά η κατεργασία της κυτταρίνης με βασικά διαλύματα ώστε να διογκωθεί και μετέπειτα ακολουθεί προσθήκη μεθυλοχλωριδίου ή προπυλενοξειδίου ή χλωροξικού οξέος. Τα προϊόντα που προκύπτουν έχουν πολύ καλές ιδιότητες σχηματισμού φιλμ, είναι άγευστα, άοσμα, εύκαμπτα, διαφανή, υδατοδιαλυτά και έχουν μέτρια διαπερατότητα σε οξυγόνο αλλά μεγάλη σε υδρατμούς. Κάποιες κατηγορίες τέτοιων προϊόντων όπως το MC και HPMC έχουν την ικανότητα μέσω θέρμανσης να αποκτούν ζελατινώδη μορφή και χρησιμοποιούνται ευρέως στα παναρίσματα κρεατικών ώστε να μειώνεται η απορρόφηση λαδιού κατά το τηγάνισμα (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.2.3 Ημικυτταρίνη

Οι ημικυτταρίνες είναι μία ομάδα πολυσακχαριτών που αποτελεί σχεδόν το 20% της μάζας ενός φυτού. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, αυτή αποτελείται από μεγάλο αριθμό εξοζών και πεντοζών όπως γλυκόζη, μαννόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και αραβινόζη. Διακρίνονται σε τέσσερις κύριες ομάδες αναλόγως του βασικού μονομερούς από το οποίο αποτελούνται. Αυτές οι ομάδες είναι οι ξυλάνες, μαννάνες, β-γλυκάνες και ξυλογλουκάνες (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.2.4 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι το βιομηχανικά επεξεργασμένο μόριο της χιτίνης. Πιο συγκεκριμένα η χιτίνη είναι είναι ένας αζωτούχος πολυσακχαρίτης ο οποίος υπάρχει σε αφθονία στον εξωσκελετό αρθροπόδων. Αποτελείται από ομάδες N-ακετυλ-D-γλουκοζαμίνης ενωμένες με β-1,4 δεσμούς και κάθε μόριο φέρει μία ακετυλοαμινομάδα. Η χιτίνη για να μετατραπεί σε εμπορεύσιμη χιτοζάνη πρέπει να αποκετυλιωθεί. Οι μεμβράνες χιτοζάνης παρασκευάζονται με χύτευση όξινων διαλυμάτων και οι ιδιότητές τους εξαρτώνται από το μοριακό βάρος και τον βαθμό ακετυλίωσης. Η χιτοζάνη διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι βακτηρίων τόσο θετικών όσο και αρνητικών Gram αλλά και μυκήτων που οφείλεται στην δέσμευση πρωτονίων από τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών προκαλώντας έτσι διαφορές στην ηλεκτροχημική

βαθμίδωση της μεμβράνης. Οι μεμβράνες χιτοζάνης έχουν χρησιμοποιηθεί στην επικάλυψη φρούτων και λαχανικών και έχουν δείξει πως περιορίζουν σημαντικά την μικροβιακή αύξηση και αυξάνουν την διάρκεια ζωής (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.2.5 Κόμμεα

Στα κόμμεα ανήκουν τα αλγινικά άλατα, οι καραγενάνες, το άγαρ και οι πηκτίνες. Τα αλγινικά άλατα είναι άλατα του αλγινικού οξέος το οποίο λαμβάνεται από τις καφέ άλγες και είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, που έχει συγγένεια με το D-μανουρονικό οξύ και το L-γουλουρονικό οξύ. Τα αλγινικά άλατα παρασκευάζονται μέσω εξάτμισης του νερού από υδατικά διαλύματα αλγινικών αλάτων με παράλληλη προσθήκη ασβεστίου το οποίο θα σχηματίσει ιοντικές γέφυρες μεταξύ των μακρομορίων. Οι μεμβράνες αλγινικών αλάτων είναι αδιαπέραστες από λίπη και έλαια, αλλά έχουν μεγάλη διαπερατότητα σε υδρατμούς.

Οι καραγενάνες είναι ένας γενικός όρος που αποδίδεται στους πολυσακχαρίτες που εκχυλίζονται από διάφορα είδη θαλάσσιων ροδοφυκών με το <<Ιρλανδικό βρύο>> να είναι πιο διαδεδομένο. Πρόκειται για μείγματα πολυμερών τουλάχιστον πέντε στον αριθμό που βασίζονται στην γαλακτόζη. Οι μεμβράνες καραγενανών έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς αντιμικροβιακών ουσιών, στον περιορισμό απώλειας υγρασίας αλλά και στην προστασία από οξείδωση.

Το άγαρ είναι ένας πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται και αυτός από διάφορα είδη θαλάσσιων φυκιών. Στα τρόφιμα έχουν χρησιμοποιηθεί επικαλύψεις άγαρ οι οποίες ήταν εμπλουτισμένες με αντιβιοτικά και βακτηριοσίνες.

Οι πηκτίνες είναι υδατοδιαλυτά πολικά πολυμερή και αποτελούνται από μεθυλιωμένο D-γαλακτουρονικό οξύ ενωμένο με  $\alpha$ -1,4 δεσμό. Οι ιδιότητες της εξαρτώνται κυρίως από τον βαθμό εστεροποίησης. Στην δημιουργία εδώδιμων συσκευασιών χρησιμοποιούνται οι πηκτίνες χαμηλού αριθμού μεθοξυλίων οι οποίες έχουν παρασκευαστεί με προσθήκη κατιόντων ασβεστίου. Έχουν μεγάλη διαπερατότητα στην υγρασία ωστόσο επιβραδύνουν την απώλεια υγρασίας από το τρόφιμο διότι πρώτα αποβάλλουν τα δικά τους μόρια νερού και μετέπειτα του τροφίμου (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.3 Λιπιδιακές επικαλύψεις

Τα λιπίδια δεν είναι πολυμερή και επομένως δεν μπορούν να σχηματίσουν μεμβράνες. Ωστόσο χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως μέσο επικάλυψης τροφίμων



προστατεύοντας τα από υγρασία καθώς είναι μη πολικές ενώσεις. Οι κηροί αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες αλκυλίων και διακρίνονται σε συνθετικούς και φυσικούς. Οι συνθετικοί κηροί είναι μακριές αλυσίδες κορεσμένων υδρογονανθράκων χωρίς λειτουργικές ομάδες. Οι φυσικοί κηροί έχουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία και φέρουν λιπαρά οξέα, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες, αλδεΐδες κλπ. Οι φυσικοί κηροί χωρίζονται σε ζωικής και φυτικής προέλευσης. Ζωικής προέλευσης είναι κυρίως εστέρες ενώ οι φυτικής προέλευσης είναι μίγματα υδρογονανθράκων και εστέρων. Η χρήση κηρών στην επικάλυψη τροφίμων χρονολογείται από το 1930 στην επικάλυψη φρούτων με σκοπό την αύξηση προσδόκιμου ζωής. Επιπρόσθετα ως εδωδιμες επικαλύψεις έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο-δι- και τριγλυκερίδια τα οποία μέσω ακετυλίωσης του εστέρα της γλυκερόλης δίνουν εύκαμπτα στερεά σαν κερί. Η χρήση τους αφορά κυρίως επικαλύψεις κρεατικών. Τέλος η ρητίνη Shellac που παράγεται από έντομα χρησιμοποιείται ως μέσω επικάλυψης φλουδών φρούτων (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.4 Πρωτεϊνικές μεμβράνες

Στην βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται μεμβράνες και επικαλύψεις πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης όπως είναι το κολλαγόνο, η ζελατίνη, οι καζεΐνες, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αλλά πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης όπως γλουτένη, ζεΐνη, και πρωτεΐνες σόγιας. Οι πρωτεϊνικές μεμβράνες παρουσιάζουν μικροί αντοχή και υψηλή διαπερατότητα στους υδρατμούς λόγω υδρόφιλων τμημάτων που φέρουν στα μόρια τους αλλά και λόγω ύπαρξης υδρόφιλων πλαστικοποιητών όπως γλυκερίνη και σορβιτόλη οι οποίες προστίθενται στην μεμβράνη για να προσδώσουν ελαστικότητα και ευκαμψία. Ωστόσο, έχουν πολύ ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες αλλά και βελτιώνουν σε μεγάλο βαθμό την εικόνα του τροφίμου το οποίο περιτυλίγουν. Είναι αδιαπέραστες σε οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, αρώματα και λιπίδια και επομένως αυξάνουν την φρεσκάδα του τροφίμου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Για να βελτιωθούν οι ιδιότητες των πρωτεϊνικών μεμβρανών αυτές μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες όπως είναι η δημιουργία σταυροειδών ενώσεων μεταξύ των μορίων για αύξηση αντοχής. Ωστόσο, το μεγάλο μειονέκτημα των πρωτεϊνικών μεμβρανών και επικαλύψεων είναι πως γίνονται αυτομάτως ευάλωτες σε ένζυμα πρωτεασών που βρίσκονται τόσο σε τρόφιμα όσο και σε μικροοργανισμούς. Ακόμη, δεδομένου πως οι πλειοψηφίες αλλεργιών οφείλονται σε αδυναμία πέψης πρωτεϊνών, το προϊόν που έχει περιβληθεί από μία τέτοια επικάλυψη μπορεί να γίνει ακατάλληλο

για μία μερίδα ανθρώπων, και επομένως θα πρέπει να αναγράφονται όλοι οι πιθανοί κίνδυνοι στην συσκευασία (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.4.1 Κολλαγόνο

Πρόκειται για μία ομάδα ινωδών πρωτεϊνών του ζωικού ιστού και βρίσκεται στα οστά, στους μύες, στους τένοντες και στο δέρμα. Το κολλαγόνο που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων παραλαμβάνεται κυρίως από δέρμα βοδιού. Οι μεμβράνες κολλαγόνου χρησιμοποιούνται κυρίως στην παρασκευή λουκάνικων για θήκη έναντι του κλασσικού εντέρου. Επιπλέον, κολλαγόνο χρησιμοποιείται σε κομμάτια σύγκοπτου κρέατος ώστε να αύξηση την συγκόλληση αλλά και να αποτρέψει την απώλεια υγρών (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.4.2 Ζελατίνη

Η ζελατίνη παράγεται από το κολλαγόνο μέσω μερικής υδρόλυσης του. Η ζελατίνη αποτρέπει την μεταφορά οξυγόνου, υγρασίας και λιπαρών και δρουν ως μεταφορείς βιοδραστικών ουσιών όπως αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακές ενώσεις. Στην αγορά χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα και συμπληρώματα αθλητικής διατροφής ως μέσο ενθυλάκωσης βιταμινών, συνενζύμων και καλών λιπαρών (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.4.3 Πρωτεΐνες γάλακτος

Οι κυριότερες πρωτεΐνες του γάλακτος είναι οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες του ορού. Και από τις δύο είναι ικανή η δημιουργία βρώσιμων ινών επικάλυψης τροφίμων. Οι δεύτερες, έχουν χρησιμοποιηθεί στην προστασία σολομού και φιστικιών από οξυγόνο και γενικότερα την οξείδωση. Ακόμη έχει παρατηρηθεί πως η προσθήκη ασκορβικού οξέος μέσα στις πρωτεΐνες ορού δρα σημαντικά στην απορρόφηση του οξυγόνου αποτρέποντας το να τις διαπεράσει και να βλάψει το τρόφιμο. Τέλος οι πρωτεΐνες γάλακτος κατά την επικάλυψη κοτόπουλων έχουν δείξει ότι μειώνουν σημαντικά την πρόσληψη ελαίου κατά το τηγάνισμα σε ποσοστό έως και 30% (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.4.4 Ζεΐνη

Η ζεΐνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του καλαμποκιού. Ανήκει στις προλαμίνες και είναι διαλυτή σε διαλύματα αλκοόλης 70-80% και πυκνά διαλύματα οξέων και βάσεων ενώ στο νερό είναι αδιάλυτη. Παράγεται ως σκόνη από την γλουτένη καλαμποκιού. Σε γενικές γραμμές οι μεμβράνες ζεΐνης λόγω ύπαρξης μη πολικών αμινοξέων έχουν καλή διαπερατότητα σε υδρατμούς. Είναι από τις λίγες πρωτεΐνες στην αγορά που έχει

χρησιμοποιηθεί με εμπορική επιτυχία ως υλικό επικάλυψης προστατεύοντας από το οξυγόνο και την υγρασία (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.5 Μεμβράνες από σύνθετα υλικά

Οι μεμβράνες από σύνθετα υλικά προήλθαν από την ανάγκη για εκμετάλλευση συμπληρωματικών ιδιοτήτων των υλικών και για αντιμετώπιση μειονεκτημάτων τους μέσω συμπληρωματικότητας. Τα πολικά πολυμερή όπως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες είναι καλοί φραγμοί σε αέρια και παρέχουν καλή μηχανική στήριξη, ωστόσο είναι ευαίσθητα σε υγρασία και υδρατμούς. Αντίθετα τα λιπίδια ως μεμβράνες είναι αποτελεσματικά έναντι διαπερατότητας σε υγρασία αλλά οι μηχανικές τους ιδιότητες δεν είναι ιδανικές. Επομένως ο συνδυασμός των ιδιοτήτων των πολικών συστατικών αλλά και μη πολικών συστατικών θα ήταν η ιδανική λύση στην δημιουργία μεμβράνης που θα έχει τα πλεονεκτήματα όλων των ουσιών που χρησιμοποιούνται. Οι μεμβράνες από σύνθετα υλικά που έχουν μελετηθεί αποτελούνται από ένα στρώμα λιπιδίων υποστηριζόμενο από ένα στρώμα πρωτεϊνών ή πολυσακχαριτών ή από διασπαρμένα λιπίδια σε στρώμα πρωτεϊνών ή πολυσακχαριτών. Ο συνδυασμός μεμβρανών πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών με βρώσιμους κηρούς ή λιπαρά οξέα έχει αποτελεσματικές ιδιότητες στον φραγμό της υγρασίας. Επομένως, ο κατάλληλος συνδυασμός υλικών στην δημιουργία σύνθετων μεμβρανών εκτός από χρήσιμος είναι και απαραίτητος ώστε να αξιοποιούνται στον μέγιστο βαθμό όλες οι χρήσιμες ιδιότητες που μπορεί να προσδώσει μία συσκευασία (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.6 Πρόσθετα μεμβρανών

#### 6.6.1 Πλαστικοποιητές

Οι πλαστικοποιητές προστίθενται στα περισσότερα εδώδιμα φιλμ με σκοπό να βελτιώσουν την ευκαμψία και την ανθεκτικότητα. Σε αυτούς ανήκουν μόνο, δι, και ολιγοσακχαρίτες, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, σιρόπια, πολυόλες, σορβιτόλη, γλυκερίνη, λιπίδια όπως φωσφολιπίδια και λιπαρά οξέα (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.6.2 Γαλακτωματοποιητές

Οι γαλακτωματοποιητές είναι ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό και την σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, δηλαδή της διασποράς μία ουσίας μέσα σε μία άλλη όπου υπό κανονικές συνθήκες δεν θα ήταν δυνατή η ανάμιξη τους. Επομένως είναι ουσίες πολύ σημαντικές για την σταθερότητα και την διαβρεξιμότητα της μεμβράνης. Ο κύριος ρόλος χρήσης γαλακτωματοποιητών είναι ανάμιξη λιπιδίων σε υδατικά διαλύματα πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών. Οι συνηθέστερα

χρησιμοποιούμενοι γαλακτωματοποιητές είναι η λεκιθίνη, εστέρες της γλυκερίνης, πρόσθετα πολυσορβικού, μονοελαϊκή σορβιτάνη αλλά και κάποιες πρωτεΐνες (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.6.3 Αντιμικροβιακές ουσίες

Μία από τις σπουδαιότερες καινοτομίες την δημιουργία βρώσιμων φιλμ είναι η ενθυλάκωση αντιμικροβιακών ουσιών έναντι βακτηριδίων αλλά και μυκήτων ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των τροφίμων. Οι συνηθέστερες αντιμικροβιακές ενώσεις είναι οργανικά οξέα, χιτοζάνη, αιθέρια έλαια, νισίνη, και ορισμένα εκχυλίσματα φυτών. Για να χρησιμοποιηθεί μία τέτοια ουσία στην συσκευασία πρέπει να έχει εξεταστεί προηγουμένως η αποτελεσματικότητα της ουσίας στα μικρόβια που θέλουμε να αμυνθεί το τρόφιμό μας, αλλά και να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση της ουσίας με την ίδια την συσκευασία, καθώς μπορεί το υλικό του βιοφίλμ να αδρανοποιήσει την αντιμικροβιακή ουσία. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα από την χρήση αντιμικροβιακών ουσιών εντός του βιοφίλμ είναι η προστασία του από μικρόβια τα οποία προσκολλώνται στην επιφάνεια του τροφίμου κατά την επεξεργασία και διανομή του. Επομένως συσκευασίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες μπορούν να αυξήσουν την διάρκεια ζωής καθόλη την διάρκεια ζωής του τροφίμου καθιστώντας το θρεπτικά άρτιο αλλά και ασφαλές για κατανάλωση (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.6.4 Νανοϋλικά

Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία και τα νανοϋλικά έχουν γίνει πολύ δημοφιλή ως αντικείμενο ακαδημαϊκής έρευνας. Η νανοτεχνολογία έχει δείξει πως μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία συνθετικών πολυμερών. Τα νανοςύνθετα που χρησιμοποιούνται πρόκειται για ανόργανες ενώσεις κυρίως αργίλου από μέγεθος 10-1000nm\*1nm και μπορούν να συνδυαστούν με όλα τα πολυμερή. Η χρήση νανοςύνθετων υλικών στις εδωδιμες συσκευασίες έχει δείξει βελτιωμένη διατήρηση γεύσης, οσμής, υφής και χρώματος ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιμικροβιακών ουσιών και προσθέτων (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

## 6.7 Μέθοδοι παραγωγής

### 6.7.1 Χύτευση διαλύματος

Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε μία πολύ απλή αρχή η οποία είναι : Υδατικό ή αιθανολικό ή υδατικό-αιθανολικό διάλυμα της εδωδιμης ουσίας απλώνεται πάνω σε λεία επιφάνεια και παραμένει εκεί έως ότου εξατμιστεί ο διαλύτης και παραμένει η στερεά μεμβράνη

η οποία μετέπειτα αφαιρείται. Αυτή η μέθοδος σε εργαστηριακό επίπεδο περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες. Αρχικά θα προετοιμαστεί το διάλυμά μας που θα περιέχει τα υδατοδιαλυτά πολυμερή, πλαστικοποιητές, γαλακτωματοποιητές, χρωστικές ουσίες, γλυκαντικές ουσίες και ουσίες γεύσης, και θα γίνει πολύ καλή ανάδευση ώστε οι ουσίες να ομογενοποιηθούν. Εάν κριθεί απαραίτητο θα προστεθεί και γαλακτωματοποιητής κυρίως σε περιπτώσεις προσθήκης λιπιδίων. Αφού φτιαχτεί το διάλυμα αυτό θα τοποθετηθεί σε θάλαμο κενού ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας που έχει εγκλωβιστεί στο φιλμ και προκαλεί ανεπιθύμητες μεταβολές στην συσκευασία. Στην συνέχεια τα διαλύματα αποτίθενται πάνω σε επίπεδες πλάκες από γυαλί, η πλαστικό και απλώνονται ώστε να αποκτήσουν στρώμα με ομοιόμορφο πάχος. Στην συνέχεια οι πλάκες αυτές τοποθετούνται σε κλιβάνους θερμού αέρα για ξήρανση και μετέπειτα αφαιρούνται από τις επιφάνειες. Σημαντικοί παράμετροι στην επιτυχία της χύτευσης είναι η σύσταση του διαλύματος, η περιεκτικότητα σε στερεά, το ιξώδες, το πάχος, και η θερμοκρασία ξήρανσης (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.7.2 Εξώθηση

Οι θήκες για λουκάνικα και περιτυλίγματα κρεατικών από κολλαγόνο παράγονται με εξώθηση υδατικού αιωρήματος καθαρού και οξυνισμένου κολλαγόνου σε λουτρό εξουδετέρωσης και θρόμβωσης και ακολουθεί έκπλυση, πλαστικοποίηση και ξήρανση (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

#### 6.7.3 Χύτευση τήγματος

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται συνήθως σε μεμβράνες και επικαλύψεις λιπιδίων και γίνεται μέσω ψύξης της τηγμένης ουσίας ώστε να αποκτήσει μία σταθερή δομή. Οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει αυτή η μέθοδος είναι οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται, το πάχος του φιλμ και η ικανότητά συγκόλλησής του σε επιφάνειες (Σ. Ε. Παπαδάκης, 2010).

### 6.8 Μελέτες περιπτώσεις εδώδιμων συσκευασιών τροφίμων

#### 1<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Οι αρθρογράφοι (Molnar et al., 2023) αποφάσισαν να ασχοληθούν με τα μπισκότα και πιο συγκεκριμένα να βρουν τρόπο να αυξήσουν την διάρκεια ζωής τους, την ποιότητά τους και την φρεσκάδα τους καθώς λόγω υψηλού περιεχομένου σε λίπος είναι πολύ ευπαθή σε ατμοσφαιρικούς παράγοντες όπως υγρασία και οξυγόνο. Έτσι λοιπόν εστίασαν την μελέτη τους στην δημιουργία εδώδιμης συσκευασίας που αποτελείται από χιτοζάνη μέσα στην οποία έχει ενθυλακωθεί εκχύλισμα από σταφυλιού το οποίο

προέρχεται από απόβλητα σταφυλιού. Το εκχύλισμα σταφυλιού είναι πλούσιο σε φυτοχημικά τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά καταπολεμώντας ως ένα βαθμό τις αρνητικές επιδράσεις του οξυγόνου, έχουν αντιμικροβιακή δράση και συντελούν στην βελτίωση της υγείας λόγω βιοδραστικών συστατικών.

Υλικά και μέθοδοι :

Υλικά για την δημιουργία συσκευασίας :

- Χιτοζάνη
- Αραβικό κόμμι
- Εκχύλισμα σταφυλιού (ολικά φαινολικά 90% εκφρασμένα ως γαλλικό οξύ)
- Οξικό οξύ
- Απεσταγμένο νερό
- Γλυκερόλη

Υλικά για την παρασκευή μπισκότων :

- Αλεύρι ολικής άλεσης (12% πρωτεΐνη)
- Νιφάδες βρώμης (13.5% πρωτεΐνη)
- Σκόνη κακάο (20% λιπαρά)
- Μαργαρίνη (70% λιπαρά)
- Στέμφυλα, αρόνια, και πολτός μύλου για γεύση αποξηραμένα σε σκόνη

Δημιουργία βιοφίλμ :

Κατασκευάστηκαν 2 είδη φιλμ. Ένα πρότυπο που περιέχει όλα τα υλικά εκτός από εκχύλισμα σταφυλιού και ένα φιλμ με εκχύλισμα σταφυλιού. Για την παρασκευή των φιλμ 2 γραμμάρια χιτοζάνης σε σκόνη διαλύθηκαν σε 1% (v/v) υδατικού διαλύματος οξικού οξέος. Παράλληλα φτιάχτηκε ένα υδατικό διάλυμα αραβικού κόμμεος 5% (w/v). Τα δύο αυτά διαλύματα αναδεύτηκαν το καθένα με μαγνητικό αναδευτήρα. Το εκχύλισμα σταφυλιού διαλύθηκε στο διάλυμα του αραβικού κόμμεος πάλι υπό ανάδευση με μαγνήτη. Στην συνέχεια όλα τα διαλύματα, και της χιτοζάνης και το κόμμεος αναμίχθηκαν . Σημείωση : Μία ποσότητα διαλύματος αραβικού κόμμεος δεν περιείχε εκχύλισμα σταφυλιού για την δημιουργία πρότυπων φιλμ. Στην συνέχεια στα μίγματα προστέθηκε γλυκερόλη σε ποσοστό 20% του βάρους του πολυμερούς. Από τα μίγματα αυτά πάρθηκαν κάθε φορά από 20 γραμμάρια υγρού διαλύματος τα οποία απλώθηκαν σε τρυβλία Petri όπου και ξηράθηκαν για 46 ώρες στους 25°C. Οι ξηρές

πλέον μεμβράνες αποκολλήθηκαν με τσιμπιδάκι και αποθηκεύτηκαν μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Προετοιμασία μπισκότων :

Παρασκευάστηκαν 3 είδη μπισκότων. 1) μπισκότα πρότυπα χωρίς πολτό γεύσης, 2) μπισκότα με στέμφυλα και αρόνια και τέλος 3) μπισκότα με στέμφυλα και αρόνια επικαλυμμένα με πρότυπο βιοφίλμ αλλά και με βιοφίλμ με ενθυλακωμένο εκχύλισμα. Η συνταγή των μπισκότων περιλάμβανε 30% νιφάδες βρώμης, αλεύρι ολικής άλεσης 25,2%, μαργαρίνη 20%, καστανή ζάχαρη 13,5%, σκόνη κακάο 4,8%, βανιλίνη 3,5%, νερό βρύσης 2%, αλάτι 0,4%, baking powder 0,3%, διττανθρακικό νάτριο 0,3%. Στα μπισκότα με πολτό φρούτων οι αναλογίες διαμορφώνονταν ως εξής. Αντί για σκέτο κακάο έχουμε μίγμα κακάο 76,4%, στέμφυλα 17,5% και αρόνια 6,1%. Όλα τα υλικά προστέθηκαν μαζί και ανακατεύτηκαν. Η ζύμη έγινε ρολό και τα μπισκότα κόπηκαν σε πάχος 5mm και διάμετρο 5cm. Τέλος ψήθηκαν σε φούρνο στους 180°C για 12 λεπτά.

Εφαρμογή εδώδιμης συσκευασίας στα μπισκότα :

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ψεκασμού. Σε ένα ψεκαστικό μπουκάλι τοποθετήθηκαν οι εδώδιμες συσκευασίες διαλυμένες σε νερό και ψεκάστηκαν πάνω στα μπισκότα τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 30 λεπτά ώστε να στεγνώσουν.

Αποτελέσματα :

Το πάχος των μεμβρανών με εκχύλισμα σταφυλιού ήταν διπλάσιο από τις πρότυπες μεμβράνες. Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι το πάχος του φιλμ επηρεάζει άμεσα την εμφάνιση και διαπερατότητα υδρατμών και αερίων. Η διαπερατότητα υγρασίας ήταν ελαφρώς υψηλότερη στα φιλμ που αποτελούνται από εκχύλισμα σταφυλιού ενώ τα φιλμ χωρίς εκχύλισμα είχαν μικρότερη διαπερατότητα. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικών μορίων. Ακόμη παρατηρήθηκε χαμηλότερη παρεμπόδιση υδρατμών στο φιλμ με εκχύλισμα και επομένως η αντιμικροβιακή δράση εδώ είναι σαφώς μικρότερη. Όσον αφορά την απορρόφηση φωτός τα μπισκότα επικαλυμμένα με φιλμ με εκχύλισμα έδειξαν αρκετά χαμηλότερη απορρόφηση γεγονός που σημαίνει πως οι αντιδράσεις φωτό-οξειδωσης μειώνονται.

Όσον αφορά την οπτική εικόνα, με το μάτι ο καταναλωτής μπορεί να αντιληφθεί το εκχύλισμα σταφυλιού καθώς χρωματίζει έντονα τις μεμβράνες προς σκοτεινές αποχρώσεις. Αναφορικά με το ιξώδες, το εκχύλισμα το αυξάνει.

Η μέτρηση της φρεσκάδας από τους καταναλωτές εκτιμήθηκε παρόμοια για όλα τα είδη μπισκότων. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο παραδόξως ήταν χαμηλότερο στα βιοφίλμ με εκχύλισμα και ίσως οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ουσιών.

Όσον αφορά την διάρκεια ζωής, τα μπισκότα πρέπει να έχουν χαμηλότερη από 5% υγρασία για να είναι μικροβιολογικά ασφαλή. Όλα τα μπισκότα των πειραμάτων με όλες τις επικαλύψεις διατήρησαν ικανοποιητική υγρασία για 3 μήνες. Ωστόσο ο δείκτης PV που εκφράζει την οξείδωση λιπιδίων ήταν υψηλότερος για τα μπισκότα με εκχύλισμα.

Τέλος, οι ιδιότητες αίσθησης και αφής των μπισκότων σε πραγματικό χρόνο, έδειξαν πως τα πρότυπα μπισκότα μετά από 6 μήνες εμφάνισαν μία ταγγή οσμή που σηματοδοτεί στην ανάπτυξη δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, ενώ τα μπισκότα που περιείχαν πολύ φρούτων και βιοφίλμ απέξω, είχαν περιθώριο χρόνου για να φτάσουν στην κατάσταση των προτύπων ακατάλληλων πλέον μπισκότων.

### 2<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Το άρθρο των (Wu et al., 2022) έχει ως θέμα την χρήση πηκτίνης από εσπεριδοειδή ως βάση στην δημιουργία εδώδιμης μαζί με προσθήκη νανοϊνών κυτταρίνης ως ενισχυτικό παράγοντα. Αυτός ο συνδυασμός σχημάτισε ένα αεροτζέλ το οποίο πρόκειται για pickering γαλάκτωμα μέσα στο οποίο ενθυλακώθηκε θυμόλη και χρησιμοποιήθηκε στην επικάλυψη μανιταριών. Παρατηρήθηκε πως το τζελ με νανοϊνες κυτταρίνης έχει μεγαλύτερο μέγεθος σταγονιδίων, ωστόσο έχει βελτιωμένες ιδιότητες του ιξώδους αλλά και της γαλακτωματοποιητικής του δράσης.

Υλικά :

- Πηκτίνη 61.3% μεθυλεστεροποιημένη
- Νανοϊνες κυτταρίνης από βαμβάκι διαμέτρου 6.8nm και μήκος 1000nm
- Άνυδρο χλωριούχο ασβέστιο
- Θυμόλη
- Σογιέλαιο
- Λευκά μανιτάρια
- Απεσταγμένο νερό

Προετοιμασία του αεροτζέλ :



Η πηκτίνη διαλύθηκε μέσα σε απεσταγμένο νερό ενώ παράλληλα προστέθηκαν νανοΐνες κυτταρίνης δημιουργώντας έτσι μικτό διάλυμα πηκτίνης-νανοΐνων. Διάλυμα της θυμόλης διαλύθηκε σε διάλυμα σογιέλαιου με αναλογία σογιέλαιο/νερό να είναι 1/10 . Αφού αναμίχθηκαν όλα τα διαλύματα μεταξύ τους, προστέθηκε χλωριούχο ασβέστιο και έγινε ανάδευση στις 12.000rpm για 4 λεπτά. Το τελικό διάλυμα χύθηκε σε καλούπι μορφής κυλίνδρου και αφέθηκε σε ηρεμία για να σχηματιστεί το τζελ. Στο τέλος το τζελ καταψύχθηκε και λυοφιλοποιήθηκε.

Αποτελέσματα :

Η εφαρμογή του τζελ για την επικάλυψη λευκών μανιταριών (*Agaricus bisporus*) έδειξε μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι *Staphylococcus aureus* συγκριτικά με *E.coli*. Η θυμόλη η οποία είναι και η δραστική ουσία ενάντια των μικροοργανισμών απελευθερώνεται στα πρώτα 100 εφαρμογής που μάλλον οφείλεται σε παραλαβή υγρασίας του αεροτζέλ. Παρόλα αυτά, ακόμη και με πλήρη διάλυση της δομής του αεροτζέλ η θυμόλη δεν διαλύθηκε πλήρως που σημαίνει ότι ένα ποσοστό υπάρχει ακόμα μέσα σε σταγονίδια του γαλακτώματος και οφείλεται στην αναλογία πηκτίνης προς νανοΐνες. Αυτό σηματοδοτεί πως εάν μεταβληθούν οι αναλογίες των πολυμερών αυτών θα αλλάξει και ο χρόνος διασποράς και απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων αντιμικροβιακών συστατικών. Τέλος, η σκληρότητα, το χρώμα, η περιεκτικότητα σε φαινόλες, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών διατηρήθηκαν και η φρεσκάδα επεκτάθηκε για επιπλέον πέντε ημέρες.

### 3<sup>η</sup> Μελέτη περίπτωσης

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει το πλεονέκτημα της χρήσης βρώσιμων μεμβρανών πηκτίνης στην διατήρηση φρούτων και λαχανικών. Τα ευρήματα δείχνουν ότι οι μεμβράνες αυτές λειτουργούν ως φραγμοί της επιφάνειας, γεγονός που επιτρέπει την καλύτερη συγκράτηση υγρασίας, καθυστέρηση εισχώρησης και εκβολής αερίων αλλά και παράτασης της διαδικασίας ωρίμανσης αυξάνοντας έτσι την φρεσκάδα και διάρκεια ζωής τους. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στον εμπλουτισμό των εδώδιμων μεμβρανών πηκτίνης μέσω ενθυλάκωσης αιθέριων ελαίων και άλλων πολυσακχαριτών τα οποία φαίνεται ότι παρατείνουν την διάρκεια ζωής. Η έρευνα των (Rohasmizah & Azizah, 2022) μελετάει το φαινόμενο της ενθυλάκωσης και κατά πόσο αυτό επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των φρούτων και λαχανικών.

Εφαρμογή βιοφίλμ πηκτίνης και επιδράσεις :

Ένα βιοφίλμ αποτελούμενο από πηκτίνη διαμορφώνεται μέσω ξήρανσης της πηκτίνης και στην συνέχεια διάλυσής της υπό ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να προσλάβει στο μόριό της νερό και να σχηματίσει τζελ. Ο σχηματισμός τζελ εξαρτάται κυρίως από τον βαθμό εστεροποίησης του πολυγαλακτουρονικού οξέος. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν κάνει χρήση βιοφίλμ πηκτίνης στο οποίο έχει ενθυλακωθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης. Τα αποτελέσματα μικροβιολογικών εξετάσεων φανέρωσαν πως το φίλμ αυτό μειώνει τον πληθυσμό μυκήτων και παράλληλα αύξησε την αντιοξειδωτική δράση ντοματών που ήταν επικαλυμμένες από το φίλμ. Επιπρόσθετα, η πηκτίνη με άμυλο καλαμποκιού αλλά και σκόνη παντζαριού βελτίωσε την αισθητηριακή αποδοχή ντοματών καθώς οι ντομάτες μετά από αποθήκευση είχαν ελάχιστες εκδορές στην επιφάνεια, είχαν μεγάλη γυαλάδα και είχαν αυξημένο προσδόκιμο ζωής. Ωστόσο, η εφαρμογή βιοφίλμ πηκτίνης σε φράουλες δεν έδειξε κανένα πλεονέκτημα ενώ σε κομμάτια από πεπόνι που έχει κοπεί η πηκτίνη προκάλεσε γρηγορότερη μικροβιολογική αλλοίωση.

Όσον αφορά την ασφάλεια της πηκτίνης, ο FDA δεν αναφέρει ενδεικτικές επιστημονικές για την ποσότητα που επιτρέπεται σε ένα τρόφιμο, παρα μόνο καλές πρακτικές χρήσεις όπως καθαρές πρώτες ύλες αλλά και ορθό χειρισμό. Γενικότερα τα πολυμερή χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην βιομηχανία τροφίμων, είναι μη τοξικά, βιοδιασπώμενα και συνεπώς δεν τίθεται θέμα αν σκεφτεί κανείς ότι τα φρούτα και λαχανικά έχουν εκ φύσεως πηκτίνες.

Εν κατακλείδι, η πηκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τροφίμων ως γαλακτωματοποιητής, πηκτωματοποιητής, σταθεροποιητής. Η χαρακτηριστική υδροφιλία και συνεπώς η έλξη υγρασίας προς αυτήν την καθιστά ικανή να ασφαλίσει το τρόφιμο και η αποφυγή νερού και υδρατμών να ελαχιστοποιείται. Το μεγάλο ενδιαφέρον ωστόσο είναι η εφαρμογή πηκτίνης στην δημιουργία εδώδιμων επικαλύψεων οι οποίες είναι γαλακτώματα. Ο λόγος είναι πως οι μελέτες δείχνουν ότι η χρήση στρώσεων λιπιδίων παράλληλα με την πηκτίνη έχουν καλύτερες ιδιότητες φραγμού του νερού. Ακόμη, μέσω νανογαλακτωμάτων είναι πιο εύκολη η ενθυλάκωση και η σταδιακή απελευθέρωση δραστικών ουσιών οι οποίες αυξάνουν την διατροφική ή βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων. Οι έρευνες έχουν εστιάσει στην αντιμικροβιακή δράση τέτοιων γαλακτωμάτων όπου τα αποτελέσματα ήταν πολύ

ενθαρρυντικά, ωστόσο θα πρέπει να γίνουν μελέτες τοξικότητας αλλά και αισθητηριακές αναλύσεις για να διαπιστωθεί το ποσοστό αποδοχής του τροφίμου από τον καταναλωτή.

## Πειραματικό μέρος

Το θέμα της παρούσας μελέτης είναι η φυσικοχημική και βιοτεχνολογική αξιοποίηση υποπροϊόντων τροφίμων στην παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας σύμφωνα με τα πλαίσια της κυκλικής και πράσινης οικονομίας. Πιο συγκεκριμένα η παρούσα μελέτη έχει σκοπό να αναδείξει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες ενός βιοφίλμ που αποτελείται από πηκτίνες πορτοκαλιών και από πολυσακχαρίτες μανιταριών κυρίως β-γλυκάνης. Οι πηκτίνες προήλθαν από φλούδες πορτοκαλιών τα οποία φαγώθηκαν εντός διατροφής και επομένως οι φλούδες ως οργανικό απόβλητο αντί να πεταχτούν στα σκουπίδια χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή πηκτινών με αποτέλεσμα να γίνεται 100% αξιοποίηση αποβλήτου με μηδενικό κόστος δεδομένου πως οι φλούδες δεν αγοράστηκαν. Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες, αυτοί προήλθαν μέσω καλλιέργειας μύκητα *Schizophyllum commune* σε υπόστρωμα γλυκόζης όπου έναντι γλυκόζης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και κάποιο απόβλητο ως πηγή ενέργειας. Τέλος αναφορικά με την παραγωγή των πολυσακχαριτών, μία καινοτομία η οποία θα περιγραφεί και στα επόμενα κεφάλαια είναι η εκχύλιση εξωπολυσακχαρίτη χωρίς χρήση οργανικού διαλύτη πάρα μόνο με την μέθοδο παγώματος και ξεπαγώματος του υγρού που περιέχει τους πολυσακχαρίτες.

## 7. Εκχύλιση πηκτίνης από πορτοκάλια

### 7.1 Εισαγωγή

Κατά την εκχύλιση των πηκτινών αποφασίστηκε η μέθοδος που θα ακολουθηθεί να αποτελέσει μία καινοτομία τόσο στον επιστημονικό τομέα των τροφίμων όσο και στην ίδια σχολή στην οποία έλαβε χώρα η πειραματική διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα η εκχύλιση των πηκτινών από φλούδες πορτοκαλιού έγινε μέσω της χρήσης συσκευής υπερήχων έναντι της κοινής εκχύλισης υπό θέρμανση. Αυτή η απόφαση επιδρά αρχικά προς το συμφέρον της σχολής καθώς γίνεται χρήση μηχανήματος υπερήχων από φοιτητή αξιοποιώντας έτσι όλο τον εργαστηριακό εξοπλισμό που διαθέτουν τα εργαστήρια γεγονός που συνδέεται με την απόκτηση εμπειρίας τόσο θεωρητικά όσο και πρακτικά του φοιτητή με τέτοιου είδους μηχανήματα. Μετέπειτα η χρήση υπερήχων έναντι θερμότητας εξυπηρετεί στην εξοικονόμηση ενέργειας της τάξεως 20% που θα δαπανιόταν για την θέρμανση του υγρού εκχύλισης. Τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά και επομένως δίνεται η σκυτάλη για την χρήση των υπερήχων και σε άλλες πειραματικές διαδικασίες.

## 7.2 Υλικά και αντιδραστήρια

- Πορτοκάλια για φάγωμα
- Σαπούνι
- Μαχαίρι για καθάρισμα φλούδας
- Ταψάκι αλουμινίου
- Ηλεκτρικός αναδευτήρας με λεπίδες (μπλέντερ)
- Άνυδρο κιτρικό οξύ σε σκόνη
- Πλαστικά φιαλίδια με καπάκι
- Ζυγός ακριβείας
- Πεχάμετρο
- Φιάλες durhan
- Υάλινη ράβδος
- Σταγονόμετρο
- Απεσταγμένο νερό
- Υδροβολέας
- Συσκευή παραγωγής υπερήχων
- Παγάκια απεσταγμένου νερού
- Ποτήρια ζέσεως
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή φυγόκεντρου
- Αιθανόλη absolute 99.8%
- Ξηραντήρας
- Οικιακό ψυγείο
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης

## 7.3 Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση πηκτινών με την βοήθεια υπερήχων βασίστηκε στο άρθρο των (Patience et al., 2021). Από το τοπικό σούπερ μάρκετ της γειτονιάς αγοράστηκαν κοινά πορτοκάλια κατα προτίμηση για φάγωμα με χοντρή φλούδα και όσο το δυνατόν πιο άγουρα ώστε να έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πηκτίνη. Τα πορτοκάλια πλύθηκαν εξωτερικά με σαπουνόνερο ώστε να απομακρυνθούν οποιαδήποτε ορατή και μη βρωμιά. Αφού πλύθηκαν στην συνέχεια ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για απομακρυνθούν τελείως ιόντα και μόρια της

ατμόσφαιρας και του απορρυπαντικού. Με ένα κοφτερό μαχαίρι και με πολύ προσοχή αφαιρέθηκαν οι φλούδες σιγά σιγά ώστε το μαχαίρι να μην πληγώσει την σάρκα του πορτοκαλιού και χυθούν έξω οι χυμοί οι οποίοι περιέχουν αιθέρια έλαια, πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικά. Οι φλούδες συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αλουμινένια ταψάκια φαγητού μίας χρήσης και τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα στους 40 με 45°C βαθμούς έως ότου στεγνώσουν (δύο 24ωρα). Μετά από δύο μέρες στεγνώματος οι φλούδες μας ήταν ικανές να θρυμματιστούν. Με έναν ηλεκτρικό αναδευτήρα που φέρει λεπίδες ισχύος 200watt οι φλούδες αλέστηκαν όσο το δυνατόν περισσότερο και η σκόνη συλλέχθηκε σε πλαστικά σωληνάκια με καπάκι και διατηρήθηκαν στο ψυγείο μέχρι την χρήση τους στην εκχύλιση.



*Εικόνα 6 Αγορά πορτοκαλιών*



Εικόνα 7 Καθαρισμός φλούδας και ξήρανση



*Εικόνα 8 Ηλεκτρικός αναδευτήρας*



*Εικόνα 9 Άλεσμα ξηρής φλούδας*

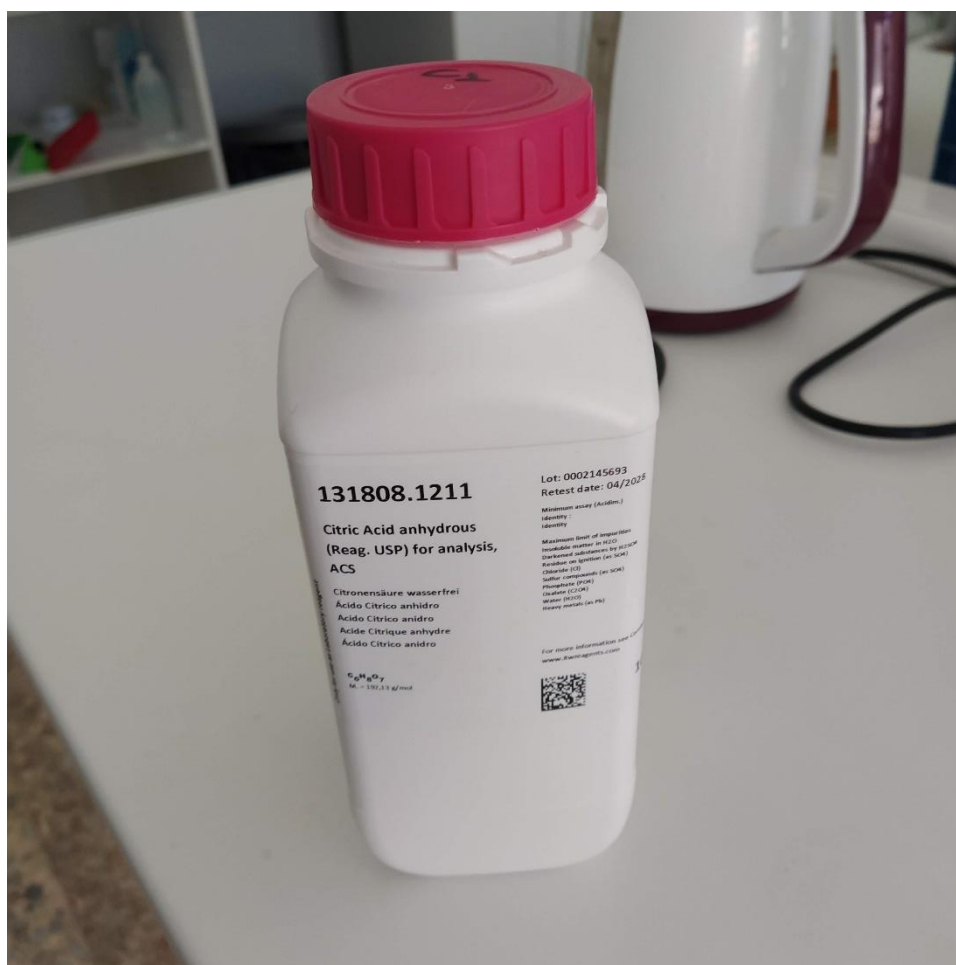




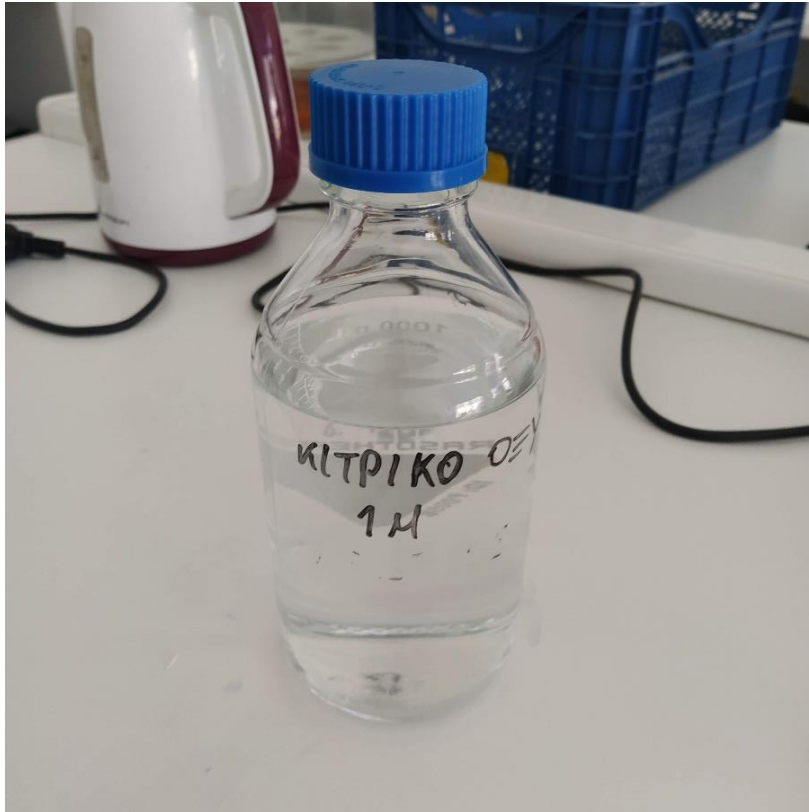
*Εικόνα 10 Τοποθέτηση σκόνης φλούδας στο ψυγείο*

Παράλληλα με την ξήρανση των φλουδών παρασκευάστηκε όξινο διάλυμα κιτρικού οξέος που θα χρησιμοποιηθεί για να ρίξει το pH τις εκχύλισης στο 2 με 3. Εν αντιθέσει με το άρθρο χρησιμοποιήθηκε κιτρικό οξύ έναντι νιτρικού οξέος διότι η πηκτίνη προορίζεται για βιοφίλμ τροφίμων και το κιτρικό οξύ είναι φυσικό συντηρητικό και οι πιθανότητες κατάλοιπα του οξέος να δημιουργήσουν αλλεργίες είναι μηδαμινές. Χρησιμοποιήθηκε σκόνη άνυδρου κιτρικού οξέος με Mr ίσο με 193,13g/mol. Οπότε και αποφασίστηκε να φτιαχτεί ένα μεγάλο διάλυμα κιτρικού οξέος συγκέντρωσης 1M ώστε να υπάρχει έξτρα ποσότητα σε περίπτωση που χρειαστεί. Για την δημιουργία του 1M διαλύματος κιτρικού χρειάστηκε μία μεγάλη φιάλη Durhan του ενός λίτρου όπου προστέθηκε εντός φιάλης 193,13g σκόνης άνυδρου κιτρικού οξέος και στην συνέχεια προστέθηκε ακριβώς ένα λίτρο απιονισμένο νερό. Στην αρχή θέλαμε να διαπιστώσουμε αν όντως πράγματι η μεθοδολογία λειτουργεί επομένως διενεργήθηκε μία πιλοτική δοκιμή. Από τα σωληνάκια με ξηρή σκόνη φλούδας 2g τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και

προστέθηκε νερό με αναλογία 1g σκόνης σε 50ml νερού η οποία κρίνει ο αρθρογράφος ότι είναι η βέλτιστη. Επομένως στα 2g σκόνης προστέθηκαν 100ml απιονισμένου νερού. Στο διάλυμα αυτό έγινε μία πρώτη μέτρηση του pH μέσω ενός εργαστηριακού πεχαμέτρου το οποίο προηγουμένως είχε καλιμπραριστεί. Η ένδειξη πως έδειξε ήταν 4,71 που θεωρείται λογικό διότι οι φλούδα περιέχει ποσότητες ασκορβικού και κιτρικού οξέος ικανές να ρίξουν το pH. Με βάση την βιβλιογραφία που ακολουθήσαμε το pH έπρεπε να φτάσει από 2 έως 3 και σε καμία περίπτωση κάτω από 2 διότι οι ομάδες μεθυλίου διασπώνται. Η πεχαμετρική ακίδα τοποθετήθηκε στο διάλυμα νερού-σκόνης και με την βοήθεια μίας πλαστικής πιπέτας Pasteur του 1ml παίρνονταν σταγόνες από το διάλυμα κιτρικού και ρίχνονταν μέσα στο διάλυμα σκόνης-νερού μετρώντας παράλληλα με το πεχάμετρο έως ότου η ένδειξη πέσει κάτω από 3. Το pH του διαλύματος έφτασε στο 2,63 και διακόπηκε η χορήγηση οξέος.



Εικόνα 11 Άνυδρο κιτρικό οξύ



Εικόνα 12 Διάλυμα κιτρικού οξέος 1M



Εικόνα 13 Ρύθμιση του pH μεταξύ 2 και 3

Το επόμενο βήμα είναι η επίδραση των υπερήχων. Συνεπώς το πλέον διάλυμα σκόνης-κιτρικού μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου βρίσκεται η συσκευή υπερήχων για να γίνει πρώτη δοκιμή. Ασφαλώς, στον χώρο αυτό υπήρχαν μόνο οι ερευνητές που πραγματοποιούσαν την εργαστηριακή άσκηση και φορούσαν ωτοασπίδες και κατά την διάρκεια της χρήσης υπερήχων βρίσκονταν σε μακρινή ακτίνα. Το μηχάνημα υπερήχων ήταν με ακίδα. Επομένως η φιάλη που περιείχε την σκόνη με το διάλυμα κιτρικού τοποθετήθηκε κάτω από την ακίδα και η ακίδα μετατοπίστηκε προς τα κάτω ώστε να μπει εντός του διαλύματος γύρω στο ένα εκατοστό βάθος. Το set up της συσκευής ρυθμίστηκε κατάλληλα και ξεκίνησε η παραγωγή υπερήχων από το στόμιο της ακίδας για μία ώρα. Μετά από μία και αφού η διαδικασία είχε ολοκληρωθεί η πρώτη εικόνα του διαλύματος φάνερωνε μία σιγουριά πως είχαν εκχυλιστεί οι πηκτίνες διότι το διάλυμα είχε θολώσει σε πολύ μεγάλο βαθμό. Όμως λόγω των υπερήχων η θερμοκρασία που έπιασε το διάλυμα έφτασε του 70°C το οποίο δεν είναι επιθυμητό διότι η παραγωγή πηκτίνης μπορεί να αποδοθεί στην χρήση θερμότητας ενώ η εργασία αυτή αποσκοπεί στην παραγωγή πηκτίνης χωρίς θερμότητα.



Εικόνα 14 Εκχύλιση μέσω υπερήχων

Το πλέον επεξεργασμένο με υπερήχους διάλυμα πέρασε στο στάδιο του καθαρισμού. Ο καθαρισμός έγινε μέσω διάταξης διήθησης υπό κενό ώστε να επιταχυνθεί η διαδικασία. Μετά από αρκετές ώρες αναμονής συλλέχτηκε σε φιάλη Durhan 65ml από το διαυγές διήθημα. Μέσα σε αυτό το διήθημα προστέθηκε αιθανόλη absolute σε ίσο όγκο δηλαδή 65ml. Με το που εισήλθε αιθανόλη στο διήθημα αυτό αμέσως έγινε διφασικό και στην επιφάνεια δημιουργήθηκαν πυκνές φυσαλίδες με ζελώδη υφή. Αυτό αμέσως σήμαινε πως η εκχύλιση πηκτίνης ήταν επιτυχής με την πρώτη ματιά λόγω του ζελώδους συμπλόκου που σχηματίστηκε. Η φιάλη τοποθετήθηκε στο ψυγείο για 24 ώρες με σκοπό να γίνει καλύτερος ο διαχωρισμός της πηκτίνης από το νερό.



Εικόνα 15 Διήθηση υπό κενό



*Εικόνα 16 Πρώτη παρατήρηση πηκτινών*

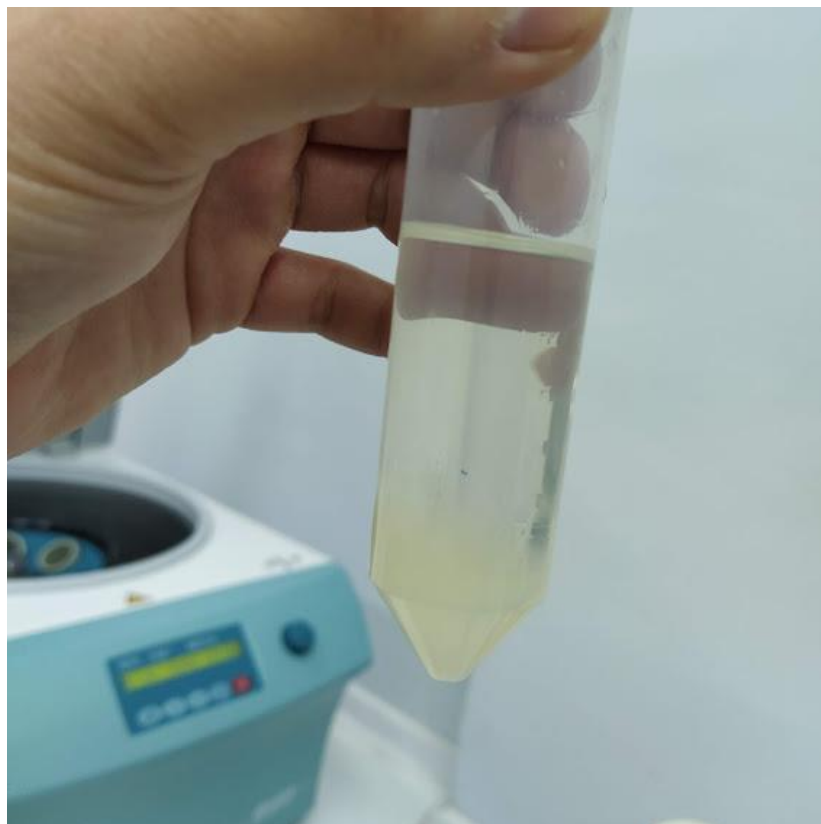
Αφού περάσανε οι 24 ώρες ψύξης το διάλυμα πηκτινών-αιθανόλης βγήκε από το ψυγείο και οδηγήθηκε για φυγοκέντριση. Για να γίνει η φυγοκέντριση το διάλυμα ανακινήθηκε με τα χέρια ώστε οι πηκτίνες να απλωθούν στο διάλυμα και το υγρό μοιράστηκε σε σωληνάκια φυγοκέντρισης. Τα σωληνάκια φυγοκεντρίθηκαν και οι πηκτίνες έκατσαν στον πάτο των πλαστικών σωλήνων. Οι παράμετροι της φυγοκέντρισης είναι 9000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο από τα σωληνάκια χύθηκε και το στερεό υπόλειμμα πηκτινών συγκεντρώθηκε σε ένα κοινό σωληνάκι. Οι πηκτίνες σε αυτό το σωληνάκι πλύθηκαν τρεις φορές με αιθανόλη για να καθαριστούν πλήρως από ξένες ουσίες. Αφού έγινε και η τρίτη πλύση οι νωπές πλέον πηκτίνες ζυγίστηκαν και οδηγήθηκαν για ξήρανση στους 35°C.



Εικόνα 17 Συσκευή φυγοκέντρησης

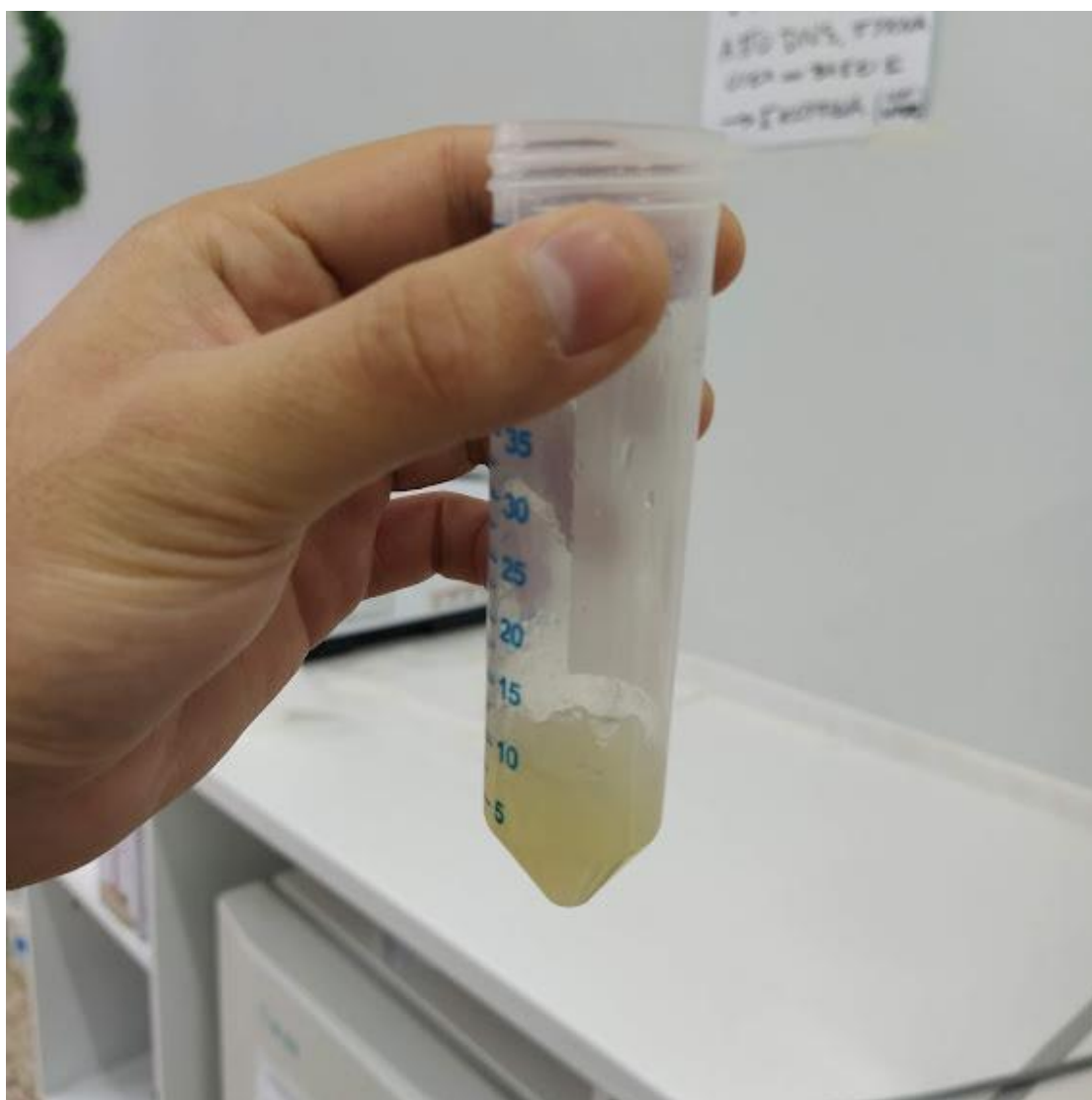


Εικόνα 18 Παραμέτροι φυγοκέντρησης



Εικόνα 19 Πρώτη φυγοκέντρηση





*Εικόνα 20 Συγκέντρωση όλης της πηκτίνης σε ένα σωληνάκι*



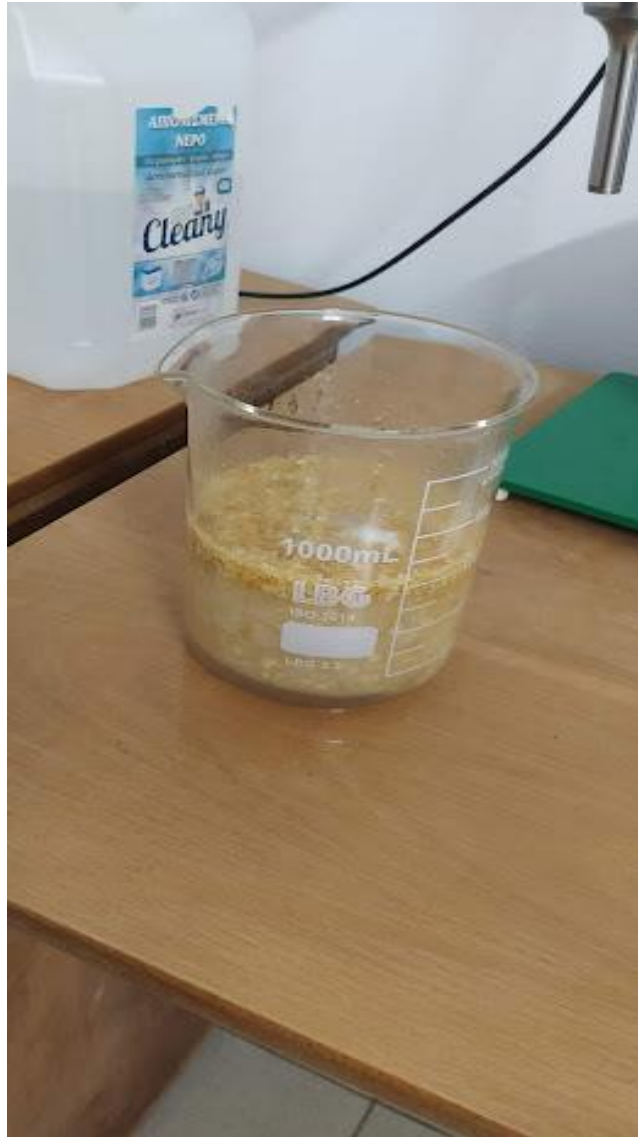
Εικόνα 21 Τελικώς εκτυλιγμένη πηκτίνη

Μόλις η νωπή πηκτίνη ξηράθηκε, οδηγήθηκε για μέτρηση στο FTIR ώστε να γίνει σίγουρο πως η ουσία είναι η πηκτίνη και πως η μεθοδολογία λειτουργεί. Η κορυφές των διαγραμμάτων έδειξαν όντως ότι πρόκειται για πηκτίνη και τα διαγράμματα θα αναλυθούν παρακάτω. Επομένως το επόμενο βήμα ήταν η παραγωγή περισσότερης ποσότητας πηκτίνης. Για να γίνει αυτό προστέθηκαν αυτή την φορά 20g σκόνης πορτοκαλιού σε 100ml νερού άρα η αναλογία σκόνης προς υγρό έγινε 2/50 ώστε να έχουμε μεγαλύτερη απόδοση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια δηλαδή πτώση του pH μέσω σταγόνων διαλύματος κιτρικού οξέος έως ότου το pH φτάσει 2 με 3 και μετέπειτα τοποθέτηση του διαλύματος σε διαδικασία υπερήχων. Αυτή την φορά ωστόσο για να εξαλειφθεί ο παράγοντας της θερμοκρασίας το δοχείο που περιέχει το διάλυμα οξέος με σκόνη φλούδας τοποθετήθηκε σε ανοξείδωτη λεκάνη του μηχανήματος υδρο-υπερήχων που έχει απεσταγμένο νερό συν παγοθήκες με

παγάκια απεσταγμένου νερού ώστε να ψύχουν το διάλυμα καθόλη την ώρα της εκχύλισης. Η θερμοκρασία του διαλύματος μετρήθηκε αμέσως μετά την επίδραση υπερήχων και ήταν 24°C, δηλαδή θερμοκρασία δωματίου που σημαίνει ότι πλέον η θερμοκρασία δεν θα επηρεάσει την εκχύλιση και οι πηκτίνες θα εκχυλιστούν μόνο μέσω επίδρασης υπερήχων.



Εικόνα 22 Ψυχρή εκχύλιση με υπερήχους



Εικόνα 23 Εκχυλισμένο διάλυμα πηκτινών

Αφού πραγματοποιήθηκε πάλι η διαδικασία των υπερήχων στο διάλυμα έγιναν ξανά όλες διαδικασίες που έγιναν και προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα στο διάλυμα έγινε διήθηση υπό κενό, στο διήθημα προστέθηκε αιθανόλη και παραμονή για 24 ώρες στο ψυγείο, φυγοκέντριση του διηθήματος για παραλαβή πηκτινών και αποξήρανση.

## 8. Παραγωγή β-γλυκανών από βιομάζα

### 8.1 Εισαγωγή

Οι β-γλυκάνες είναι ένας από τους κύριους πολυσακχαρίτες των μανιταριών. Οπότε αποφασίστηκε πως αντί για την αγορά έτοιμων μανιταριών από το σούπερ μάρκετ να γίνει μία εργαστηριακή καλλιέργεια μανιταριών ώστε η πειραματική εργασία να είναι πιο πλήρης και να αξιοποιεί πολλούς κλάδους επιστήμης συγχρόνως, δηλαδή

φυσικοχημεία για την παραγωγή πηκτίνης και βιοτεχνολογία για την ανάπτυξη και καλλιέργεια μανιταριών αλλά και κατά δεύτερον για να διαπιστωθεί και πειραματικά πως τα μανιτάρια σε εργαστηριακή καλλιέργεια μπορούν να αποδώσουν κλάσματα με υψηλό ποσοστό γλυκανών. Για την εργαστηριακή καλλιέργεια επιλέχθηκε το *Schizophyllum commune* ή αλλιώς μανιτάρι με σπασμένα βράγχια. Είναι ένα είδος βασιδιομύκητα που μπορεί να βρεθεί φυσικά στο περιβάλλον και αναπτύσσεται σε σάπιο ξύλο. Ονομάζεται σχιζόφυλλο επειδή ο σχηματισμός του αποτελείται από ακτινωτές και σπασμένες αμυχές σαν πτυχωτά βράγχια. Έλαβε την επιστημονική του ονομασία το 1815 και το 1930 ο γερμανός επιστήμονας Hans Knirr ανακάλυψε την σεξουαλική του αναπαραγωγή (Chowdhary et al., 2014). Ο λόγος που επιλέχθηκε ο *Schizophyllum commune* είναι πως αυτό το είδος βασιδιομύκητα είναι ικανό να αναπτυχθεί επάνω σε υποστρώματα τα οποία είναι απόβλητα τροφίμων και έχει παρατηρηθεί πως η ανάπτυξή του σε υπόστρωμα φλουδών μανταρινιού μπορεί να αποφέρει παραγωγή γλυκανών (Pilafidis et al., 2022) το οποίο είναι μία πολύ σημαντική ικανότητα καθώς πραγματοποιείται παραγωγή μεταβολιτών προστιθέμενης αξίας από υπόστρωμα που θα πετιόταν σε άλλη περίπτωση και συνεπώς παράγονται προϊόντα προστιθέμενης αξίας που βασίζονται στην κυκλική και πράσινη οικονομία. Ο μύκητας αναπτύχθηκε σε βυθισμένη καλλιέργεια με υπόστρωμα γλυκόζης για είκοσι μέρες και αφού συλλέχθηκε η βιομάζα ακολούθησε εκχύλιση των πολυσακχαριτών τόσο των ενδοκυττάρων όσο και των εξωκυττάρων.

## 8.2 Υλικά και αντιδραστήρια

- 4 φιάλες με προ-καλλιέργεια
- Κωνικές φιάλες των 250ml
- Υδρόφοβο βαμβάκι
- Αλουμινόχαρτο
- Γλυκόζη
- Εκχύλισμα ζυμομύκητα
- Πεπτόνη
- Ανθρακικό ασβέστιο,  $\text{CaCO}_3$
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Θεικό μαγνήσιο,  $\text{MgSO}_4$
- Ποτήρια ζέσεως
- Πεχάμετρο

- Θειικό οξύ, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Οικιακός ομογενοποιητής
- Ανοξείδωτο ποτήρι
- Πιπέτα
- Μεταλλικό κόσκινο 0,2mm
- Αναδεδυόμενος επωαστήρας
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αιθανόλη absolute 99,8%
- Χαρτάκια

### 8.3 Μεθοδολογία

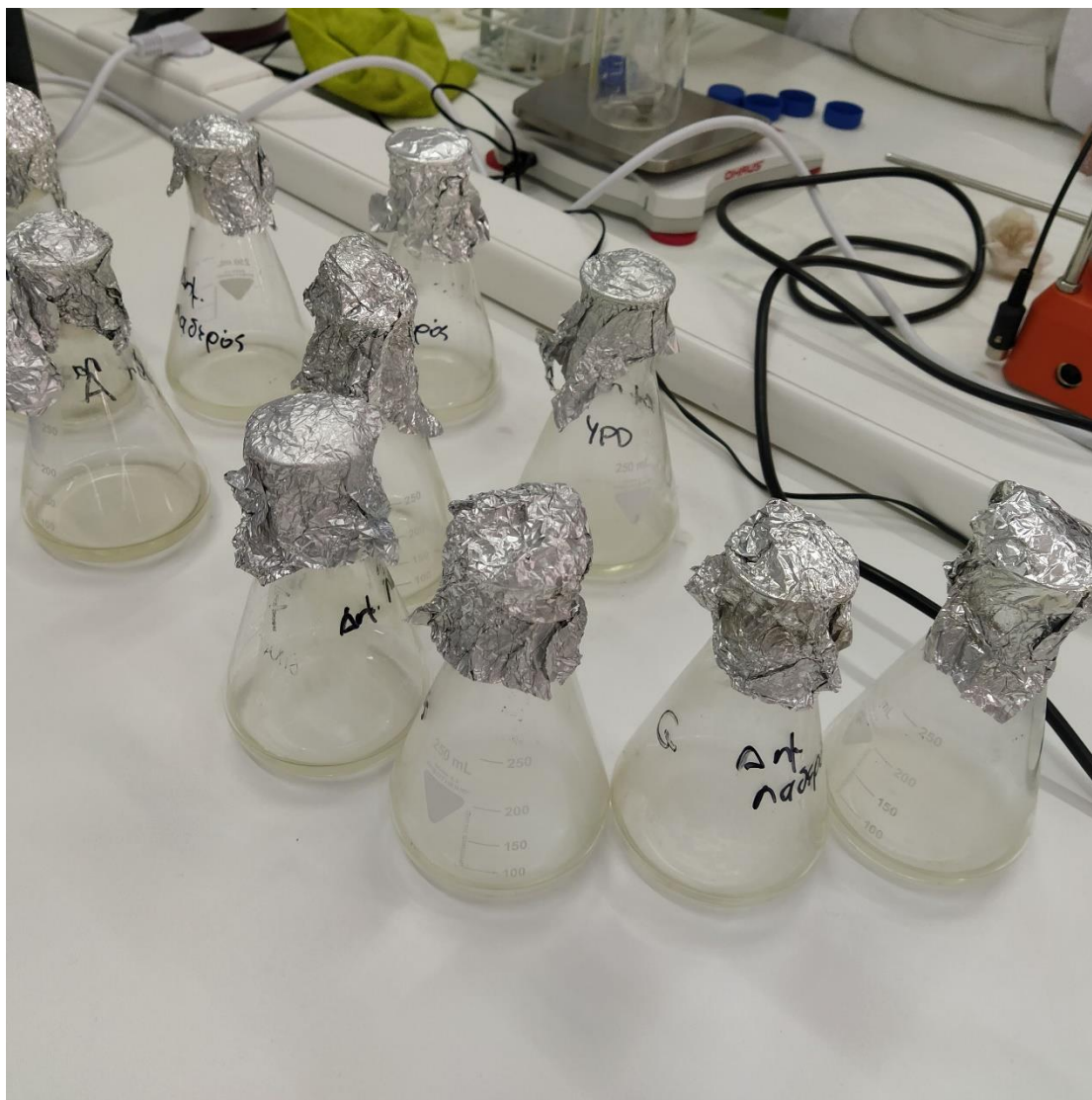
#### 8.3.1 Καλλιέργεια βασιδιομύκητα

Ο μύκητας όπως προαναφέρθηκε είναι ο *Schizophyllum commune*. Σποράκια λανθάνουσας φάσης του μύκητα προκαλλειεργήθηκαν σε 4 κωνικές φιάλες των 250ml με 10g/L γλυκόζη ώστε να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο για την κανονική καλλιέργεια. Σκοπός είναι η καλλιέργεια του μύκητα να πραγματοποιηθεί σε 10 κωνικές φιάλες με ενεργό όγκο ζύμωσης 50ml οπότε σε ένα ποτήρι ζέσεως των 1000ml φτιάχτηκαν 550ml διαλύματος σε θρεπτικά συστατικά στις εξής αναλογίες :

Θρεπτικά συστατικά	Συγκέντρωση	Τελικό βάρος στα 550ml
Γλυκόζη	30g/L	16,5
Εκχύλισμα ζυμομύκητα	1,5g/L	0,825
Πεπτόνη	1,5g/L	0,825
CaCO <sub>3</sub>	0,5g/L	0,275
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g/L	0,55
MgSO <sub>4</sub>	0,24g/L	0,132

Αφού τοποθετήθηκαν τα θρεπτικά συστατικά στο ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε ένας μαγνήτης εντός και ακολούθησε μαγνητική ανάδευση σε ήπια θερμοκρασία ώστε να διαλυθούν τα συστατικά. Αφού τα συστατικά διαλύθηκαν το pH έπρεπε να προσαρμοστεί στο 5 ενώ το αρχικό pH ήταν 7,71. Για να γίνει αυτό τοποθετήθηκε εντός ποτηριού η ακίδα του πεχαμέτρου και σιγά σιγά με μία πιπέτα έπεφταν εντός διαλύματος σταγόνες θειικού οξέος. Μόλις το pH προσέγγισε το 5 το υγρό του ποτηριού μοιράστηκε στις 10 κωνικές φιάλες από 50ml στην καθεμία δηλαδή 500ml

στο σύνολο ενώ τα 50ml που περίσσεψαν χρησιμοποιήθηκαν σε κάποια άλλη πειραματική διαδικασία. Αφού συμπληρώθηκαν οι όγκοι των 10 φιαλών αυτές σφραγίστηκαν μέσω τοποθέτησης υδρόφοβου βαμβακιού και αλουμινοχαρτου στο στόμιο της κάθε φιάλης.



Εικόνα 24 Προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος στις φιάλες

Αφού σφραγίστηκαν οι κωνικές φιάλες, αυτές οδηγήθηκαν για αποστείρωση στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης σε συνθήκες εμπορικής αποστείρωσης δηλαδή 121°C για 30min σε πίεση μίας ατμόσφαιρας. Αυτό το βήμα είναι πολύ σημαντικό διότι εξασφαλίζει την ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας χωρίς επιμολύνσεις άλλων μικροοργανισμών.



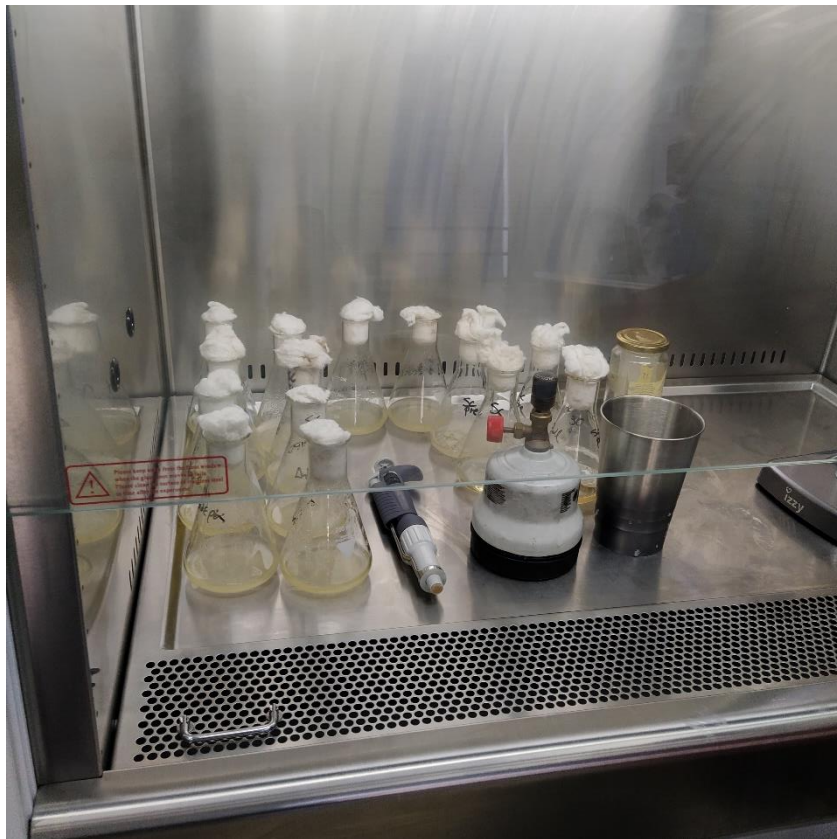
Εικόνα 25 Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

Αφού ολοκληρωθεί η αποστείρωση των υποστρωμάτων, τόσο οι φιάλες που έχουν τα υποστρώματα όσο και οι φιάλες που έχουν την προ-καλλιέργεια μεταφέρονται στον θάλαμο βιολογικής ασφαλείας (Laminar flow) ώστε να πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός των καλλιεργειών στις κωνικές φιάλες. Οι προ-καλλιέργειες των τεσσάρων κωνικών φιαλών χύνονται μέσα σε ένα ανοξείδωτο ποτήρι ώστε να ενωθούν σε μία και το περιεχόμενο υφίσταται ανάδευση μέσω ενός οικιακού ομογενοποιητή για να γίνει ομοιόμορφη διάσπαση σε πολλά μικρά κομματάκια. Όταν οι προ-καλλιέργειες διαλυθούν καλά τότε μέσω χρήσης πιπέτας 5ml προκαλλιέργειας τοποθετούνται στα 50ml υποστρώματος κάθε κωνικής φιάλης, δηλαδή 10% του συνολικού όγκου και πάντα με ασηπτικό τρόπο δηλαδή χρήση φλόγας. Τέλος οι εμβολιασμένες κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στους 26,4°C σε 140rpm για 20 ημέρες.





Εικόνα 26 Προ-καλλιέργειες



Εικόνα 27 Ασηπτικός εμβολιασμός προ-καλλιέργειας στις κωνικές φιάλες



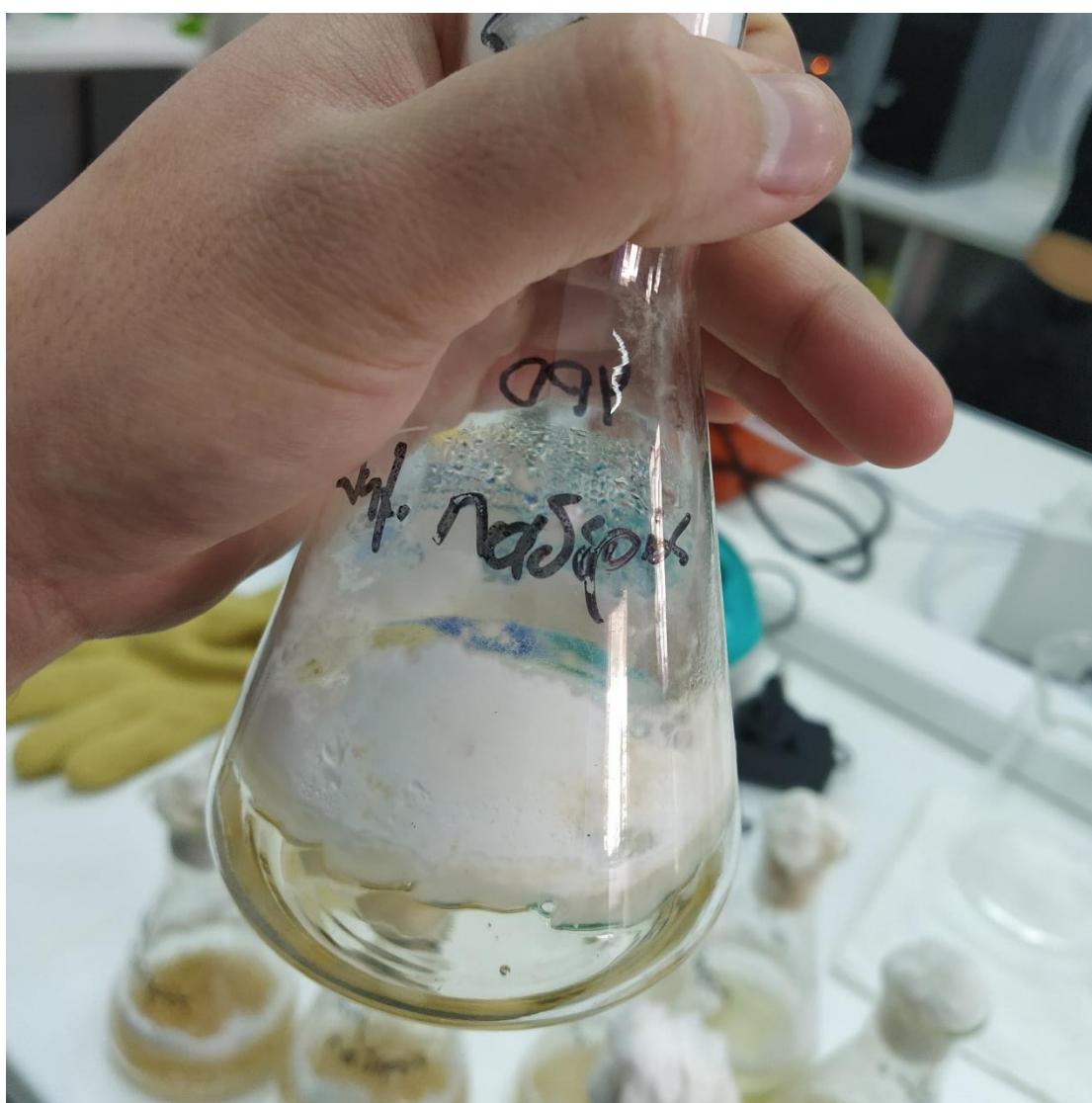
Εικόνα 28 Κωνικές φιάλες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 29 Επώαση καλλιιεργειών

### 8.3.2 Εκχύλιση πολυσακχαριτών από τον μύκητα

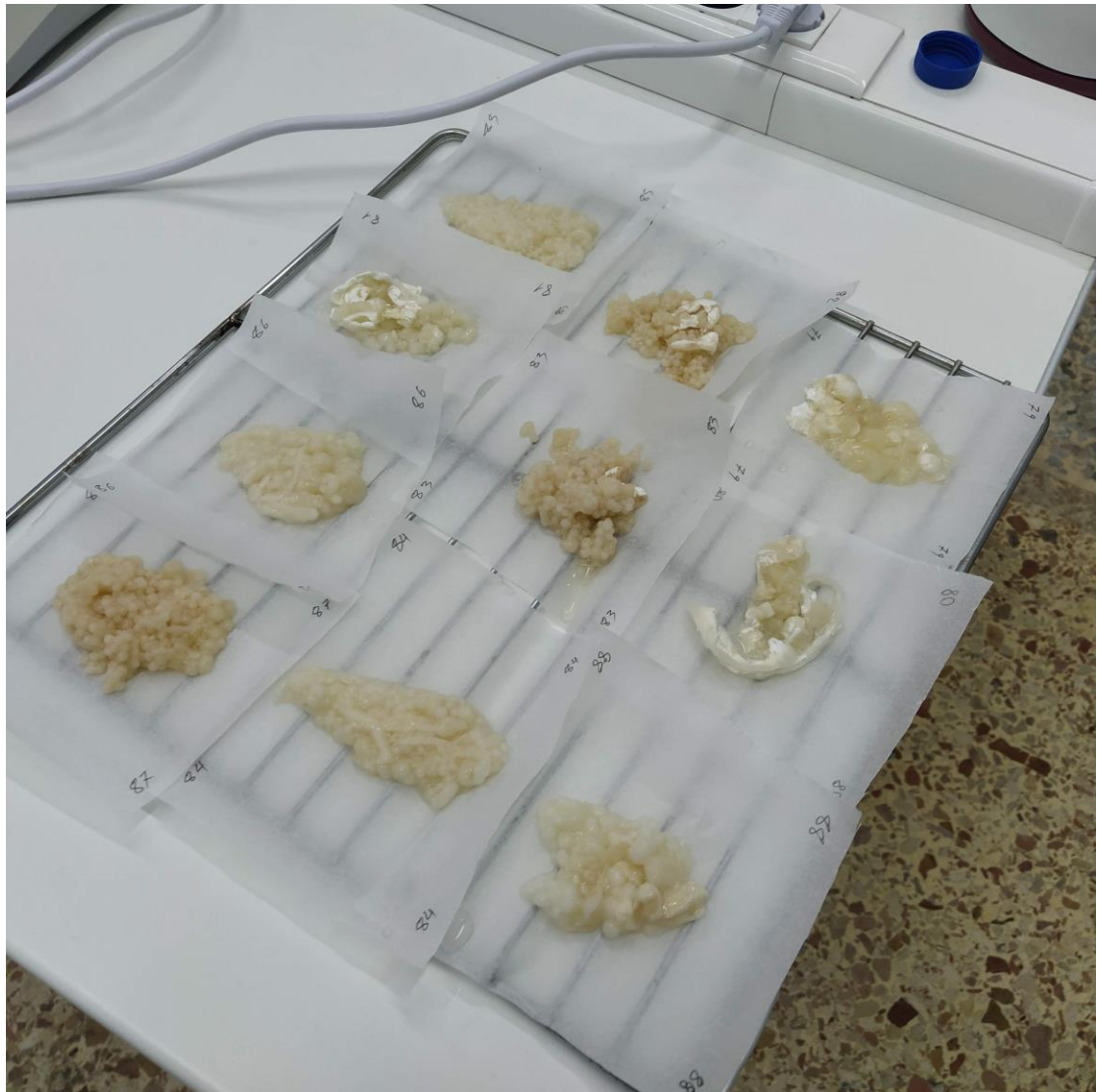
Αφού πέρασαν οι 20 ημέρες οι δέκα κωνικές φιάλες αφαιρέθηκαν από των επωαστήρα. Με μία πρώτη ματιά παρατηρείται ικανοποιητική ανάπτυξη του μύκητα άλλοτε ως πολλά μικρά σφαιρίδια και άλλοτε ως μία συμπαγής μάζα. Το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών χύθηκε σε κόσκινο με τρύπες διαμέτρου 0,2mm ώστε να κρατηθούν οι καλλιέργειες και να φύγει το υγρό. Το υγρό της καλλιέργειας ωστόσο κρατήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες για να μελετηθεί η παρουσία εξωπολυσακχαριτών σε αυτό. Οι μάζες μυκήτων ξεπλυνθήκαν με τρεχούμενο νερό κάτω από την βρύση και τοποθετήθηκαν σε προ ζυγισμένα χαρτάκια και έπειτα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα στους 60°C έως ότου στεγνώσουν.



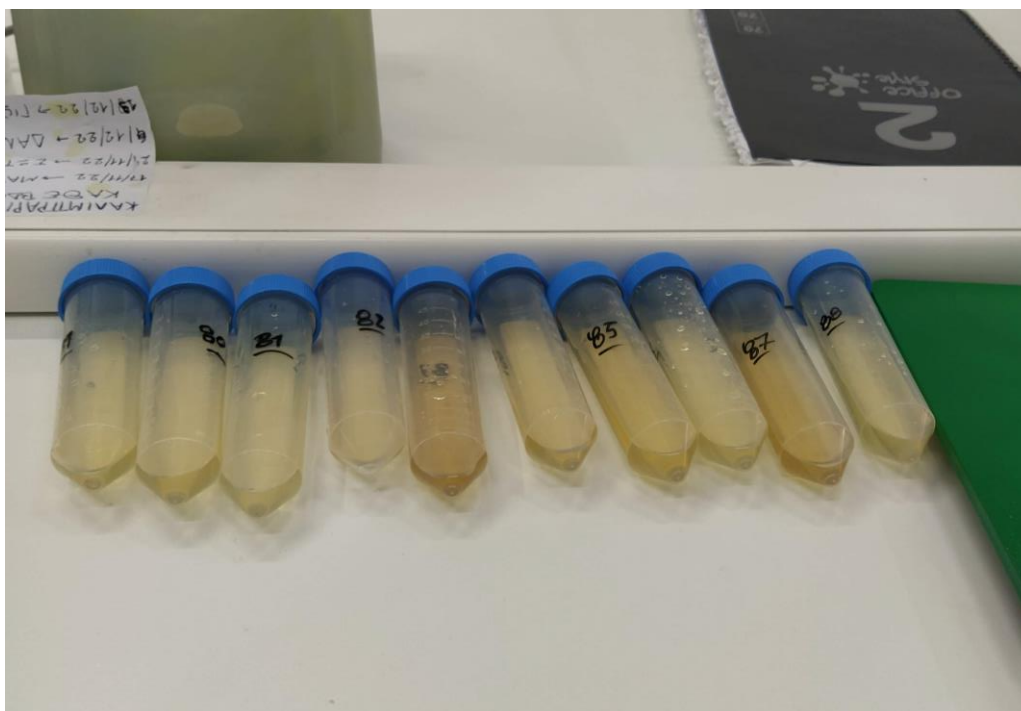
Εικόνα 30 Ανάπτυξη βασιδιομύκητα στις κωνικές φιάλες



Εικόνα 31 Πλύση βιομάζας



Εικόνα 32 Τοποθέτηση βιομάζας σε χαρτάκια για ξήρανση



Εικόνα 33 Συλλογή εξωκυττάριου υγρού

Μετά από 24 ώρες οι βιομάζες είχαν ξηραθεί πλήρως οπότε το επόμενο βήμα είναι το άλεσμα της βιομάζας. Πριν το άλεσμα η ξηρή βιομάζα ζυγίστηκε και είχε βάρος 5,7282g. Οι βιομάζες αλέστηκαν με έναν συμβατικό αλεστήρα για καφέ όπου και έγιναν σκόνη. Η μορφή της βιομάζας σε σκόνη θα βοηθήσει την εκχύλιση των πολυσακχαριτών.



Εικόνα 34 Άλεσμα βιομάζας



Εικόνα 35 Αλεσμένη βιομάζα

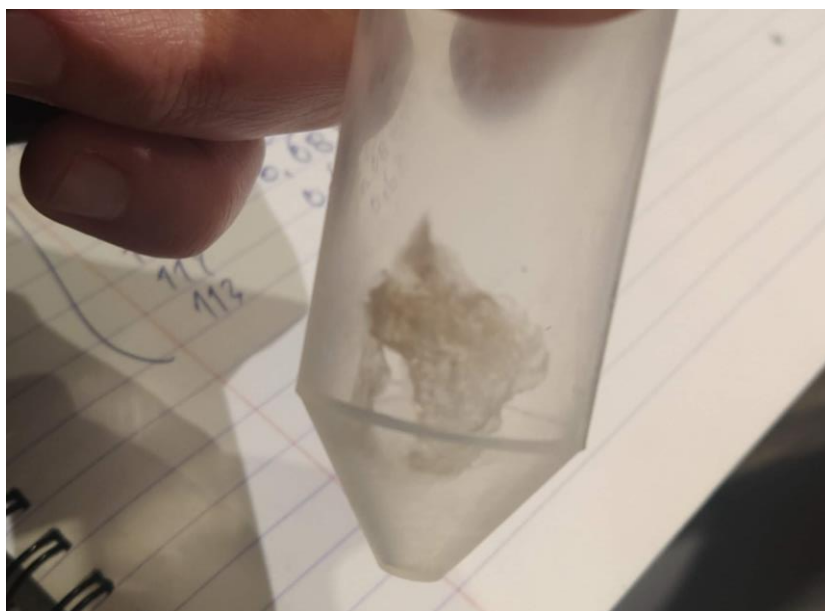
Αφού αλέστηκε η βιομάζα και πείρε την μορφή σκόνης, τοποθετήθηκε στην συνέχεια σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με απεσταγμένο νερό σε αναλογία ξηρής μάζας προς νερό 1:10 (w/v) δηλαδή στα 5,72g βιομάζας το νερό που προστέθηκε ήταν 57,28ml. Το υδατικό αυτό διάλυμα έβρασε για 3 ώρες υπο συνεχή χαμηλή ανάδευση μέσω μαγνητικού θερμαντικού αναδευτήρα. Υπό αυτή την διαδικασία τα κυτταρα του μύκητα διασπώνται και απελευθερώνουν στο υγρό διάλυμα τους πολυσακχαρίτες τους μαζί με κάποια άλλα συστατικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τελειώνοντας λοιπόν την διαδικασία βρασμού ακολουθεί μετέπειτα η διαδικασία παραλαβής των πολυσακχαριτών από το υγρό διάλυμα. Για να γίνει αυτό το διάλυμα βιομάζας-νερού διαμοιράζεται σε σωληνάκια φυγοκέντρησης και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 9000rpm στους 4°C ώστε να κάτσουν στον πάτο τα στερεά συστατικά της βιομάζας και οι πολυσακχαρίτες μαζί με το νερό να βρεθούν στην επιφάνεια ως υπερκείμενο. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε και τα υπερκείμενα από όλα τα σωληνάκια συγκεντρώθηκαν μαζί.

## 8.4 Συλλογή πολυσακχαριτών

### 8.4.1 Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες που προέρχονται από τα κυτταρικά διαμερισμάτα του μύκητα πλέον βρίσκονται διαλυμένοι σε νερό. Επομένως αυτοί θα πρέπει να διαχωριστούν από αυτό. Η διαδικασία διαχωρισμού των πολυσακχαριτών έγινε μέσω χρήσης αιθανόλης

absolute 99,8% ως εξής. Ο συλλεγμένος όγκος υπερκειμένου που προήλθε από την βιομάζα μοιράστηκε σε σωληνάκια φυγοκέντρησης. Ακολούθως προστέθηκε μέσα στα ίδια σωληνάκια αιθανόλη σε όγκο 1:1. Η αιθανόλη ενώνεται με τους πολυσακχαρίτες μειώνοντας έτσι την διαλυτότητά τους στο νερό με αποτέλεσμα αυτοί να ανεβαίνουν στην επιφάνεια. Πράγματι, με το που προστέθηκε αιθανόλη παρατηρήθηκε δημιουργία διφασικού συστήματος, δηλαδή στο πάνω μέρος μία ζελώδης ημιστερεή μάζα και στο κάτω μέρος των σωληνακίων βρισκόταν το καθαρό νερό. Τα σωληνάκια μπήκαν στο ψυγείο για 24 ώρες στους 4°C ώστε να μεγιστοποιηθεί ο διαχωρισμός μεταξύ πολυσακχαριτών και νερού. Αφού περάσανε οι 24 ώρες τα σωληνάκια οδηγήθηκαν για φυγοκέντρηση. Οι συνθήκες φυγοκέντρησης ήταν 20 λεπτά στις 9000rpm στους 4°C και ο καθαρισμός επαναλήφθηκε για 3 φορές με αιθανόλη και ξανά φυγοκέντρηση ώστε οι πολυσακχαρίτες να είναι όσο το δυνατόν απαλλαγμένοι από προσμίξεις. Αφού τελείωσαν οι διαδικασίες φυγοκέντρησης οι πολυσακχαρίτες βρίσκονταν στον πάτο των σωληνακίων. Το υπερκείμενο από τα σωληνάκια χύθηκε και οι πολυσακχαρίτες με την μορφή τζελ συγκεντρώθηκαν μαζί και ακολούθησε ξήρανση στους 65°C έως ώτου ξηρανθούν. Οι απομονωμένοι πολυσακχαρίτες ζυγίστηκαν και δείγμα τους στάλθηκε για ανάλυση στην FTI-R.



Εικόνα 36 Απομόνωση πολυσακχαριτών



#### 8.4.2 Εξωπολυσακχαρίτες

Εκτός από την απομόνωση ενδοπολυσακχαριτών αποφασίστηκε να μελετηθεί και το υγρό της ζύμωσης για παρουσία εξωπολυσακχαριτών. Το υγρό της ζύμωσης είχε συλλεχτεί σε σωληνάκια φυγοκέντρησης επομένως η παραλαβή συστατικών από αυτό είναι πολύ ευκολότερη. Τα σωληνάκια που περιείχαν το υγρό ζύμωσης ήταν 10 όσες και οι κωνικές φιάλες στις οποίες αναπτύχθηκε ο μύκητες. Οπότε αποφασίστηκε στα 5 σωληνάκια να γίνει μία εκχύλιση χωρίς οργανικό διαλύτη και στα άλλα 5 να γίνει μία κλασσική εκχύλιση με αιθανόλη. Η εκχύλιση χωρίς αιθανόλη βασίστηκε στην εργασία (Ruthes et al., 2015). Ουσιαστικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαδοχικής κατάψυξης και απόψυξης όπου το ακατέργαστο εκχύλισμα καταψύχεται και αποψύχεται με αργό ρυθμό σε θερμοκρασία δωματίου για πολλές φορές και έπειτα από φυγοκέντρηση παρατηρείται δημιουργία ιζήματος πολυσακχαριτών. Αυτό οφείλεται στο ότι οι πολυσακχαρίτες με γραμμική αλυσίδα καθιζάνουν κατά την ψύξη ενώ οι πολυσακχαρίτες με διακλαδισμένες αλυσίδες παραμένουν διαλυμένοι στο νερό. Αυτή η τεχνική θεωρείται από τους ερευνητές κατάλληλη για απομόνωση β-D-γλυκανών. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρυντικά καθώς πράγματι στα 5 σωληνάκια που καταψύχθηκαν και αποψύχθηκαν έγινε με επιτυχία η απομόνωση πολυσακχαριτών μετά από φυγοκέντρηση, ενώ στα υπόλοιπα 5 σωληνάκια προστέθηκε αιθανόλη και ψύξη για μία ημέρα στους 4°C και ακολούθως φυγοκέντρηση. Όλοι οι συλλεγμένοι πολυσακχαρίτες τοποθετήθηκαν για ξήρανση στους 65°C και ακολούθως μεταφέρθηκαν για ανάλυση FTI-R ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη β-γλυκανών.

### 9. Παρασκευή των βιοφίλμ

#### 9.1 Υλικά και αντιδραστήρια

- Αποξηραμένη πηκτίνη
- Αποξηραμένη β γλυκάνη
- Απεσταγμένο νερό
- Πολυαιθυλενική γλυκόλη 200 (PEG 200)
- Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνητάκι
- Πιπέτες
- Αντικολλητικό χαρτί
- Τρυβλία
- Ξηραντήρας
- Μικρή κωνική φιάλη

- Πλαστικά σωληνάκια με καπάκι
- Συσκευή vortex

## 9.2 Μεθοδολογία

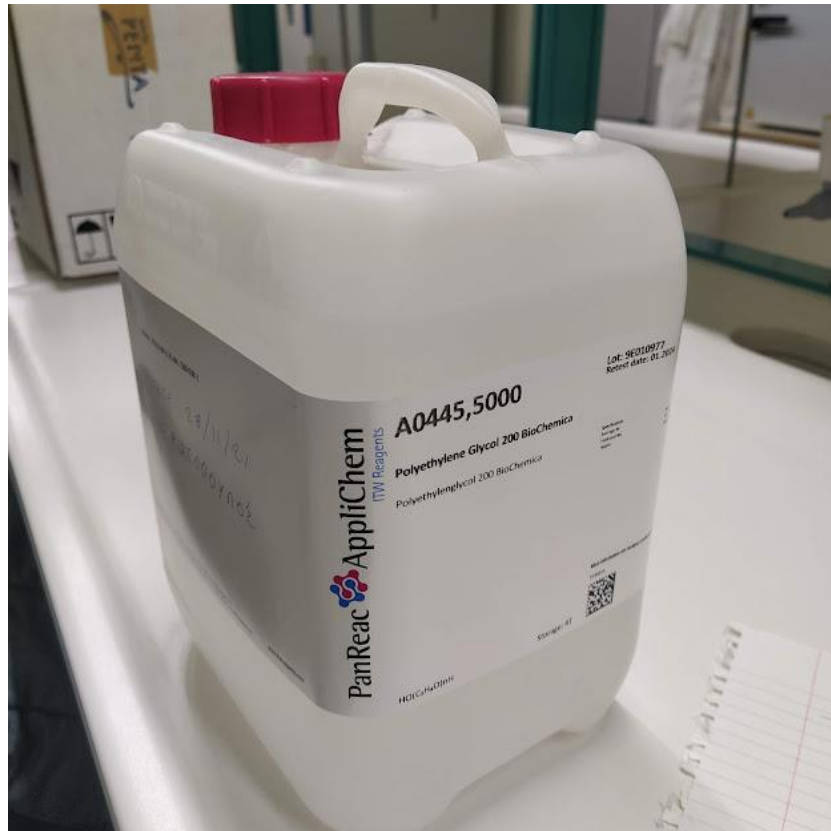
Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία βιοφίλμ πηκτίνης με β-γλυκάνη βασίστηκε στα άρθρα των (Peltzer et al., 2018) και (Kang et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονται στην φυσική ικανότητα της πηκτίνης και της γλυκάνης να δημιουργούν από μόνα τους τζελ σε υδατικά διαλύματα. Ο (Kang et al., 2007) αναφέρει πως η δημιουργία βιοφίλμ πηκτίνης απαιτεί 3% w/v υδατικό διάλυμα πηκτίνης συν 1% PEG 400 και ανάδευση. Ο (Peltzer et al., 2018) περιγράφει την δημιουργία βιοφίλμ β γλυκάνης με 3% w/v υδατικό διάλυμα και 15ml σορβιτόλη. Δεδομένου των δύο αυτών πληροφοριών και με βάση τα υλικά αντιδραστήρια του εργαστηρίου αποφασίστηκε το εξής : Δημιουργία 3% υδατικού διαλύματος πηκτίνης με 1/10 μάζα β-γλυκάνης διότι η πηκτίνη για τον ίδιο όγκο έχει σχεδόν δεκαπλάσια μάζα από την β-γλυκάνη, και επομένως η ποσότητα ίδιας μάζας β γλυκάνης θα σήμαινε δεκαπλάσιο όγκο γλυκάνης από πηκτίνη και επομένως θα είχαμε πηκτίνη ενθυλακωμένη στην γλυκάνη και όχι το αντίστροφο που θέλουμε, και τέλος προστέθηκε 2% PEG 200 επειδή υπήρχε έλλειψη PEG 400. Η πηκτίνη και η γλυκάνη πριν τοποθετηθούν εντός κωνικής φιάλης κόπηκαν με ψαλιδάκι σε μικρά κομματάκια για καλύτερη διαλυτότητα και η ανάδευση τέθηκε σε λειτουργία έως ώτου να ενυδατωθούν οι πολυσακχαρίτες και να διαλυθούν. Μόλις παρατηρήθηκαν νεφελώματα στο διάλυμα λόγω επιτυχημένης επανυδάτωσης το υγρό προστέθηκε σε σωληνάκι και έπειτα σε έντονη ανάδευση στο vortex έως ώτου εξαφανιστούν στερεά κομμάτια και το υγρό γίνει ομοιόμορφο και εννιαίο. Μετέπειτα το διάλυμα προστέθηκε σε ένα τρυβλίο με αντικολητικό χαρτάκι και τοποθετήθηκε για ζήρανση στους 65°C για 2 ημέρες έως ώτου γίνει στερεό και μετέπειτα να περάσει για αντιμικροβιακή εξέταση.



*Εικόνα 37 Αποξηραμένη πηκτίνη*



*Εικόνα 38 Αποξηραμένη β-γλυκάνη*



Εικόνα 39 πολυαιθυλενική γλυκόλη 200



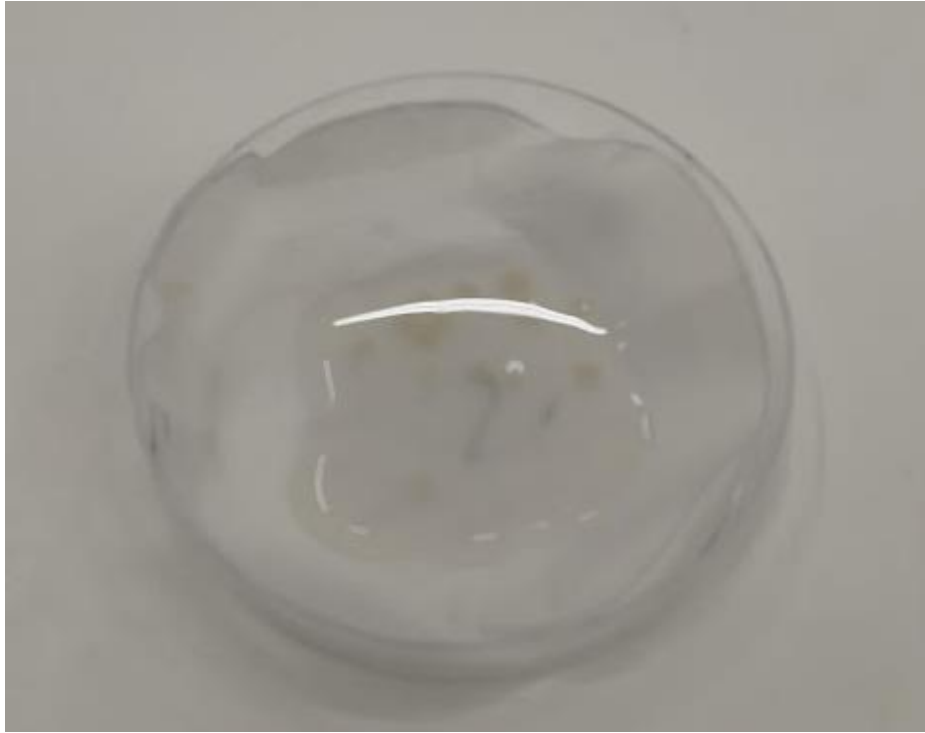
Εικόνα 40 Μαγνητική ανάδευση διαλύματος



*Εικόνα 41 Έντονη ανάδευση στο vortex*



*Εικόνα 42 Πλήρως αναδευμένο διάλυμα*



*Εικόνα 43 Τοποθέτηση υγρού βιοφίλμ σε τρυβλίο για ξήρανση*



Εικόνα 44 Κομμάτια αποξηραμένου βιοφίλμ

10. Προσδιορισμός αντιμικροβιακής δράσης μεμβράνης πηκτίνης από φλούδα πορτοκαλιού με ενθυλακωμένους πολυσακχαρίτες (β-γλυκάνες) από βασιδιομύκητα *Schizophyllum commune* μαζί με PEG 200 ως μέσο συσσωμάτωσης ενάντια στο βακτήριο *Escherichia coli*.

**Ημερομηνία εκτέλεσης : 22-27/03/2023**

#### 10.1 Υλικά εξοπλισμός

- Κυκλοαναδευτήρας (Vortexer)
- Ηλεκτρονικός επιτραπέζιος ζυγός
- Επωστήρας ρυθμισμένος στους 37 °C
- Βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* στάσιμης φάσης και συγκέντρωσης  $10^{8-9}$  CFU/mL
- Θρεπτικό άγαρ τρυπτόνης σόγιας (TSA, tryptone soya agar)
- Θρεπτικός ζωμός τρυπτόνης σόγιας (TSB, tryptone soy broth)
- Αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer
- Φιάλες Duran

- Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 47 °C
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο)
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία Petri (διαμέτρου 90 mm)
- Μικροβιακός κρίκος ενοφθαλμισμού
- Λύχνος Bunsen
- Μηχανική μικροπιπέτα μεταβλητού όγκου 1-10 mL
- Μηχανική μικροπιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000 µL
- Μηχανική μικροπιπέτα μεταβλητού όγκου 5-50 µL
- Αποστειρωμένα ρύγχοι (tips) μικροπιπέτων
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες (διαμέτρου 16 mm)
- 2 μεμβράνες πηκτίνης
- 2 μεμβράνες β-γλυκάνης
- 2 μεμβράνες πηκτίνης, β-γλυκάνης, PEG 200
- 6 πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρισης (falcon) των 50 mL
- Γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) διαμέτρου 3 mm (10 σφαιρίδια/falcon)
- Στατώ δοκιμαστικών σωλήνων
- Μεταλλική λαβίδα

## 10.2 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα

- Στερεό θρεπτικό υλικό TSA (Tryptone Soy Agar) (40 g/L)
- Θρεπτικός ζωμός TSB (Tryptone Soy Broth) (30 g/L)
- Διάλυμα ¼ (1 ταμπλέτα/500 mL dH<sub>2</sub>O) : μοιράστηκαν 9 mL σε κάθε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα

Όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά και το διάλυμα ¼ Ringer, αφού προετημάστηκαν, αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 λεπτά.

## 10.3 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία καλλιιεργειών εργασίας

Χρησιμοποιήθηκε ο *E. coli* ως μικροοργανισμός δείκτης έναντι του οποίου εκτιμήθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών (πηκτίνης, β-γλυκάνης, πηκτίνης-β-γλυκάνης-PEG200).

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την συλλογή μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων (EMIKYT) του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής και αυτό ήταν το εξής :



– *Escherichia coli* (DFSN\_B1), Gram<sup>-</sup>

Ο μικροοργανισμός βρισκόταν διατηρημένος μέσα σε κρυοφιαλίδιο (cryovials) σε TSB με 15% (v/v) γλυκερόλη στους -80 °C. Για την αναζωογόνηση, αυτός αρχικά μεταφέρθηκε με μικροβιολογικό κρίκο στην επιφάνεια τρυβλίου TSA, και αφού διασπάρθηκε με την μέθοδο των παράλληλων γραμμών (streaking), επώαστηκε στους 37 °C για 24 ώρες (προκαλιέργεια). Ακολούθως, μία μεμονωμένη αποικία από το βακτήριο ενοφθαλμίστηκε σε 10 mL TSB σε δοκιμαστικό σωλήνα και επώαστηκε στους 37 °C για 18 ώρες (καλλιέργεια εργασίας).

#### 10.4 Πειραματική διαδικασία

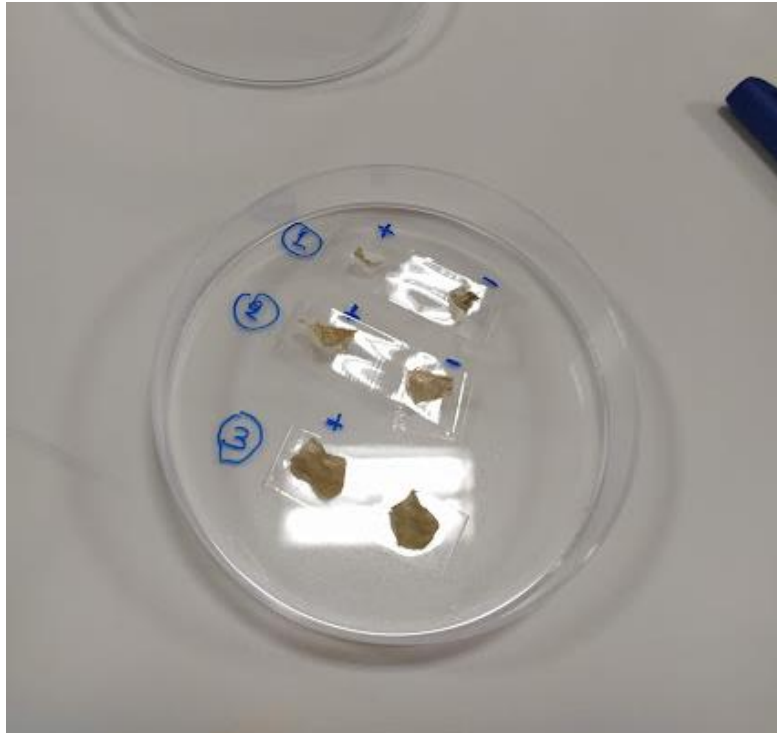
- Με τη βοήθεια μικροπιπέτας μεταφέρθηκαν 10 μL της καλλιέργειας εργασίας του μικροοργανισμού ( $\approx 10^{8-9}$  CFU/mL) στην επιφάνεια κάθε μεμβράνης (μια μεμβράνη πηκτίνης, μια μεμβράνη β-γλυκάνης, μια μεμβράνη πηκτίνης-γλυκάνης-PEG 200) (περίπου  $\approx 10^{6-7}$  κύτταρα/μεμβράνη).
- Οι τρεις ενοφθαλμισμένες μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο Petri μαζί με άλλες τρεις μεμβράνες δίχως ενοφθαλμισμό με βακτήρια (για μάρτυρες όσον αφορά το πιθανό αυτόχθονο μικροβιακό φορτίο των ίδιων των μεμβρανών), άρα στο σύνολο υπήρχαν τρεις ενοφθαλμισμένες μεμβράνες με βακτήρια και τρεις μεμβράνες χωρίς ενοφθαλμισμένα βακτήρια στο ίδιο τρυβλίο, και επώαστηκαν όλα μαζί στο ψυγείο στους 4 °C για 24 ώρες.
- Ακολούθως της επώασης, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε 6 falcon των 50 mL που περιείχαν το καθένα 10 γυάλινα σφαιρίδια (των 3 mm) και 10 mL  $\frac{1}{4}$  Ringer και έγινε κυκλοανάδευση με τη χρήση συσκευής στροβιλισμού (vortexer) στη μέγιστη ένταση για 2 λεπτά.
- Έπειτα με τη βοήθεια μικροπιπέτας έγινε δεκαδική αραιώση παίρνοντας 1 mL από το κάθε falcon και μεταφέροντας το σε δοκιμαστικό σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9 mL  $\frac{1}{4}$  Ringer. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμη τρεις φορές κάνοντας εν τέλει συνολικά 4 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$ ) σε όλα τα κυτταρικά εναιωρήματα μέσα στο κάθε falcon.
- Για κάθε δείγμα ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο της διασποράς 100 μL από την κάθε δεκαδική αραιώση ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$ ) σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο TSA.
- Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες

- Ακολούθως της επώασης των τρυβλίων, απαριθμήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τρυβλίο και προσδιορίστηκαν τα CFU/mL (σε κάθε falcon) και βάσει αυτών τα CFU/μεμβράνη (πολλαπλασιάζοντας τα CFU/mL x 10, αφού σε κάθε falcon με μεμβράνη υπήρχαν 10 mL διαλύματος ¼ Ringer).

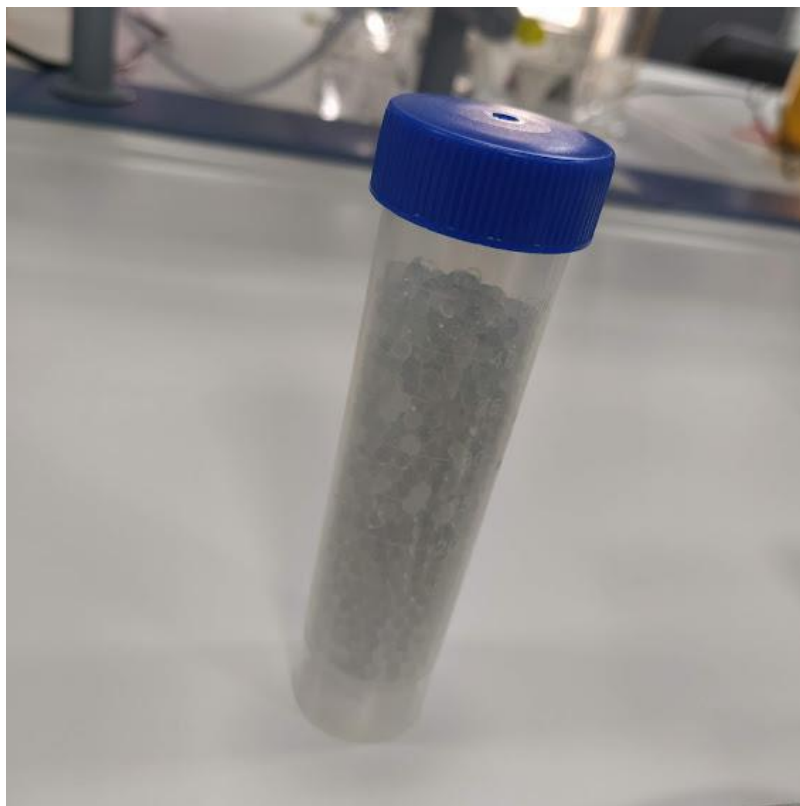
### 10.5 Φωτογραφικό υλικό



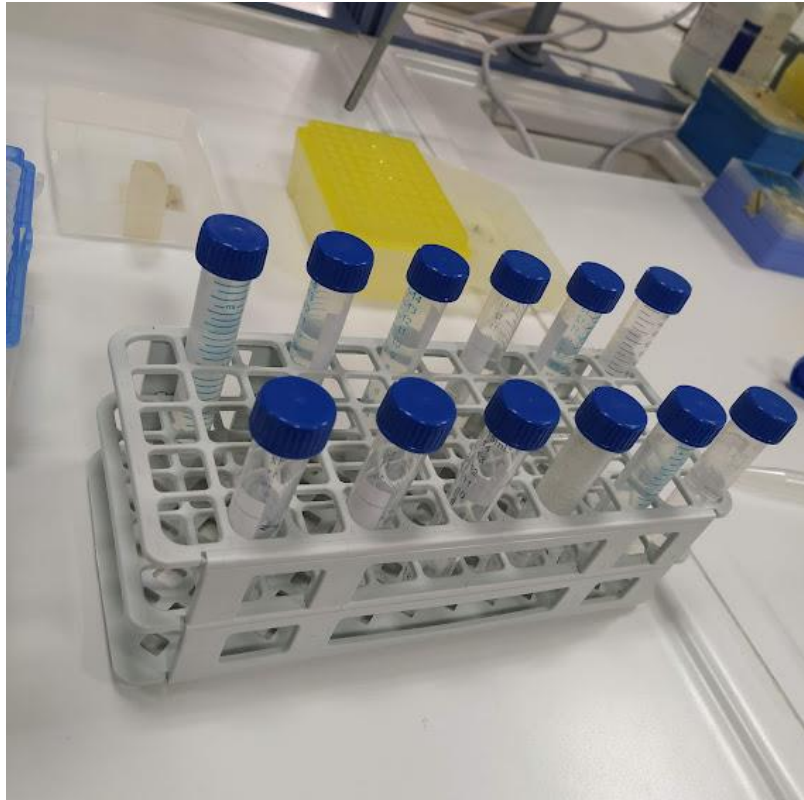
Εικόνα 45 Τοποθέτηση μεμβρανών στο τρυβλίο και επώασή τους



Εικόνα 46 1. φιλμ πηκτίνης, 2. φιλμ β-γλυκάνης, 3. βιοφίλμ



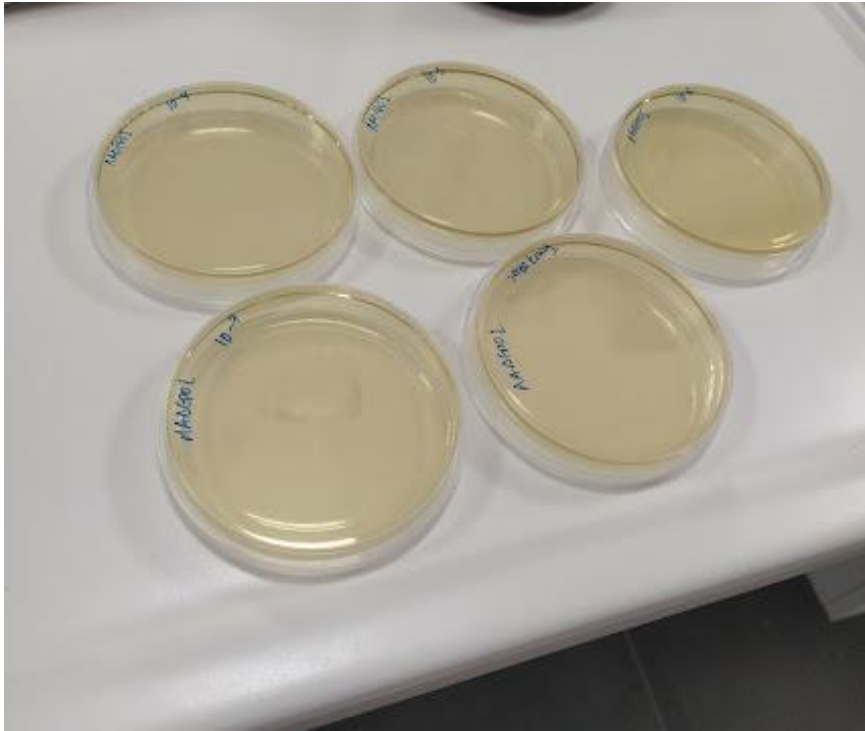
Εικόνα 47 Γυάλινα σφαιρίδια 3mm



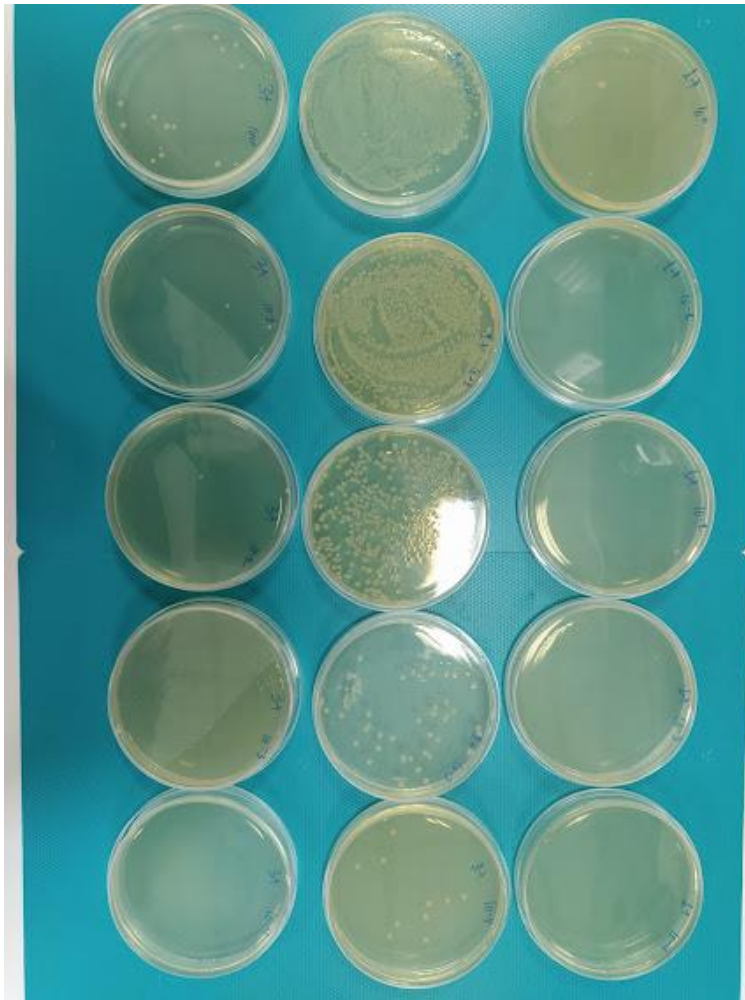
*Εικόνα 48 Τοποθέτηση γυάλινων σφαιριδίων σε falcon με 10mL Ringer*



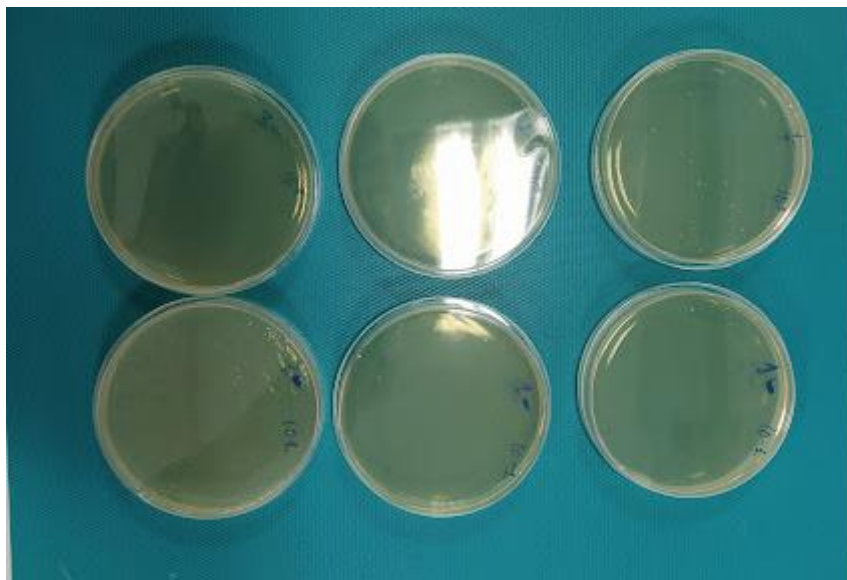
*Εικόνα 49 Δοκιμαστικοί σωλήνες για μελέτη επιζώντων βακτηρίων μέσω δεκαδικών αραιώσεων*



Εικόνα 50 Δεκαδικές αραιώσεις για κάθε δείγμα φιλιμ από  $10^0$  έως  $10^{-4}$



Εικόνα 51 Σύνολο τρυβλίων με δεκαδικές αραιώσεις από τα φιλμ με βακτήρια



Εικόνα 52 Τρυβλία μάρτυρες για τα φιλμ (χωρίς βακτήρια)

## 11. Αποτελέσματα

### 11.1 Παραγωγή πηκτίνης

Όπως παρατηρήθηκε από τα πειράματα το πορτοκάλι και συγκεκριμένα οι φλούδες του είναι μία πολύ καλή πρώτη ύλη για παραγωγή πηκτινών υψηλής καθαρότητας. Η αξιολόγηση και ταυτοποίηση της πηκτίνης έγινε με την χρήση της συσκευής FT-IR και με βάση τις κορυφές του παρακάτω διαγράμματος τεκμηριώνεται πως η ουσία που εκχυλίστηκε είναι πηκτίνη. Πιο συγκεκριμένα, το διάγραμμα έχει ως εξής :



Εικόνα 53 Διάγραμμα πηκτίνης FTI-R

Με βάση την βιβλιογραφία, οι κορυφές κατανέμονται ως εξής : Στα 3.319cm εμφανίζονται οι κορυφές των υδροξυλικών ομάδων (-OH), η κορυφή 2.970 οφείλεται στις αλφατικές ομάδες (C-H groups). Επιπλέον, η κορυφή στα 1.744 οφείλεται στις καρβονυλικές ομάδες (C=O), όπως και η κορυφή στα 1634 (Wathoni et al., 2019). Ωστόσο με βάση το άρθρο των (Pasandide et al., 2017) οι περιοχές από 1007 έως 1110 σε δείγματα πηκτινών οφείλονται στην ύπαρξη γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ σακχάρων. Γενικότερα ο συγγραφές τονίζει πως οι περιοχές από 800 έως 1200 θεωρούνται ως <<δαχτυλικά αποτυπώματα>> καθώς διαφέρουν από ουσία σε ουσία και από δείγμα σε δείγμα και επομένως είναι δύσκολο να περιγραφτούν και να χαρακτηριστούν με ακρίβεια. Ωστόσο με βάση την πρώτη τετράδα κορυφών παρά τις



μικροαποκλίσεις στα νούμερα γίνεται ξεκάθαρο πως η ουσία που εξετάστηκε είναι η πηκτίνη, ειδαίλλως δεν θα ταυτίζονταν οι τέσσερις πρώτες κορυφές.

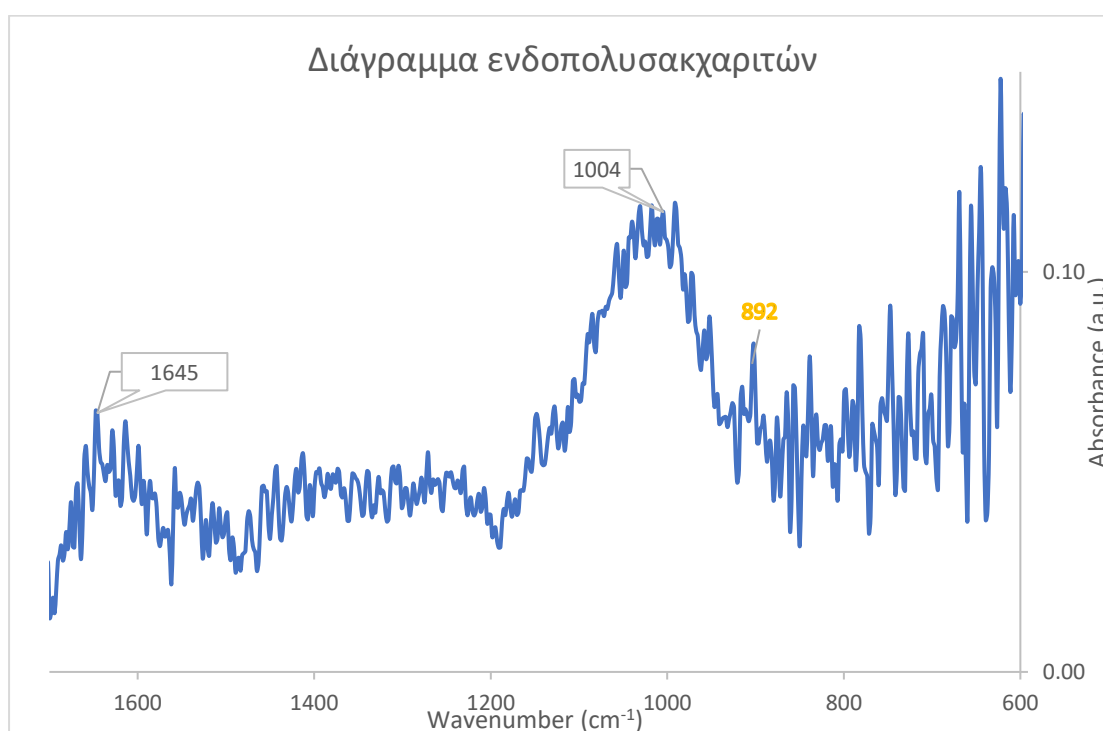
Η χρήση υπερήχων έναντι υψηλής θερμοκρασίας δούλεψε με επιτυχία δίνοντας έτσι την δυνατότητα της χρήσης τους σε ποικίλες διαδικασίες εκχύλισης μειώνοντας το ενεργειακό κόστος και προστατεύοντας τις ενώσεις από καταστροφή. Τέλος, όσον αφορά το διάλυμα εκχύλισης βεβαιώθηκε πως η καλύτερη αναλογία σκόνης φλούδας σε νερό είναι 1/50 g/mL, καθώς όταν αυξήθηκε η αναλογία των στερεών το διάλυμα υπερκορέστηκε και οι πηκτίνες δεν διαχωρίζονταν.

### 11.2 Παραγωγή β-γλυκανών

Η αλήθεια είναι πως η χρήση *Schizophyllum commune* για παραγωγή β-γλυκάνης δεν ήταν η κατάλληλη. Η προετοιμασία για την ανάπτυξη του βασιδιομύκητα απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα προετοιμασίας στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η δημιουργία προκαλλιέργειας, ο εμβολιασμός σε κύρια καλλιέργεια και η επώαση για 10-20 ημέρες αλλά και ο τελικός καθαρισμός των πολυσακχαριτών από την βιομάζα. Οι πολυσακχαρίτες που παρήχθησαν ήταν ενδοκυτταρικοί και εξωκυτταρικοί και μελετήθηκαν και αυτοί στο FT-IR. Τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά. Ενώ το στέλεχος αυτό είναι αποδεδειγμένο βιβλιογραφικά ότι παράγει β-γλυκάνες τα διαγράμματα δεν το αποδεικνύουν. Το διάγραμμα των ενδοπολυσακχαριτών έδωσε κάποιες κορυφές οι οποίες μπορούν να ταιριάξουν σε λίγα σημεία με ένα τυπικό διάγραμμα β-γλυκάνης. Ωστόσο το διάγραμμα των ενδοπολυσακχαριτών δεν έδωσε κορυφές και κατά συνέπεια αυτή η ουσία δεν μπορεί να χαρακτηριστεί και ως εκ τούτου δεν χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των φιλμ.



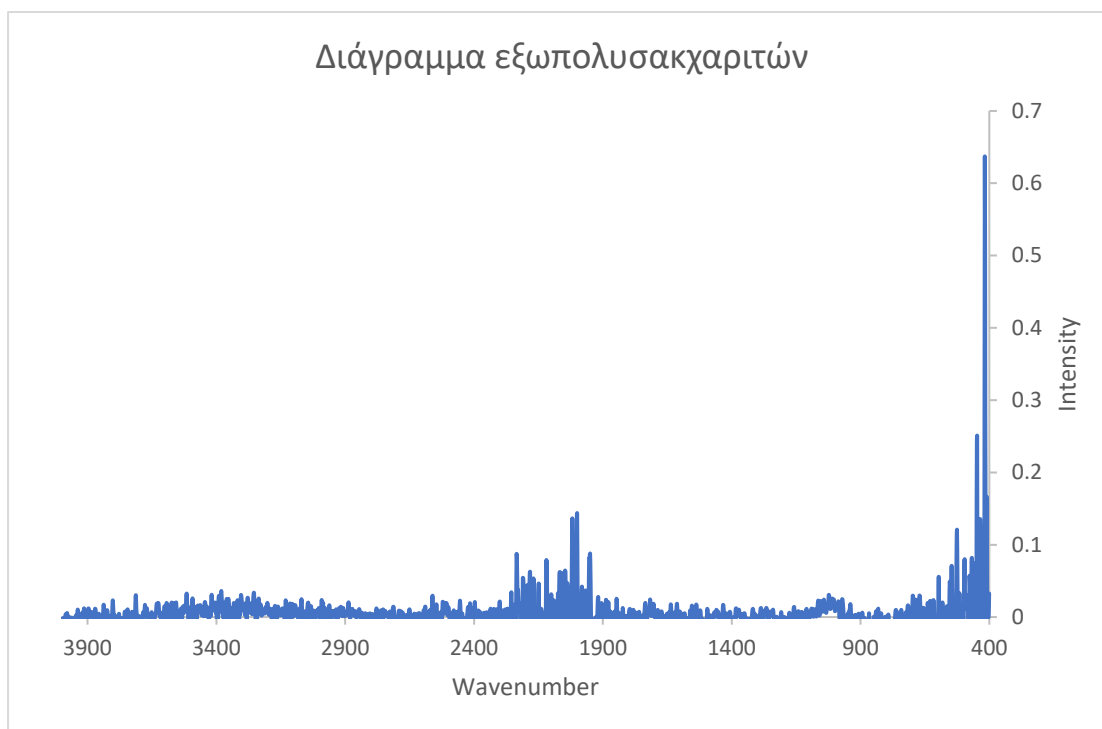
Εικόνα 54 Διάγραμμα ενδοπολυσακχαριτών FT-IR



Εικόνα 55 Διάγραμμα ενδοπολυσακχαριτών - μεγέθυνση

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούνται κορυφές στις τιμές 3.500 έως 3000, 3000 έως 2.600, στην τιμή 1.645 και στην τιμή 1004. Με βάση την βιβλιογραφία (Nasir et

al., 2021) η πρώτη καμπύλη οφείλεται στην ύπαρξη υδροξυλίων. Η δεύτερη καμπύλη οφείλεται στην ύπαρξη μεθυλικών ομάδων (-CH<sub>2</sub>), η τρίτη κορυφή οφείλεται στην ύπαρξη καρβονυλικών ομάδων (-C=O) και η τελευταία κορυφή από 884 έως 892 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στην παρουσία β-γλυκοζιτικού δεσμού και αποτελεί το βασικότερο σημείο του διαγράμματος καθώς δηλώνει στην παρουσία β δεσμών άρα και ύπαρξη β-γλυκάνης. Ωστόσο, το διάγραμμα έπρεπε να ήταν πιο ξεκάθαρο και οι κορυφές να είναι πιο ευδιάκριτες καθώς υπάρχει πιθανότητα οι πολυσακχαρίτες να καταστράφηκαν εν μέρει από τις συνθήκες εκχύλισης ή ακόμα το στέλεχος που χρησιμοποιήσαμε εξ αρχής να μην ήταν το πιο κατάλληλο. Στο παρακάτω διάγραμμα δεν μπορεί να γίνει διάκριση κορυφών κάτι το οποίο μας προβληματίζει ιδιαίτερα. Ο βασιδιομύκητας που χρησιμοποιήθηκε είναι ικανός να παράγει β-γλυκάνη εξωκυτταρικά στον θρεπτικό ζωμό και επομένως θα περιμέναμε τουλάχιστον ένα διάγραμμα σαν το παραπάνω.



Εικόνα 56 Διάγραμμα εξωπολυσακχαριτών FT-IR

### 11.3 Δημιουργία βιοφίλμ

Η δημιουργία βιοφίλμ πηκτίνης με 10% β-γλυκάνη και 2% PEG200 οπτικά ήταν επιτυχής. Το διάλυμα στέγνωσε και τα συνολικά στερεά έγιναν μία ενιαία μάζα. Το PEG200 βοήθησε πολύ στην ένωση των δύο ουσιών διότι έδωσε κολλότητα και αύξησε το ιξώδες.

## 11.4 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης

<i>E. coli</i>	Αριθμός αποικιών					τελική κυτ. συγκέντρωση*	
	δεκαδική αραιώση					CFU/mL	CFU/μεμβράνη
Είδος μεμβράνης	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
πηκτίνη	2	0	0	0	0	2x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>2</sup>
β-γλυκάνης	>300	>300	>300	48	11	4,8x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>6</sup>
πηκτίνη-β-γλυκάνης-PEG200	14	0	0	0	0	1,4x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
Αρχικός κυτταρικός πληθυσμός: ≈10 <sup>6-7</sup> CFU/μεμβράνη. * Όριο ανίχνευσης μεθόδου: 10 <sup>2</sup> CFU/μεμβράνη							

Εικόνα 57 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής μελέτης

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται πως η μεμβράνη της πηκτίνης ασκεί αντιμικροβιακή δράση διότι μετά την 24ωρη επώαση (υπό ψύξη) επέζησαν 2x10<sup>2</sup> CFU/μεμβράνη, ενώ αυτή είχε αρχικά ενοφθαλμιστεί με *E. coli* σε συγκέντρωση περίπου 10<sup>6-7</sup> CFU/μεμβράνη, οπότε είχαμε μείωση περίπου 4-5 δεκαδικών λογαρίθμων. Παρατηρούμε επίσης αντιμικροβιακή δράση στη μεμβράνη πηκτίνης-β-γλυκάνης-PEG200, ωστόσο ελαφρώς μικρότερη καθώς επέζησαν 1,4x10<sup>3</sup> CFU/μεμβράνη, δηλαδή παρατηρήθηκε μια πτώση περίπου 3-4 δεκαδικών λογαρίθμων σε σχέση με τον αρχικό ενοφθαλμισμένο μικροβιακό πληθυσμό. Τέλος στη μεμβράνη γλυκάνης δεν φαίνεται να παρατηρείται κάποια αντιμικροβιακή δράση αφού μετά την 24ωρη επώαση (υπό ψύξη) φαίνεται να έχουν επιζήσει όσα κύτταρα περίπου είχαν αρχικά ενοφθαλμιστεί (4,8x10<sup>6</sup> CFU/μεμβράνη) επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ως μικροβιοστατική. Βάσει όλων αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται πως η αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών (σε αυτές που παρατηρήθηκε) οφείλεται στη χαμηλή τιμή pH της πηκτίνης. Επίσης, αυτή εκχυλίστηκε σε pH ίσο με 2,63 μέσω κιτρικού το οποίο είναι οργανικό ασθενές οξύ (και σχετικά λιπόφιλο) και επομένως διαπερνά εύκολα τον κυτταρικό φάκελο του *E. coli*, όπου και δίσταται ενδοκυττάρια μειώνοντας το κυτταροπλασματικό pH (προκαλώντας κυτταρικό τραυματισμό και θάνατο).

Επομένως σε μεταγενέστερο χρόνο θα μπορούσε να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών παρασκευασμένων από πηκτίνη που έχει καθαριστεί από οξέα και το χαμηλό pH της έχει εξουδετερωθεί προς το ουδέτερο (7), καθώς επίσης και να μελετηθούν β-γλυκάνες από άλλα είδη μανιταριών (για πιθανή αντιμικροβιακή δράση).

## Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι αρκετά ξεκάθαρα και μπορούν να περιγραφτούν. Αρχικά, παρατηρείται πως η χρήση υπερήχων είναι μία διαδικασία που όντως μπορεί να λειτουργήσει ως εναλλακτική στην χρήση υψηλής θερμοκρασίας σε όξινες εκχυλίσσεις. Η εκχύλιση πηκτινών είναι επιτυχής, κάτι που το επιβεβαιώνει και η ανάλυση FT-IR. Η πηκτίνη εκ πρώτης όψεως σαν υλικό δείχνει ικανοποιητική για την δημιουργία φιλμ καθαρής πηκτίνης χωρίς προσθήκη άλλων ουσιών.

Από την άλλη, φάνηκε πως ο βασιδιομύκητας που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν ο κατάλληλος για το πείραμα αυτό καθώς οι πολυσακχαρίτες που προέκυψαν από τον βασιδιομύκητα *S. Commune* δεν είχαν την αντιμικροβιακή δράση που θα αναμενόταν. Εκτός των άλλων οι β-γλυκάνες αυτές δεν ταυτοποιήθηκαν επακριβώς στην ανάλυση FTI-R. Οι ενδοπολυσακχαρίτες δώσανε κάποιες κορυφές που μπορούν να χαρακτηριστούν ως κορυφές β-γλυκανών. Αντιθέτως, οι εξωπολυσακχαρίτες δεν δώσανε κορυφές και επομένως δεν είναι ακόμη γνωστό για ποιες ουσίες πρόκειται. Ωστόσο, πρέπει να γίνει αναφορά στην καινοτόμα μέθοδο παραλαβής εξωπολυσακχαριτών χωρίς χρήση οργανικού διαλύτη, πάρα μόνο μέσω επαναλαμβανόμενης ψύξης και απόψυξης του διαλύματος πολυσακχαριτών που επιτρέπει τον διαχωρισμό των μορίων πολυσακχαρίτη από το νερό. Επομένως μία τέτοια μέθοδος θα πρέπει να μελετηθεί σε βιομηχανική κλίμακα καθώς εξοικονομεί τεράστια ποσά ενέργειας και αντιδραστηρίων.

Όσον αφορά το μικροβιολογικό κομμάτι, η πηκτίνη έδειξε ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση και επομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μία καινοτόμα συσκευασία, γεγονός που ίσως οφείλεται στο χαμηλό pH εκχύλισης. Ωστόσο η β-γλυκάνη τόσο σε ακέραια μορφή αλλά και σε συνδυασμό με πηκτίνη δεν έδειξε αντιμικροβιακή δράση. Αυτό θέτει πολλά ερωτήματα καθώς η βιβλιογραφία περιγράφει πως αυτός ο βασιδιομύκητας παράγει φαρμακευτικές β-γλυκάνες με ανοσοτροποποιητικές και αντιμικροβιακές δράσεις και επομένως θα περιμέναμε να δούμε κάτι αντίστοιχο.

Επομένως καταλήγουμε στο ότι η πηκτίνη είναι ικανή να δημιουργήσει αντιμικροβιακές συσκευασίες όταν εκχυλίζεται υπό παρόμοιες συνθήκες, ενώ οι β-γλυκάνες του *S. Commune* δεν είναι κατάλληλες για αυτή την κατεργασία και θα

πρέπει και θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες τόσο στα διάφορα στελέχη του βασιδιομύκητα αλλά και μελέτες ταυτοποίησης των ουσιών που παράγει αυτός ο μικροοργανισμός, αλλά και μελέτες που να δείχνουν σε τι κατάσταση βρίσκονται οι ουσίες όταν επεξεργάζονται στα διάφορα στάδια των πειραμάτων. Και τέλος θα πρέπει οι πηκτίνες που έχουν προκύψει από παρόμοια μέθοδο εκχύλισης να υποστούν κατεργασία, αποκτήσουν pH κοντά στο βασικό και να μελετηθούν εκ νέου για αντιμικροβιακή δράση.

## Βιβλιογραφία

- Selvarajoo, A., Wong, Y. L., Khoo, K. S., Chen, W. H., & Show, P. L. (2022). Biochar production via pyrolysis of citrus peel fruit waste as a potential usage as solid biofuel. *Chemosphere*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133671>
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. In *Food Chemistry* (Vol. 196, pp. 885–896). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>
- Pérez-Bassart, Z., Fabra, M. J., Martínez-Abad, A., & López-Rubio, A. (2023). Compositional differences of  $\beta$ -glucan-rich extracts from three relevant mushrooms obtained through a sequential extraction protocol. *Food Chemistry*, 402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134207>
- Patsalou, M., Samanides, C. G., Protopapa, E., Stavrinou, S., Vyrides, I., & Koutinas, M. (2019). A citrus peel waste biorefinery for ethanol and methane production. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132451>
- Molnar, D., Novotni, D., Kurek, M., Galić, K., Iveković, D., Bionda, H., & Ščetar, M. (2023). Characteristics of edible films enriched with fruit by-products and their application on cookies. *Food Hydrocolloids*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108191>
- Taghizadeh-Alisarai, A., Hosseini, S. H., Ghobadian, B., & Motevali, A. (2017). Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 69, pp. 1100–1112). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.102>
- Etebu, E., & Nwauzoma, A. B. (2014). A review on sweet orange (*Citrus Sinensis* L Osbeck): Health, Diseases and management (Vol. 2, Issue 2). [www.usa-journals.com](http://www.usa-journals.com)
- Wathoni, N., Yuan Shan, C., Yi Shan, W., Rostinawati, T., Indradi, R. B., Pratiwi, R., & Muchtaridi, M. (2019). Characterization and antioxidant activity of pectin from Indonesian mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind. *Heliyon*, 5(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02299>
- Bakr, M. H. (2020). Citrus pulp as an innovative feed ingredient in ruminant nutrition. A Review. In *Anim. Prod* (Vol. 57).
- Liu, Q., Xu, J., Liu, Y., Zhao, X., Deng, X., Guo, L., & Gu, J. (2007). A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), 4161–4171. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm273>
- Peltzer, M., Delgado, J. F., Salvay, A. G., & Wagner, J. R. (2018).  $\beta$ -Glucan, a Promising Polysaccharide for Bio-based Films Developments for Food Contact Materials and Medical Applications. *Current Organic Chemistry*, 22(12), 1249–1254. <https://doi.org/10.2174/1385272822666171129153633>

- Wu, W., Wu, Y., Lin, Y., & Shao, P. (2022). Facile fabrication of multifunctional citrus pectin aerogel fortified with cellulose nanofiber as controlled packaging of edible fungi. *Food Chemistry*, 374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131763>
- Shaheen, T. I., Hussien, G. M. A., Mekawey, A. A., Ghalia, H. H. A., youssry, A. A., & el Mokadem, M. T. (2022). Facile extraction of nanosized  $\beta$ -glucans from edible mushrooms and their antitumor activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104607>
- He, M. Q., Wang, M. Q., Chen, Z. H., Deng, W. Q., Li, T. H., Vizzini, A., Jeewon, R., Hyde, K. D., & Zhao, R. L. (2022). Potential benefits and harms: a review of poisonous mushrooms in the world. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 42, pp. 56–68). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.06.002>
- Pilafidis, S., Diamantopoulou, P., Gkatzionis, K., & Sarris, D. (2022). Valorization of Agro-Industrial Wastes and Residues through the Production of Bioactive Compounds by Macrofungi in Liquid State Cultures: Growing Circular Economy. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/app122211426>
- Rohasmizah, H., & Azizah, M. (2022). Pectin-based edible coatings and nanoemulsion for the preservation of fruits and vegetables: A review. In *Applied Food Research* (Vol. 2, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100221>
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z. E., & Hosseini, S. S. (2017). Optimization of aqueous pectin extraction from Citrus medica peel. *Carbohydrate Polymers*, 178, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.098>
- Prakash Maran, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.052>
- Wang, Y., Huang, X., & Nie, S. (2018). *Mushrooms: Isolation and Purification of Exopolysaccharides* (pp. 191–210). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02622-6_9)
- Nasir, A. M., Ruslan, N. R. N., Zakaria, Z., Hassan, S. A. M., Ishak, N., Rohaizad, N. M., & Gunny, A. A. N. (2021).  $\beta$ -Glucan extraction from mycelium in spent mushroom substrate of pleurotus ostreatus and schizophyllum commune. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 765(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/765/1/012012>
- Zhongdong, L., Guohua, W., Yunchang, G., & Kennedy, J. F. (2006). Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, 64(4), 548–552. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.006>
- Jaros, D., Köbsch, J., & Rohm, H. (2018). Exopolysaccharides from Basidiomycota: Formation, isolation and techno-functional properties. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 18, Issue 10, pp. 743–752). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800117>



- Kazemi, M., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2019). Eggplant peel as a high potential source of high methylated pectin: Ultrasonic extraction optimization and characterization. *LWT*, *105*, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.060>
- Vlaicu, P. A., Untea, A. E., Panaite, T. D., & Turcu, R. P. (2020). Effect of dietary orange and grapefruit peel on growth performance, health status, meat quality and intestinal microflora of broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, *19*(1), 1394–1405. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1845576>
- Kang, H. J., Jo, C., Kwon, J. H., Kim, J. H., Chung, H. J., & Byun, M. W. (2007). Effect of a pectin-based edible coating containing green tea powder on the quality of irradiated pork patty. *Food Control*, *18*(5), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.010>
- Patience, N. A., Schieppati, D., & Boffito, D. C. (2021). Continuous and pulsed ultrasound pectin extraction from navel orange peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, *73*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105480>
- Farag, M. A., Abib, B., Ayad, L., & Khattab, A. R. (2020). Sweet and bitter oranges: An updated comparative review of their bioactives, nutrition, food quality, therapeutic merits and biowaste valorization practices. In *Food Chemistry* (Vol. 331). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127306>
- Chowdhary, A., Kathuria, S., Agarwal, K., & Meis, J. F. (2014). Recognizing filamentous basidiomycetes as agents of human disease: A review. In *Medical Mycology* (Vol. 52, Issue 8, pp. 782–797). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu047>
- Yousuf, O., Singh, A., & Chandra Shahi B, N. G. (n.d.). *Ultrasound Assisted Extraction of Pectin from Orange Peel Web Data base for integrated Farming Models in India View project Zero-Till, Seed cum Fertilizer Drill View project*. <https://www.researchgate.net/publication/329399066>
- Hosseini, S. M., Hoseinifar, S. H., Mazandarani, M., Paknejad, H., van Doan, H., & El-Haroun, E. R. (2020). The potential benefits of orange peels derived pectin on serum and skin mucus immune parameters, antioxidant defence and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, *103*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.019>
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *3*(2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., & Iacomini, M. (2015). D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 117, pp. 753–761). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.051>

A. Αναστασιάδη (2020). Μεταπτυχιακή Εργασία : <<Αξιοποίηση αποβλήτων βιομηχανίας παραγωγής χυμού πορτοκαλιού>>.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105480>

<https://www.growveg.com/plants/us-and-canada/how-to-grow-oranges/>

<https://www.greekgastronomyguide.gr/item/portokali/>

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE>

<http://www.agroenergy.gr/categories/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%AF%CE%B6%CE%B5%CE%BB>

<http://www.agroenergy.gr/categories/%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%B1%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CF%8C%CE%BB%CE%B7>

<http://www.agroenergy.gr/content/%CF%80%CE%BB%CE%B5%CE%BF%CE%B1%CE%B5%CE%BA%CF%84%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B1>

A. Βαφοπούλου-Μαστρογιαννάκη, 2003, Κεφάλαιο 2.2 Πηκτίνη και σχηματισμός πηκτών, Βιοχημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ 45-52.

E. Σ. Παπαδάκης, 2010, Κεφάλαιο 8 Εδώδιμες συσκευασίες, Συσκευασία Τροφίμων, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, σελ 219-235.

H. D. Belitz, W. Grosh, P. Schrieberle, 2012, Κεφάλαιο 18.1.2.3.2 Καροτινοειδή, Χημεία Τροφίμων, 4<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, σελ 824.

A. E Κουτελιδάκης, 2019, Κεφάλαιο 8.2.5 β-γλυκάνες, Λειτουργικά τρόφιμα, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Ζήτη, Αθήνα, σελ 184.

Γ. Αγγελής, 2017, Κεφάλαιο 7.3 Μύκητες, Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία, Β Έκδοση, Εκδόσεις Unibooks, Αθήνα, σελ 422.

A. Τσακρής, 2016, Κεφάλαιο 12 Ευκαρυωτικοί οργανισμοί: Μύκητες, φύκη, πρωτόζωα, έλμινθες, Εισαγωγή στην μικροβιολογία, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ 349-384

A. Γ. Χρόνη, 2020, Μεταπτυχιακή διατριβή, Παραλαβή πηκτινών από πορτοκάλια και αξιοποίησή τους για την παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών.