



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΛΕΙΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΒΥΝΗΣ
ΖΥΘΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ (BREWER'S SPENT GRAINS) ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

ΚΟΥΤΣΟΜΗΤΗΣ Β. ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

*“Not all chemicals are bad.
Without chemicals such as hydrogen and oxygen,
there would be no way to make water,
a vital ingredient in beer.”*

Dave Barry, Αμερικανός συγγραφέας και αρθρογράφος

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Μέσω της ευκαιρίας που μου δίνεται να εκφραστώ από τον πρόλογο της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κα Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα συνδυάζοντας επιστημονικά αντικείμενα της αρεσκείας μου, όπως η Πράσινη Χημεία και η Ζυθοποιία, προσφέροντάς μου παράλληλα ελευθερία, στήριξη και κατανόηση καθ' όλη της διάρκειας της διαδικασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, το κλίμα, την οργάνωση και τον επαγγελματισμό του οποίου σπάνια συναντά κανείς ακόμα και σε μεγάλους οργανισμούς. Ωστόσο, θα ήθελα να αποδώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες σε δύο μέλη του Εργαστηρίου: τη Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη και την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την πολύτιμη βοήθειά τους. Η συνεχής καθοδήγηση, η στήριξη και η ανιδιοτελής μετάδοση γνώσεων από τη Δρ. Τζάνη έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην εκπόνηση της εργασίας. Από την άλλη, η αγάπη και το πάθος της Ι. Πιττερού για ερευνητικές ανακαλύψεις σε συνδυασμό με την ασταμάτητη παροχή συμβουλών και προτάσεων έδιναν τρομερή πνοή και ενδιαφέρον στην πειραματική διαδικασία.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να επισημάνω ότι αισθάνομαι ιδιαίτερα τυχερός που υπήρξα φοιτητής της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., τόσο για τις πνευματικές και τεχνικές δεξιότητες που απέκτησα μέσω της ενασχόλησης με ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών πεδίων που προσέφερε το πρόγραμμα σπουδών, όσο και για τις γνωριμίες με σπουδαίους ανθρώπους και τις φιλίες ζωής που μου χάρισε.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για όλη την αγάπη και τη στήριξη που έχω λάβει σε κάθε μου βήμα, ακαδημαϊκό και μη. Με αφορμή την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να αναφερθώ ειδικά στους δύο συνονόματους παππούδες μου· Ιωάννη Γκιώκα, εκφράζοντας με αυτόν τον τρόπο την ευγνωμοσύνη και την αγάπη που νιώθω προς το πρόσωπό του, και Ιωάννη Κουτσομήτη, θέλοντας να τιμήσω έτσι τη μνήμη του, γνωρίζοντας πόσο χαρούμενο θα τον έκανε η απόκτηση του διπλώματός μου, καθώς ο ίδιος κατάφερε να αποφοιτήσει από το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο το έτος 1961 κάτω από αντίξοες συνθήκες.

Περίληψη

Η μπίρα είναι ένα αρχαίο ποτό και ένα από τα πιο διαδεδομένα στη σύγχρονη εποχή. Τα δισεκατομμύρια εκατόλιτρα που παράγονται ετησίως για να καλύψουν τις ανάγκες των καταναλωτών έχουν ως αναπόφευκτη συνέπεια τη δημιουργία υπέρογκων αποβλήτων. Το κυριότερο απόβλητο της ζυθοβιομηχανίας αποτελούν τα υπολείμματα βύνης ή αλλιώς Brewer's' Spent Grains (BSG). Λόγω της δομής και της χημικής σύστασης του κριθαριού, τα BSG είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Τα συστατικά αυτά είναι γνωστά για μια ποικιλία ευεργετικών ιδιοτήτων, που μπορούν να προσφέρουν πολλαπλά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία.

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES), μια σύγχρονη και πολυλειτουργική κατηγορία διαλυτών με πολλά πλεονεκτήματα, είναι ικανοί να εκχυλίσουν τις επιθυμητές βιοδραστικές ενώσεις από τα BSG. Η χρήση τους σε συνδυασμό με τεχνικές υψηλής ενέργειας, όπως οι υπέρηχοι, αποδίδουν μειωμένο χρόνο εκχύλισης και υψηλούς βαθμούς απόδοσης, ενισχύοντας φυσικά τον πράσινο χαρακτήρα της διεργασίας.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μέσω Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiment, DoE), μιας καινοτόμου και πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από τα BSG. Παρότι πραγματοποιείται έως και σήμερα αξιοποίηση των BSG ως ζωοτροφή ή σε διεργασίες τεχνολογίας τροφίμων και παραγωγής χημικών προϊόντων, η εκχύλιση των βιοδραστικών του ενώσεων έχει μελετηθεί ελάχιστα στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά την εκχύλιση BSG με χρήση DES σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση υπάρχει μόνο μία αναφορά, στην οποία όμως χρησιμοποιούνται διαφορετικοί διαλύτες, ενώ δεν πραγματοποιείται και μελέτη περαιτέρω αξιοποίησης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον στόχο της παρούσας εργασίας αποτελεί η αξιοποίηση των βιοδραστικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση με χρήση NaDES, μέσω της παρασκευής ενός καινοτόμου προϊόντος όπως είναι ένα καλλυντικό σκεύασμα με βελτιωμένες ιδιότητες. Σύμφωνα με τα παραπάνω, χρησιμοποιώντας το βέλτιστο εκχύλισμα που προέκυψε από τη διεργασία - ως έχει και χωρίς επιπλέον καθαρισμό ή στάδιο απομόνωσης του διαλύτη- παρασκευάστηκε μια καλλυντική κρέμα νερού σε έλαιο, η οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκε ως προς ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως το pH και την ανοχή της σε εναλλαγές θερμοκρασιών (κύκλος ψύξης-θέρμανσης), χωρίς να παρουσιάσει μεταβολές σε ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως η ομοιογένεια, το χρώμα και υφή.

Η πρώτη ύλη για την πειραματική μελέτη παραχωρήθηκε από το μικροζυθοποιείο ΑΘΗΝΕΟ, της ΑΘΗΝΑΪΚΗΣ ΖΥΘΟΠΟΙΑΣ. Για την καλύτερη διαχείριση και συντήρηση

πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση (freeze drying) της πρώτης ύλης και στη συνέχεια μέρος της εκχυλίστηκε με τη βοήθεια υπερηχητικής ακτινοβολίας με χρήση διαλύτη NaDES Βεταΐνη – Γλυκερόλη 1:3. Τα εκχύλισμα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις (Total Phenolic Content: TPC, Total Flavonoid Content: TFC).

Η διεξαγωγή προκαταρκτικών πειραμάτων για τη μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος, αποτέλεσε τη βάση για την επιλογή των τελικών παραμέτρων ελέγχου [(A) : χρόνος εκχύλισης, (B): ισχύς των υπερήχων, (C): αναλογία NaDES:H₂O στον διαλύτη, (D): αναλογία στερεής πρώτης ύλης προς διαλύτη] και τις τιμές αυτών που θα εφαρμοστούν στον DoE. Ο DoE, διενεργήθηκε μέσω της στατιστικής μεθόδου Taguchi και συγκεκριμένα μέσω του τύπου L₉ (3⁴), ο οποίος αναφέρεται σε έναν σχεδιασμό που απαιτεί τη διεξαγωγή 9 πειραμάτων για τη διερεύνηση της επίδρασης που έχουν στο σύστημα 4 παράμετροι 3 επιπέδων τιμών. Οι βέλτιστες – σύμφωνα με την υπόδειξη του θεωρητικού μοντέλου του DoE – συνθήκες (Χρόνος: 19.9 λεπτά, Ισχύς: 200 W, %NaDES: 90%, S/L: 100 mg_{BSG}/4 mL διαλύτη) επιβεβαιώθηκαν πειραματικά και το «βέλτιστο» εκχύλισμα που προέκυψε (TPC = 42.4 mg_{GAE}/g_{BSG}, TFC = 26.7 mg_{CAT}/g_{BSG}) οδηγήθηκε προς ανάλυση μέσω της συζευγμένης τεχνικής LC-MS, από όπου εξήχθησαν συμπεράσματα σχετικά με την παρουσία συγκεκριμένων ενώσεων στο εκχύλισμα, όπως το καφεϊκό οξύ.

Τέλος, η καλλυντική κρέμα νερού σε έλαιο (W/O) που παρασκευάστηκε και εμπλουτίστηκε με το βέλτιστο εκχύλισμα, μελετήθηκε ως προς το προφίλ αποδέσμευσης, από το οποίο συμπεραίνεται ότι το καφεϊκό οξύ αποδεσμεύεται σταδιακά κατά το υπό εξέταση χρονικό διάστημα των 5 ωρών.

Λέξεις – Κλειδιά

ζυθοβιομηχανία, υπολείμματα βύνης (BSG), φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES), εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, πολυφαινόλες, πειραματικός σχεδιασμός, καλλυντική κρέμα, καφεϊκό οξύ

Abstract

Beer is an ancient drink enjoyed by many in present times. The billions of hectoliters produced annually by consumers are inevitably leading to an excess of waste. Brewer's spent grains (BSG) are the major brewing industry byproduct; however, BSG could be easily repurposed and act as feedstock in other secondary processes, due to their consistency and low cost.

The structure and chemical composition of barley are the main reason of BSG's high polyphenol content; polyphenols are known for their bioactivity. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES), a new and highly functional type of solvents with many advantages, are able to extract the desired bioactive molecules from BSG. When combined with high-energy techniques, such as Ultrasound Irradiation, they offer reduced extraction time and higher yields and enhance the green character of the process.

The aim of this diploma thesis is the design, development and optimization of a new innovative and eco-friendly extraction process from BSG using Natural Deep Eutectic solvents (NaDES). Even though BSG have recently been used as food for livestock or raw material in Food Technology and Chemicals Industries, extracting its bioactive compounds has been barely studied. BSG extraction using only DES as a solvent system is referred to only one publication so far, and even this study uses different solvents with no further research on valorization of the extracts. Another aim of this diploma thesis is the valorization of the bioactive extracts. Thus, a beauty cosmetic cream (water-in-oil emulsion) was produced using the optimum BSG extract as received. Furthermore, the cream was tested regarding some important quality properties such as pH and its resilience in temperature fluctuations (Freeze-thaw cycle), displaying no alterations to its homogeneity, color and texture.

The Raw Material was supplied by the microbrewery *AΘHNEO* of Athenian Brewery S.A. For better handling and storage, BSG were freeze-dried and part of them was extracted using an Ultrasound probe system with NaDES Betaine-Glycerol (1:3) as a solvent. The results of the extraction were evaluated in terms of their Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content (TPC, TFC)

Preliminary Experiments were conducted in order to choose the final Experimental Design Factors (extraction time, Ultrasound Power, NaDES:H₂O ratio in solvent system and

Solid to Liquid ratio). For the Design of Experiment (DoE) the Taguchi statistical method was used and specifically the $L_9(3^4)$ formula, where 9 is the requisite number of experiments to be conducted, 3 denotes the number of Factor Levels and 4 correspond to the Factors. The optimum - according to the theoretical model – conditions, were experimentally implemented (TPC = 42.4 mg_{GAE}/g_{BSG}, TFC = 26.7 mg_{CAT}/g_{BSG}). The optimum extract was characterized by LC-MS and was found to be rich in caffeic acid.

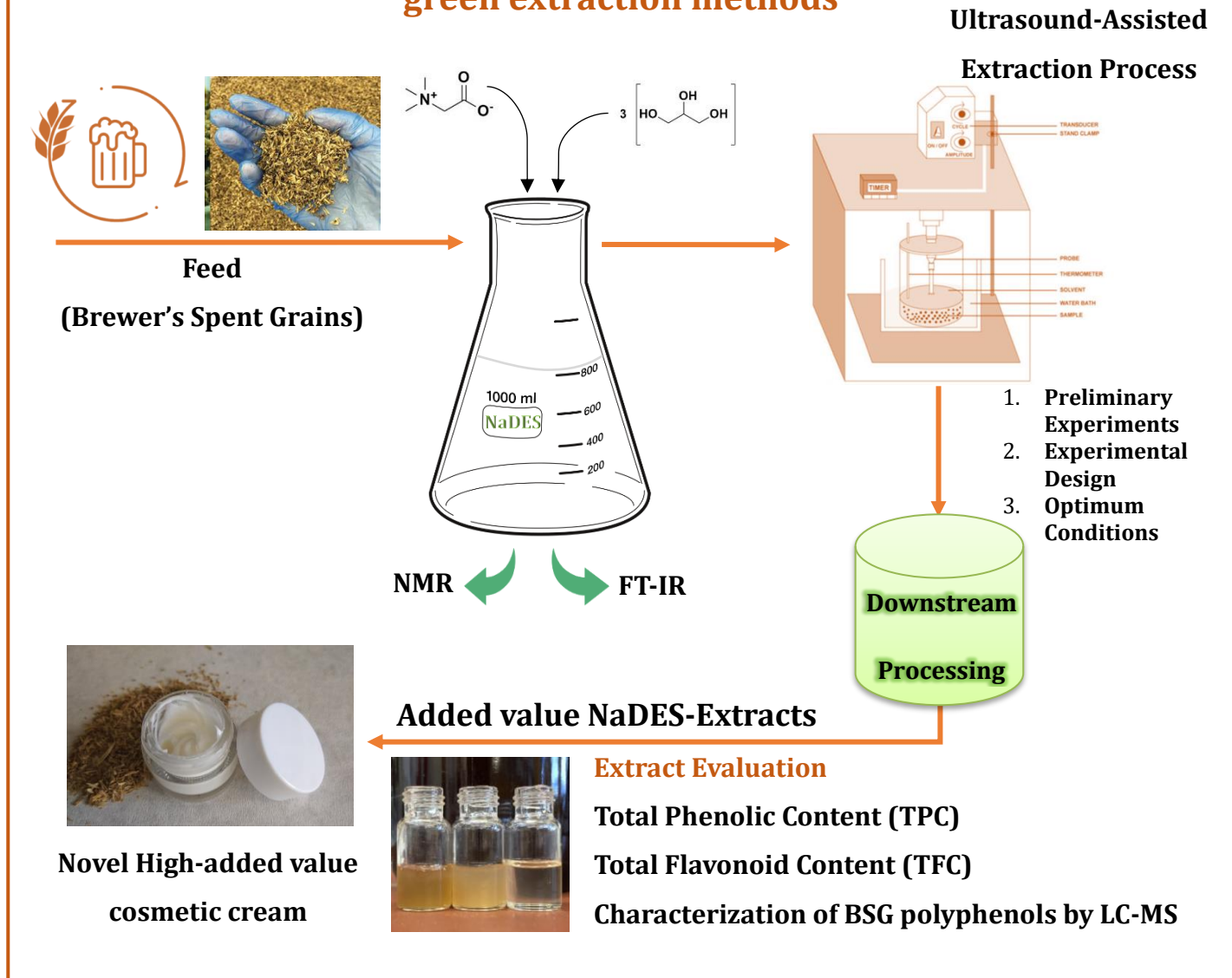
Finally, the release profile of caffeic acid from the cosmetic formulation was studied. The result showed a gradual release of caffeic acid over a period of 5 hours.

Keywords

Brewing Industry, Brewer's Spent Grains (BSG), Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES), Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), Polyphenols, Design of Experiments, Cosmetic Cream, Caffeic acid

Graphical Abstract

Valorization of Brewer's spent grain implementing green extraction methods



Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	iii
Περίληψη.....	iv
Abstract.....	vi
Graphical Abstract	viii
Περιεχόμενα	ix
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων / Διαγραμμάτων.....	xii
Κατάλογος Πινάκων	xvi
Συνομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xvii
1. Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.2 Μπίρα και Ζυθοβιομηχανία	3
1.2.1 Ιστορική αναδρομή.....	3
1.2.2 Πρώτες ύλες ζυθοποίησης.....	5
1.2.3 Ζυθοβιομηχανία: προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι.....	9
1.2.4 Στάδια Ζυθοποίησης.....	10
1.3 Υπολείμματα βύνης (BSG).....	14
1.3.1 Σύσταση των BSG.....	14
1.3.2 Αποθήκευση και Συντήρηση των BSG	18
1.3.3 Φαινολικές Ενώσεις των BSG.....	19
1.4 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES).....	26
1.4.1 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES).....	30
1.5 Πειραματικός Σχεδιασμός	39
1.6 Κοσμητολογία	41
1.6.1 Κρέμες και γαλακτωματοποιητές.....	41

1.6.2	Αξιολόγηση καλλυντικών κρεμών.....	44
1.6.3	Χρήση NaDES σε καλλυντικά προϊόντα.....	46
2.	Πειραματικό Μέρος.....	51
2.1	Σκοπός.....	51
2.2	Πειραματική Διαδικασία.....	51
2.2.1	Υλικά και αντιδραστήρια	51
2.2.2	Όργανα και συσκευές.....	53
2.2.3	Προετοιμασία πρώτης ύλης.....	54
2.2.4	Γενική μέθοδος παρασκευής NaDES.....	54
2.2.5	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)	56
2.2.6	Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων	57
2.2.7	Πειραματικός σχεδιασμός (μέθοδος Taguchi).....	65
2.2.8	Παρασκευή καλλυντικής κρέμας	68
2.2.9	Αξιολόγηση καλλυντικής κρέμας	69
3.	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	71
3.1	Χαρακτηρισμός NaDES	71
3.1.1	Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$	71
3.1.2	Φασματοσκοπία FT-IR.....	72
3.1.3	Μελέτη σημαντικών ιδιοτήτων	73
3.2	Πειραματικός Σχεδιασμός	75
3.2.1	Προκαταρκτικά πειράματα.....	75
3.2.2	Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού	78
3.2.3	Βελτιστοποίηση διεργασίας & Επιβεβαίωση Μοντέλου	86
3.2.4	Χαρακτηρισμού βέλτιστου εκχυλίσματος με τη μέθοδο LC-MS	91
3.3	Παρασκευή και Χαρακτηρισμός καλλυντικής κρέμας	93
3.3.1	Μελέτη σταθερότητας και αξιολόγηση	94

3.3.2 Αξιολόγηση pH	95
3.3.3 Μελέτη αποδέσμευσης εκχυλίσματος από την καλλυντική κρέμα με χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-MS.	96
4. Συμπεράσματα	101
5. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	104
Βιβλιογραφία.....	106

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων / Διαγραμμάτων

Εικόνα 1: Οι κυριότεροι 4 από τους 17 ΣΒΑ, όρους των οποίων καλούνται να πετύχουν οι σύγχρονες ζυθοβιομηχανίες έως το 2030.....	2
Εικόνα 2: Υπολείμματα βύνης (BSG).....	14
Εικόνα 3: BSG μετά από λυοφιλοποίηση και κονιοποίηση. Α. κοκκομετρία < 1 mm. Β. κοκκομετρία > 1mm.....	54
Εικόνα 4: NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3 (Bet-Gly 1:3).....	55
Εικόνα 5: Συσκευή υπερήχων με probe.	56
Εικόνα 6: Εκχυλίσματα NaDES(Bet-Gly 1:3) - BSG διαφορετικής συγκέντρωσης σε βιοδραστικά συστατικά (πυκνό → αραιό).	57
Εικόνα 7: Οργανολογική διάταξη συζευγμένης τεχνικής LC-MS.....	62
Εικόνα 8: Πειραματική διάταξη για την εφαρμογή της μεθόδου μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης.	69
Εικόνα 9: Καλλυντική κρέμα με ενσωματωμένο το βέλτιστο εκχύλισμα.....	93
Εικόνα 10: Αξιολόγηση της υφής των κρεμών: A. Blank, B. Extract, C. DES.	94
Σχήμα 1: Στάδια βυνοποίησης	11
Σχήμα 2: Στάδια Ζυθοποίησης.....	13
Σχήμα 3: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας της μπίρας	13
Σχήμα 4: Εγκάρσια τομή κόκκου κριθαριού. ³	15
Σχήμα 5: Οι κυριότερες ομάδες φαινολικών ενώσεων που συναντώνται στη ζυθοποιία. ³	20
Σχήμα 6: (α) Φαινυλοπροπανοειδές βιοσυνθετικό μονοπάτι ΥΚΟ. 4CL: 4-κουμαρικό-συνένζυμο Α-λιγάση, C3'H: p-κουμαροϋλο-εστερ-3-υδροξυλάση, C4H: 4-υδροξυλάση κινναμωμικού οξέος, CHS: συνθάση της χαλκόνης; COMT: καφεΐκ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση; HCT, υδροξυκινναμοϋλο-τρανσφεράση, HQT, υδροξυκινναμοϋλο-	

συνένζυμο A; PAL: λυάση αμμωνίας φαινυλαλανίνης. (β) Γενικός κορμός C6-C3 ΥΚΟ και οι μοριακοί τύποι δημοφιλών ΥΚΟ συναρτήσει των υποκαταστατών τους.....	22
Σχήμα 7: Τομείς αξιοποίησης παραπροϊόντων βιομάζας, όπως τα BSG, ταξινομημένοι ως προς την εκτιμώμενη προστιθέμενη αξία σε μορφή πυραμίδας. ...	24
Σχήμα 8: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας.....	27
Σχήμα 9: Ενδεικτικά φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για την παρασκευή NaDES. ⁵⁰	31
Σχήμα 10: (α) Ταπείνωση σημείου τήξεως σε ένα βαθέως ευτηκτικό μίγμα σε σύγκριση με ένα ευτηκτικό μίγμα. (β) Απλοποιημένη απεικόνιση του φαινομένου δημιουργίας ευτηκτικού μίγματος σε μοριακό επίπεδο.	32
Σχήμα 11: Διατάξεις UAE. (A) σύστημα με probe υπερήχων και (B) λουτρό υπερήχων. ⁷²	38
Σχήμα 12: Σύνθεση γαλακτωμάτων και ο ρόλος των γαλακτωματοποιητών	43
Σχήμα 13: Μελέτη αποδέσμευσης με τη μέθοδο μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης (Dialysis bag method).....	46
Σχήμα 14: Μοριακή δομή της χλωριούχου χολίνης.....	48
Σχήμα 15: Επιλεγμένα συστατικά για σχεδιασμό NaDES που προορίζονται για κοσμητολογική εφαρμογή και οι χημικές δομές τους. ⁸³	50
Σχήμα 16: Απεικόνιση σχηματισμού NaDES Bet-Gly 1:3.....	55
Σχήμα 17: Μέθοδος του AlCl ₃ για τον προσδιορισμού ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, βασισμένη στη δημιουργία συμπλόκων Al (III) – φλαβονοειδών. <i>(Για λόγους σχηματικής απεικόνισης, η βαλανοκετόνη έχει χρησιμοποιηθεί ως παράδειγμα γνωστού φλαβονοειδούς)</i>	61
Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου σχηματισμού ιόντων APCI. ⁹⁰	64
Σχήμα 19: Δημιουργία καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο πολλαπλών εξωτερικών προτύπων.....	65
Σχήμα 20: Συνολικό διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας παρασκευής και αξιολόγησης καλλυντικής κρέμας.....	70
Σχήμα 21: Φάσμα 1H-NMR Bet-Gly 1:3 (DMSO-d ₆).....	71

Σχήμα 22: Φάσμα FT-IR (ATR) του NaDES Bet-Gly 1:3	73
Σχήμα 23: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων και οι κωδικοί αυτών.....	75
Σχήμα 24: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων στα 9 εκχυλίσματα του Πειραματικού Σχεδιασμού και οι κωδικοί αυτών.....	78
Σχήμα 25: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του Πειραματικού Σχεδιασμού κατά την εκχύλιση: Α. φαινολικών ενώσεων και Β. φλαβονοειδών.....	82
Σχήμα 26: Διαγράμματα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την αριστοποίηση της απόδοσης της διεργασίας ως προς τις μεταβλητές TPC και TFC.	88
Σχήμα 27: Σύγκριση φασμάτων LC-MS: Α. εκχυλίσματος και Β: καφεϊκού οξέος,	91
Σχήμα 28: Σύγκριση φασμάτων LC-MS: Α. Εκχυλίσματος, Β: καφεϊκού οξέος, και Γ: NaDES Bet-Gly.....	92
Σχήμα 29: Τιμές pH για τους διάφορους τύπους δέρματος.....	96
Σχήμα 30: Ενδογενείς παράγοντες που επιδρούν στο pH του δέρματος. ⁹²	96
Σχήμα 31: Φάσματα LC-MS για μελέτη αποδέσμευσης (pH 5.5 , 32°C) χρονικής διάρκειας 5h.....	97
Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος για απορρόφηση στα 755 nm.....	57
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για απορρόφηση στα 510 nm. 59	
Διάγραμμα 3: Εξάρτηση της πυκνότητας και του ιξώδους από τη θερμοκρασία	74
Διάγραμμα 4: Λόγοι S/N που προέκυψαν κατά τη μελέτη της επίδρασης των μεταβλητών ελέγχου στην ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.	79

Διάγραμμα 5: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων στα 3 εκχυλίσματα «βέλτιστων συνθηκών» και οι κωδικοί αυτών.....	90
Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος σύμφωνα με τη μέθοδο των εξωτερικών προτύπων	93
Διάγραμμα 7: Ποσοστιαίος ρυθμός αποδέσμευσης του κύριου συστατικού του εκχυλίσματος από την καλλυντική κρέμα.....	98
Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer–Peppas.....	99
Διάγραμμα 9: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi	100

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Τυπική ανάλυση νερού συσχετιζόμενη με περιοχές ιδιαίτερης σημασίας για τη ζυθοποίηση. ³	6
Πίνακας 2: Σύσταση κριθαριού σε ξηρή βάση. ¹¹	16
Πίνακας 3: Κυριότερα συστατικά των BSG. ¹⁶	17
Πίνακας 4: Περιεχόμενο ΥΒΟ στα BSG. ³³	21
Πίνακας 5: Περιεχόμενο ΥΚΟ στα BSG. ³³	21
Πίνακας 6: Συνήθη συστατικά των DESs που προορίζονται για εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων.....	29
Πίνακας 7: Όργανα και συσκευές πειραματικής διαδικασίας.....	53
Πίνακας 8: Αναλογίες του μίγματος διαλυτών κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής μεθόδου LC	63
Πίνακας 9: Οι παράμετροι και οι τιμές που εφαρμόστηκαν κατά τα προκαταρκτικά πειράματα. (A: > 1 mm και B: < 1 mm).....	66
Πίνακας 10: Πίνακας δεδομένων εισόδου για την εφαρμογή Πειραματικού Σχεδιασμού [Taguchi (L ₉ 3 ⁴)]	67
Πίνακας 11: Συνδυασμός 3 τιμών 4 παραμέτρων για Πειραματικό Σχεδιασμό Taguchi 9 Επιπέδων	67
Πίνακας 12: Πίνακας αποκρίσεων των λόγων S/N για ανάλυση “Large is better”	80
Πίνακας 13: Εξαγόμενες από το θεωρητικό μοντέλο βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης BSG με χρήση υπερήχων και διαλύτη NaDES-H ₂ O, για μέγιστη ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.	89
Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποιοτικών χαρακτηριστικών και των ελέγχων σταθερότητας,.....	94
Πίνακας 15: Κυριότερα κινητικά μοντέλα και οι εξισώσεις τους.	99

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΔΕ	Διπλωματική Εργασία
BSG	Brewer's Spent Grains
NaDES	Natural Deep Eutectic Solvent
TPC	Total Phenolic Content
TFC	Total Flavonoid Content
UAE	Ultrasound Assisted Extraction
DoE	Design of Experiment
HLB	Hydrophilic-lipophilic Balance
LC	Liquid Chromatography
FC	Folin – Ciocalteu
FCR	Folin – Ciocalteu Reagent
UV-Vis	Ultraviolet–visible spectroscopy
FDA	Food and Drug Administration
SNR	Signal to Noise Ratio
OA	Orthogonal Arrays

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Η εντεινόμενη επιδείνωση της κατάστασης του παγκόσμιου οικοσυστήματος και οι αυξανόμενες επιπτώσεις από την - ανεξέλεγκτη πολλές φορές - χρήση επικίνδυνων χημικών ουσιών από τον άνθρωπο, έχουν εγείρει έντονες ανησυχίες αλλά και το ενδιαφέρον επιστημόνων και ερευνητών για την αντιμετώπιση αυτών των νέων προκλήσεων. Η κλιματική αλλαγή αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη απειλή για την ανθρωπότητα στις μέρες μας, με τις συνέπειες που επιφέρει - όπως η λειψυδρία, η ελάττωση των φυσικών πόρων, τα ακραία καιρικά φαινόμενα και η εξάλειψη της βιοποικιλότητας - να είναι ήδη ορατές, επηρεάζοντας όχι μόνο το ζην αλλά και το επιχειρείν των κατοίκων του πλανήτη.

Ήδη από το 1992, 178 χώρες, δηλαδή σχεδόν όλα τα διεθνώς αναγνωρισμένα ανεξάρτητα έθνη, αποφάσισαν κατά τη Σύνοδο Κορυφής για τη Γη (Ρίο Ντε Τζανέιρο, Βραζιλία) να υιοθετήσουν ένα ολοκληρωμένο σχέδιο δράσης (Ατζέντα 21), με πυλώνες τη βιώσιμη ανάπτυξη, τη βελτίωση της ανθρώπινης ζωής και την προστασία του περιβάλλοντος. Ακολούθησε η Σύνοδος Κορυφής της Χιλιετίας (Νέα Υόρκη, 2000) , όπου θεσπίστηκαν για πρώτη φορά 8 διακριτοί στόχοι (Αναπτυξιακοί Στόχοι Χιλιετίας) βασισμένοι στα παραπάνω πεδία. Ωστόσο, η χρονιά ορόσημο ήταν το 2015 όπου όλα τα κράτη-μέλη του ΟΗΕ ενέκριναν πολλές σημαντικές συμφωνίες (Πλαίσιο Sendai, Συμφωνία του Παρισιού κ.α.) με σπουδαιότερη την Ατζέντα 2030. Η Ατζέντα 2030 αποτελείται από 17 Στόχους Βιώσιμης Ανάπτυξης (ΣΒΑ) και όπως υποδηλώνει η ονομασία της δεσμεύει όλες τις χώρες και κατ' επέκταση τους αρμόδιους φορείς και οργανισμούς για δράση και αποτελέσματα με χρονικό ορίζοντα το 2030.¹

Έτσι, ως απόρροια των αποφάσεων αυτών, οι σύγχρονες βιομηχανίες καλούνται να συνεισφέρουν στην επίτευξη διάφορων από τους παραπάνω στόχους, ανάλογα πάντα και με το πεδίο δράσης τους. Η αναγκαιότητα επίτευξης των συγκεκριμένων στόχων σε συνδυασμό με αυστηρές νομοθετικές ρυθμίσεις θέτει συχνά τις βιομηχανίες υπό οικονομική και πολιτική πίεση. Όσον αφορά τις βιομηχανίες ζύθου, έναν σχετικά φιλικό ως προς το περιβάλλον κλάδο, τα μέτρα εξοικονόμησης ενέργειας και νερού, οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα, καθώς και η

ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης αποβλήτων, αποτελούν πλέον προτεραιότητα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Οι κυριότεροι 4 από τους 17 ΣΒΑ, όρους των οποίων καλούνται να πετύχουν οι σύγχρονες ζυθοβιομηχανίες έως το 2030.

Η επιστήμη της πράσινης χημείας και τεχνολογίας μπορεί να διαδραματίσει καταλυτικό ρόλο στην αντιμετώπιση ζητημάτων περιβαλλοντικής οικονομίας και βιωσιμότητας. Στην ουσία, η πράσινη χημεία ή αλλιώς βιώσιμη-αιφορική χημεία, μπορεί να στηρίζεται στο ίδιο θεωρητικό υπόβαθρο με την κλασσική χημεία, ωστόσο δίνει μεγαλύτερη έμφαση στο σχεδιασμό των μεθόδων και εφαρμογών. Παράλληλα, εξετάζει όλες τις συνιστώσες της παραγωγικής διαδικασίας και τη σκοπιμότητα τους, με στόχο η οικονομική ανάπτυξη, μέσω των προϊόντων και των υπηρεσιών του βιομηχανικού κλάδου, να επέρχεται με τρόπο περιβαλλοντικά και κοινωνικά αποδεκτό. Εστιάζοντας στη διαχείριση αποβλήτων, μέσω της πράσινης χημείας και τεχνολογίας και της «έξυπνης» αξιοποίηση τους, το πρόβλημα αυτό μπορεί να μετατραπεί σε μια ευκαιρία ανάπτυξης της βιομηχανικής δραστηριότητας. Ειδικότερα, τα απόβλητα φυτικής προέλευσης καταλαμβάνουν ένα τεράστιο ποσοστό των συνολικών αποβλήτων που παράγονται ετησίως, αλλά ταυτόχρονα αποτελούν και μια εξαιρετική πηγή βιοδραστικών συστατικών. Η εκχύλιση είναι μια πολύτιμη διεργασία, εδραιωμένη εδώ και δεκαετίες στον βιομηχανικό χώρο, που πλέον χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από απόβλητα. Με το ενδιαφέρον να έχει στραφεί τελευταία στην πράσινη εκχύλιση, φιλική ως προς το περιβάλλον διαλύτες, όπως οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, που μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα για τέτοιες εφαρμογές προσφέροντας πληθώρα πλεονεκτημάτων στη διεργασία, θεωρούνται πολλά υποσχόμενοι, παρότι είναι ένα πεδίο σχετικά ανεξερεύνητο με λίγες βιβλιογραφικές αναφορές.

1.2 Μπίρα και Ζυθοβιομηχανία

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Με τον όρο "ζυθοβιομηχανία", γίνεται αναφορά σε όλες τις βιομηχανίες εκείνες που ασχολούνται με την επιστήμη της ζυθοποιίας, δηλαδή την παραγωγή ζύθου ή μπίρας, όπως είναι ευρύτερα πλέον γνωστή. Η σημερινή της ονομασία προέρχεται από τη λατινική λέξη *bibere*, που σημαίνει «πίνω». Όντας φυσικό προϊόν, η μπίρα θεωρείται πως είναι το παλαιότερο ποτό του κόσμου, καθώς και το πλέον διαδεδομένο, αφού αποτελεί το πρώτο σε καταναλώσεις (23 L/άτομο ανά έτος) αλκοολούχο (συνήθως) ποτό παγκοσμίως και το πέμπτο κατά σειρά ρόφημα γενικότερα, μετά το τσάι, τα αναψυκτικά, το γάλα και τον καφέ.²

Πρόκειται για ένα ποτό, που στα ιστορικά κείμενα δεν περιγράφεται μόνο ως προς τις φυσικοχημικές του ιδιότητες (ποιότητα) και την επιστημονική του σημασία ως τεχνολογικό επίτευγμα για την εκάστοτε εποχή, αλλά ως στοιχείο διάκρισης κουλτούρας, θρησκείας, γαστρονομικής παιδείας και διαμόρφωσης πολιτισμού. Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας, αμέτρητα είδη αλκοολούχων ποτών έχουν χαρακτηριστεί με τον όρο «μπίρα», γεγονός που κάνει τη διατύπωση ακριβούς ορισμού δύσκολη υπόθεση.

Βέβαια, τα παραπάνω ποτά παρατηρείται να έχουν ως κοινό παρονομαστή τα ζυμώσιμα σάκχαρα, διαφόρων προελεύσεων (φρούτα, ζαχαροκάλαμα, μέλι, δημητριακά κ.α.) ανάλογα με τη διαθεσιμότητα στις αντίστοιχες περιοχές. Έτσι, λοιπόν, η ζυθοποίηση φαίνεται πως αποτέλεσε για πρώτη φορά έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα κατά τη Νεολιθική Εποχή, η έναρξη της οποίας χρονολογείται περίπου το 10000 π.Χ., αφού είναι γνωστό πως τότε μερικές από τις παραπάνω πρώτες ύλες ήταν σε αφθονία και χρησιμοποιούνταν ευρέως.

Μπορεί τα πρώτα επιβεβαιωμένα στοιχεία για παραγωγή μπίρας προέρχονται από την Κίνα (7000 π.Χ.), ωστόσο η περιοχή που αναπτύχθηκε ισχυρά το δημοφιλές ποτό, ήταν η νότια Μεσοποταμία στην αρχή της πέμπτης χιλιετίας π.Χ., γεγονός που αποδίδεται στην ευνοϊκή για καλλιέργειες γεωγραφική της θέση. Στην περιοχή αυτή, αρχαιολόγοι ανακάλυψαν μέσω ανασκαφών την αρχαιότερη γνωστή έως και σήμερα συνταγή μπίρας. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε πως οι Σουμέριοι, όπως αποκαλούνταν οι πληθυσμοί της περιοχής, χρησιμοποιούσαν την μπίρα ως νόμισμα. Επίσης το 3500

π.Χ., στη Σουμεριακή Ουρούκ, τη μεγαλύτερη πόλη του τότε γνωστού κόσμου (80000 κάτοικοι), παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση στις καλλιέργειες κριθαριού. Κατά τη κατάρρευση της αυτοκρατορίας των Σουμέριων, οι Βαβυλώνιοι άρχισαν να εκμεταλλεύονται τη γόνιμη περιοχή της Μεσοποταμίας και το 1754 ενέταξαν στον περίφημο κώδικα Χαμουραπί τους πρώτους νόμους κατανάλωσης μπίρας. Συνάμα, η μπίρα άρχισε να διαδίδεται και στην αρχαία Αίγυπτο (πρώτα στοιχεία 3000 π.Χ.). Οι πρώτοι «επίσημοι» ζυθοποιοί ήταν γυναίκες και ανάμεσά τους οι ιερείς της θεάς Νινκάσι, προστάτιδας της μπίρας. Οι Αιγύπτιοι το 2500 π.Χ. ανακάλυψαν το καλαμάκι και το χρησιμοποιούσαν στα παλάτια τους για να απολαμβάνουν την μπίρα χωρίς στερεά υπολείμματα. Μισό αιώνα αργότερα, ασσυριακές επιγραφές αναφέρουν ότι η μπίρα ήταν ανάμεσα στις προμήθειες της κιβωτού του Νώε. Επιπλέον, αναφορές (1200 π.Χ.) φανερώνουν πως στην Αίγυπτο οι φαραώ αμείβουν με μπίρα τους εργάτες που χτίζουν τις πυραμίδες. Την ίδια περίοδο, Μινωίτες έμποροι μετέφεραν την μπίρα στα ελληνικά παράλια, όπου η αιγυπτιακή λέξη zythum άρχισε να διαδίδεται ως ζύθος. Παραμένοντας στον ελλαδικό χώρο, διαπιστώνεται ότι το ποτό των ελευσίνιων μυστήριων, ο Κυκεώνας, αποτελούσε κι αυτός ένα είδος μπίρας, αφού πρόκειται για μίγμα από κριθάρι, νερό και βότανα.

Στη μ.Χ. εποχή, το στην αυλή του βασιλιά Αρθούρου (520) παραγόταν μπίρα ειδικά για τους ιππότες της στρογγυλής τραπέζης. Το 822 στην εποχή του Καρλομάγνου, ένας Βενεδικτίνος μοναχός προσέθεσε για πρώτη φορά στην μπίρα λυκίσκο, με στόχο την επέκταση του χρόνου ζωής της. Η πικράδα που προσδίδει όμως το φυτό αυτό έρχεται να ισορροπήσει ιδανικά με τη γλυκύτητα της βύνης με αποτέλεσμα να αρχίσει να καθιερώνεται ως βασικό συστατικό. Στα χρόνια της πρώτης χιλιετίας, στα μεσαιωνικά μοναστήρια η μπίρα αποτελούσε απαραίτητο συμπλήρωμα διατροφής κατά τη νηστεία, γεγονός που υποδηλώνει και τη θρεπτική της αξία. Το 1350 στην κεντρική Ευρώπη αποθέματα μπίρας στα κελάρια των κατοίκων της αντικαθιστούν το μολυσμένο νερό και σώζουν ζωές από την πανούκλα. Στη Βαυαρία (1516) ο Γουλιέλμος Δ' εκδίδει τον πρώτο διατροφικό νόμο «Περί αγνότητας της μπίρας» όπου αναφέρεται ότι η μπίρα θα παράγεται μόνο από κριθάρι, λυκίσκο και νερό. Τον 16^ο αιώνα, οι Ινδιάνοι στη Νέα Γη έφτιαχναν την μπίρας τους από καλαμπόκι, ώσπου οι Προσκυνητές τους έμαθαν το κριθάρι.

Όσον αφορά πιο σύγχρονες ιστορικές αναφορές, αξίζει να σημειωθεί ότι η εφεύρεση του θερμομέτρου, του υγρομέτρου και της ατμοκίνητης μηχανής κατά τη βιομηχανική επανάσταση, οδήγησαν σε μαζική παραγωγή μπίρας. Επιπρόσθετα, η μπίρα αποτέλεσε μια από τις πειραματικές πρώτες ύλες του Λουί Παστέρ (18^{ος} αι.), που τον κατεύθυναν στην επινοήση της παστερίωσης: ανακάλυψη-ορόσημο για τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Καθοριστικά για την ανάπτυξη της μπίρας ήταν και τα χρόνια της ποτοαπαγόρευσης (1920), καθώς ενέπνευσαν παράτολμους ζυθοποιούς να δημιουργήσουν νέες συνταγές. Τέλος, τη δεκαετία του '30 στην Ευρώπη και στην Αμερική εμφανίστηκαν τα πρώτα εμφιαλωτήρια και εμπορικά ψυγεία, ενώ λίγα χρόνια αργότερα επινοήθηκαν τα κουτάκια αλουμίνιου.

1.2.2 Πρώτες ύλες ζυθοποίησης

Σήμερα παρασκευάζονται ποικίλα είδη και παραλλαγές ανάλογα με τη δημιουργικότητα και τους στόχους του ζυθοποιού) που διαφοροποιούνται κυρίως ως προς τη διαδικασία ζύμωσης, το χρώμα, τη γεύση και τη "δύναμη" της μπίρας, δηλαδή τους αλκοολικούς βαθμούς. Παρόλα αυτά, σχεδόν όλες οι παραλλαγές έχουν τέσσερα κοινά βασικά συστατικά, τα οποία δεν είναι άλλα από το νερό, το κριθάρι, τον λυκίσκο και τη μαγιά. Επιπλέον αξίζει να σημειωθούν και ορισμένα δευτερεύοντα συστατικά, όπως το σιτάρι, το ρύζι, το καλαμπόκι καθώς και η ζάχαρη, που μπορούν να αντικαταστήσουν μερικώς ή ακόμα και πλήρως το κριθάρι. Αναλυτικότερα για τα 4 κύρια συστατικά:³

→ Το **νερό**, αποτελεί το 90-99% της μπίρας, ανάλογα και με το είδος της. Το ποσοστό αυτό φανερώνει τη σημασία του συγκεκριμένου συστατικού, καθώς η σύσταση του μπορεί να επηρεάσει δραματικά το αποτέλεσμα στο τελικό προϊόν, αλλά και στην παραγωγική διαδικασία γενικότερα. Παραδοσιακά, το νερό που χρησιμοποιούνταν για παραγωγή μπίρας από τους πρώτους ζυθοποιούς, ήταν αυτό που υπήρχε διαθέσιμο στην τοπική περιοχή. Για τον λόγο αυτό, η φύση του νερού (Πίνακας 1) των αντίστοιχων περιοχών, έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη μερικών από τους δημοφιλέστερους τύπους μπίρας, όπως οι μπίρες Lager, οι οποίες χρειάζονται ιδιαίτερα "μαλακό" νερό, το οποίο και είναι διαθέσιμο σε περιοχές όπως το Pilsen της Δημοκρατίας της Τσεχίας. Τα μεταγενέστερα χρόνια η ανάγκη/ επιθυμία για δημιουργία πανομοιότυπης μπίρας σε

διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ή η παρασκευή διαφορετικών τύπων στην περιοχή, δημιούργησε την ανάγκη για την επεξεργασία του νερού και τη διαχείριση της ιοντικής του σύστασης. Άλλωστε, οι φυσικές παροχές νερού δεν είναι ποτέ πλήρως καθαρές, αφού μολύνονται από ατμοσφαιρικούς ρύπους, τόσο φυσικούς, όσο και τεχνητούς (ανθρωπογενείς). Γι' αυτόν τον λόγο το μεγαλύτερο μέρος του νερού υπόκειται σε επεξεργασία, το είδος της οποίας εξαρτάται από τη φύση του και από τη μετέπειτα χρήση του (νερό βυνοποίησης, βρασμού - παρασκευής ζυθογλέυκους, ζύμωσης, καθαρισμού).

Κύριοι σκοποί της επεξεργασίας είναι αρχικά η απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών και διαλυμένων συστατικών και στη συνέχεια η ρύθμιση του pH και των περιεχομένων αλάτων, καθώς και η αποστείρωση του νερού (όζον, UV ακτινοβολία), εφόσον κρίνεται απαραίτητη. Τέλος, πρέπει να θεωρείται αυτονόητο ότι ανεξαρτήτου χρήσης το νερό πρέπει να είναι πόσιμο και απαλλαγμένο από οσμές.

Πίνακας 1: Τυπική ανάλυση νερού συσχετιζόμενη με περιοχές ιδιαίτερης σημασίας για τη ζυθοποίηση.³

Ανάλυση (mg/L)	Μπάρτον (Αγγλία)	Ντόρτμουντ (Γερμανία)	Πίλσεν (Τσεχία)	Μόναχο (Γερμανία)	Λονδίνο (Αγγλία)
Ασβέστιο	250-350	200-250	5-8	80-100	80-100
Μαγνήσιο	20-35	20-30	3-4	18-22	4-6
Διττανθρακικά Άλατα	300-350	150-200	12-12	150-180	100-120
Ανθρακικά Άλατα	130-150	-	-	-	12-130
Νάτριο	15-25	40-50	Ίχνη	50-55	2-5
Χλώριο	15-40	50-60	4-8	30-40	15-20

- Το **κριθάρι**, είναι η βασική πρώτη ύλη για τη ζυθοποίηση και καθορίζει το χρώμα της μπίρας και τη διαπεραστικότητα της γεύσης. Κατά τη συλλογή του, το κριθάρι περιέχει: το φυτό του κριθαριού σε εμβρυακό επίπεδο μαζί με αποθεματικά συστατικά, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, υπεύθυνα για τη

βλάστηση του εμβρύου. Βέβαια, δε χρησιμοποιείται απευθείας στην παραγωγή, καθώς πρέπει πρώτα να βυνοποιηθεί.

Η βυνοποίηση είναι αναγκαία προκειμένου ο φλοιός του κριθαριού να "ανοίξει" και επομένως το άμυλο και οι πρωτεΐνες να είναι εύκολα προσβάσιμα στα ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται παράλληλα με σκοπό να αποικοδομήσουν το άμυλο. Μόνο έτσι το κριθάρι θα δώσει στο νερό τα απαραίτητα σάκχαρα, τα οποία σε επόμενο στάδιο θα χρειαστεί η μαγιά για να αναπτυχθεί, με τη βοήθεια βέβαια και άλλων ενώσεων (πρωτεΐνες, βιταμίνες και μέταλλα).

Οι λόγοι που το κριθάρι έχει επικρατήσει έναντι αντίστοιχων δημητριακών και έχει επιλεχθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή μπίρας είναι ποικίλοι. Αρχικά, δεν απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες ώστε να καλλιεργηθεί, γεγονός που εξαλείφει τους γεωγραφικούς περιορισμούς και το κάνει εύκολα προμηθεύσιμο. Επιπρόσθετα, οι σπόροι κριθαριού έχουν πανομοιότυπο μέγεθος και προστατεύονται από ένα παχύ κέλυφος (6% κ.β του συνολικού σπόρου), που διευκολύνει τις διαδικασίες βυνοποίησης και ζυθοποίησης.

Τελευταίο και σημαντικότερο, αποτελείται κατά 60-65% (ξ.κ.β) από άμυλο, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από τα συγκρινόμενα δημητριακά, ενώ τα επίπεδα λιπών και ελαίων είναι σχετικά χαμηλά και έτσι αποφεύγονται προβλήματα στη γεύση και στη σταθερότητα του τελικού προϊόντος.

- Ο **λυκίσκος**, εννοώντας το άνθος του ομώνυμου φυτού, χρησιμοποιείται κατά κόρον στον κλάδο της ζυθοποιίας και προσδίδει στην μπίρα αρώματα και τη χαρακτηριστική της πικρή γεύση, μέσω των ρητινών των άνθεων των θηλυκών φυτών.

Το μέρος του φυτού που ενδιαφέρει περισσότερο τους ζυθοποιούς είναι οι αδένες λουπουλίνης, στην καρδιά των οποίων περιέχεται λουπουλίνη σε μορφή σκόνης. Εκεί οι ρητίνες και τα αιθέρια έλαια σε μικρότερο ποσοστό (~3% ξ.β. w/w), βρίσκονται ζωντανά και προστατεύονται από ένα εξωτερικό περίβλημα, το βράκειο. Οι ρητίνες διαχωρίζονται σε «μαλακές» (soft), με σημαντικότερα τα α-οξέα και «σκληρές» (hard), τα β-οξέα. Η πικράδα οφείλεται ως επί το πλείστον στα α-οξέα, τα οποία την προσδίδουν κατά τη διάρκεια του βρασμού όπου ισομεριώνονται (ισο-α-οξέα) · η ισομερίωση αυξάνει τον δείκτη πικράδας των α-οξέων κατά 9 φορές.³ Πέρα από τη γεύση, τα α-οξέα συμβάλλουν και στη

συντήρηση της μπίρας. Άλλωστε αυτός ήταν και ο λόγος που το φυτό πρωτοχρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή της.

Τέλος, ο λυκίσκος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγική διαδικασία σε διάφορες μορφές και στάδια. Παραδοσιακά, χρησιμοποιούνταν ολόκληροι ξηραμένοι κώνοι λυκίσκου, αλλά σήμερα για λόγους λειτουργικότητας και αποδοτικότητας, οι κώνοι μετατρέπονται σε pellets ή οδηγούνται προς εκχύλιση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι συχνά, πριν γίνει pellets ή εκχύλισμα, ο λυκίσκος προ-ισομεριώνεται με τη βοήθεια θερμότητας. Στην περίπτωση αυτή το τελικό προϊόν δε χρειάζεται να υποστεί βρασμό ώστε να αποδώσει το γευστικό και αρωματικό περιεχόμενό του, γεγονός που επιφέρει ευελιξία στην παραγωγική διαδικασία και ελαχιστοποιεί τις απώλειες γέυσης. Οι ρητίνες και τα αιθέρια έλαια όποτε κρίνεται απαραίτητο εκχυλίζονται με διαλύτη, που στις μέρες μας είναι σχεδόν αποκλειστικά το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

- Η **μαγιά** είναι η γενική ονομασία που έχει δοθεί σε μια ομάδα μικροοργανισμών, οι οποίοι ταξινομούνται στους μύκητες. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι τα γένη ζυμομυκήτων ξεπερνούν τα 100, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε περισσότερα από 700 μεμονωμένα είδη. Οι αριθμοί αυτοί αυξάνονται συνεχώς καθώς ανακαλύπτονται νέα είδη. Ένα τυπικό κύτταρο μαγιάς αποτελείται από περίπου 80% νερό. Σε στοιχειακή ανάλυση, το ξηρό κλάσμα του κυττάρου αποτελείται ενδεικτικά από 50% C, 30-35% O, 5% N, 5% H, 1% P και το υπόλοιπο ποσοστό είναι ιχνοστοιχεία. Σε μακρομοριακό επίπεδο, το 40-45% είναι πρωτεΐνες, το 30-35% υδατάνθρακες, το 6-8% νουκλεϊκά οξέα και το 4-5% λιπίδια. Στη ζυθοποιία όλες οι ζύμες ανήκουν στην οικογένεια των ασκομυκήτων και όλα τα στελέχη είναι μέλη του γένους *Saccharomyces*. Για τους ζυθοποιούς υπάρχουν πρακτικά δύο τύποι μαγιάς: οι βυθοζύμες και οι αφροζύμες. Οι μπίρες που ζυμώνονται με βυθοζύμες λέγονται *lager* ενώ οι μπίρες που ζυμώνονται με αφροζύμες λέγονται *ale*.

Οι ζωντανοί αυτοί μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη μετατροπή του ζυθογλεύκους σε μπίρα. Πέρα όμως την προφανή μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα κατά την αλκοολική ζύμωση, υπάρχουν και άλλα συστατικά που παράγονται από τις μεταβολικές δραστηριότητες της μαγιάς. Αυτά τα μεταβολικά προϊόντα δεν είναι πολλές φορές γνωστά, αλλά το

σίγουρο είναι ότι είναι εκατοντάδες, πιθανώς και χιλιάδες, και επιδρούν έντονα στο γευστικό και αρωματικό προφίλ της μπίρας. Οι συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων μεταβάλλονται ισχυρά από διάφορες συνθήκες, όπως το σχετικό βάρος και την οξυγόνωση του ζυθογλεύκους, τη θερμότητα και τον ρυθμό ρίψης της μαγιάς. Από τη στιγμή που τέτοιες σχετικά μικρές αλλαγές μπορούν να επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις, οι γνωστότερες μάρκες μπίρας έχουν φροντίσει να έχουν τις δικές τους «μυστικές» συνταγές μαγιάς. Δηλαδή, κάνουν το προϊόν τους ξεχωριστό, χρησιμοποιώντας αποκλειστικά συγκεκριμένα μεμονωμένα στελέχη ζυμομυκήτων, που σε συνδυασμό με αυστηρούς ελέγχους στις παραπάνω παραμέτρους, οδηγούν σε σταθερή ποιότητα. Τέλος, η μαγιά αφού χρησιμοποιηθεί σε μια παρτίδα παραγωγής, συλλέγεται, επεξεργάζεται και στη συνέχεια μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί προτού απορριφθεί - συνήθως 3-4 φορές - ανάλογα και με τις προδιαγραφές που έχει θέσει η εκάστοτε ζυθοβιομηχανία για τον δείκτη βιωσιμότητας της μαγιάς. Ο δείκτης αυτός ορίζεται ως το ποσοστό των ενεργών κυττάρων μέσα σε ένα πληθυσμό και τυπικά επιθυμείται να είναι υψηλότερος του 90%, ώστε η μαγιά να θεωρηθεί κατάλληλη για ζύμωση.

1.2.3 Ζυθοβιομηχανία: προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι

Όσον αφορά το τοπίο που έχει διαμορφωθεί στην αγορά μπίρας τον 21^ο αιώνα, τη μερίδα του λέοντος (50% της παγκόσμιας παραγωγής) καταλαμβάνουν πολυεθνικές εταιρείες, ενώ ακολουθούν χιλιάδες μικροζυθοποιίες. Για να γίνει αντιληπτή η διάκριση μεταξύ των δύο κατηγοριών, στις μεγάλες ζυθοποιίες η ετήσια παραγωγή αγγίζει τα 100 εκατομμύρια εκατόλιτρα, σε αντίθεση με μια μικροζυθοποιία που το μέγεθος αυτό βρίσκεται κοντά στα 1000 εκατόλιτρα. Παρά το μικρό ποσοστό των μικρών αυτών παραγωγών στα μερίδια (5-7% στην αγορά των Η.Π.Α.⁴), η επίδρασή τους στην αγορά και στη δημιουργία τάσεων είναι σημαντική, με αποτέλεσμα πολλές φορές να εξαγοράζονται από τις κυρίαρχες ζυθοβιομηχανίες, οι οποίες παράλληλα επενδύουν και σε ανερχόμενες κατηγορίες - νέα είδη (μπίρα χωρίς αλκοόλ, με λιγότερες θερμίδες κ.α.) με σκοπό να προσελκύσουν νέες ομάδες καταναλωτών.

Είναι σαφές ότι οι απαιτήσεις για ανταγωνιστικότητα είναι αυξημένες, όμως πέρα από τέτοιου είδους κινήσεις ανάπτυξης-διεύρυνσης του πορτοφολίου τους, οι σύγχρονες εταιρείες παραγωγής και εμπορίας μπίρας είναι αναγκασμένες να προσαρμόζουν τις στρατηγικές και τα παραγωγικά πρότυπά τους στους περιβαλλοντικούς κανονισμούς. Γι' αυτό ήδη ένα μεγάλο μέρος αυτών έχει αποβάλλει το γραμμικό μοντέλο οικονομίας, υιοθετώντας μια πιο «κυκλική» νοοτροπία.

Πιο συγκεκριμένα, μερικές σύγχρονες προσεγγίσεις και δράσεις που καλούνται να εφαρμόσουν είναι:

- να μειώσουν το αποτύπωμα άνθρακα που δημιουργούν μέσω διάφορων σταδίων της αλυσίδας εφοδιασμού (γεωργία, συσκευασία, διανομή, ψύξη),
- να στραφούν περισσότερο σε ανανεώσιμες μορφές ενέργειας (ηλιακή, αιολική, υδροηλεκτρική) για παραγωγή ηλεκτρισμού και να καλύπτουν τις θερμικές του ανάγκες με βιώσιμο τρόπο (βιοαέριο, ανάκτηση θερμότητας, καύση βιομάζας).
- να αξιοποιούν με σύνεση το νερό και να μεγιστοποιούν τα ποσοστά επαναχρησιμοποίησης και ανακύκλωσης του και όταν δεν είναι εφικτό αυτό να το επεξεργάζονται πριν το αποβάλλουν.
- να προμηθεύονται πρώτες ύλες (π.χ. κριθάρι και λυκίσκο) από βιώσιμες πηγές και να αξιοποιούν τα παραπροϊόντα
- να αυξήσουν τον αριθμό των επιστρεφόμενων γυάλινων φιαλών

1.2.4 Στάδια Ζυθοποίησης

Τα κύρια συστατικά που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.2.2, για να αποδώσουν το τελικό προϊόν, τα κύρια συστατικά που αναφέρθηκαν παραπάνω διέρχονται από σειρά σταδίων, όπως ο βρασμός, η ψύξη, η ζύμωση και η ωρίμανση (Σχήμα 3). Πιο αναλυτικά, η παραγωγική διαδικασία μπορεί να διαχωριστεί σε δύο βασικά μέρη: τη βυνοποίηση και τη ζυθοποίηση: ^{3,5}

- Βυνοποίηση: κύριος σκοπός της είναι ο σχηματισμός ενζύμων (α-αμυλάση, β-αμυλάση, πρωτεάσες, πρωτεϊνάσες, κ.ά.) στους σπόρους των δημητριακών. Τα στάδια της βυνοποίησης συνοψίζονται παρακάτω (Σχήμα 1):

Στάδιο 1^ο : Καθαρισμός και αποθήκευση

- Το κριθάρι αφού καθαριστεί και διαχωρισθεί ανάλογα με το μέγεθος του, αποθηκεύεται για μερικές εβδομάδες.

Στάδιο 2^ο : Ελεγχόμενη βλάστηση

- Ακολουθεί μια διαδικασία ελεγχόμενης βλάστησης, η οποία αποτελείται από 3 στάδια: τη διαβροχή, τη βλάστηση και τη φρύξη (θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία περιορισμένου αέρα ή οξυγόνου / ξήρανση).

Διαβροχή

- Καθαροί κόκκοι κριθαριού τοποθετούνται σε δεξαμενές με νερό σε θερμοκρασία 5-8 °C για 2 μέρες. Το νερό εισέρχεται στο έμβρυο και το ποσοστό υγρασίας των κόκκων αγγίζει το 42-48%. Σ αυτό το στάδιο το νερό ανανεώνεται κάθε 6-8 ώρες. Η ενυδάτωση κατά τη διαβροχή ξεκινάει τη βλάστηση και ενεργοποιεί τον μεταβολισμό της αλευρώνης.

Βλάστηση

- Το κριθάρι μεταφέρεται σε δοχείο βλάστησης, όπου περιστρέφεται με περιστρεφόμενο κοχλία, ενώ ταυτόχρονα έρχεται σε επαφή με υγρό αέρα που διαπερνά τους κόκκους και κρατάει τη θερμοκρασία στους 15-21 °C. Αυτό το στάδιο διαρκεί 6-7 ημέρες και προάγει τη σύνθεση και δράση των ενζύμων στην αλευρώνη και στο αμυλούχο ενδοσπέρμιο, συμπεριλαμβανομένων των αμυλασών, των πρωτεασών, των β-γλυκανών κ.α. Τα ένζυμα αυτά τροποποιούν τη δομή του αμυλούχου ενδοσπερμίου.

Φρύξη

- Η βύνη ξηραίνεται στους 40-60 °C, με το ποσοστό υγρασίας να πέφτει στο 4-5%. Έτσι, αποφεύγεται η μικροβιακή μόλυνση και ενεργοποιούνται τα αρώματα των συστατικών. Μετά από αυτό το στάδιο η βύνη αποθηκεύεται για 3-4 εβδομάδες, ώστε να επέλθει ισορροπία και ομοιογένεια.

Σχήμα 1: Στάδια βυνοποίησης

- Ζυθοποίηση: είναι η κύρια διαδικασία παραγωγής ζύθου, δηλαδή μπίρας. Τα στάδια και οι συνθήκες αυτών μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με τον τύπο της παραγόμενης μπίρας, τον στόχο και τις τεχνικές που εφαρμόζει ο εκάστοτε ζυθοποιός. Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα βασικά στάδια που ακολουθούνται, τα οποία και παρουσιάζονται παρακάτω (Σχήμα 2):

Στάδιο 1° : Άλεση βύνης

- η βύνη αλέθεται στην κατάλληλη κοκκομετρία.

Στάδιο 2° : Παραγωγή Ζυθογλεύκους

- Το νερό αναμειγνύεται με το αλεσμένο – βυνοποιημένο κριθάρι στη δεξαμενή βρασμού, όπου η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από τους 37 στους 78 °C, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί το ζυθογλεύκος: ένα γλυκό, σακχαρώδες υγρό.
- Το υγρό αυτό προκύπτει μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης κυρίως του αμύλου της βύνης αλλά και των πρωτεϊνών, των β-γλυκανών και των αραβινοξυλανών.
- Το άμυλο μετατρέπεται σε ζυμώσιμα (π.χ. μαλτόζη) και μη (π.χ. δεξτρίνες) σάκχαρα, ενώ οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται σε πολυπεπτίδια και αμινοξέα. Η πορεία της σακχαροποίησης παρακολουθείται στο εργαστήριο με προσθήκη ιωδίου σε δείγμα της δεξαμενής.

Στάδιο 3° : Διήθηση Ζυθογλεύκους

- Η δεξαμενή βρασμού επικοινωνεί με μια δεύτερη δεξαμενή, όπου εκεί γίνεται το πρώτο «φιλτράρισμα» και το ζυθογλεύκος απαλλάσσεται από την πλειοψηφία των **στερεών**.
- Εδώ φανερώνεται πως η επιλογή της κοκκομετρία στο προηγούμενο στάδιο είναι κομβική, καθώς ο ίδιος ο φλοιός, με την προϋπόθεση ότι έχει το σωστό πάχος διαδραματίζει τον ρόλο του διηθητικού χαρτιού.

BSG

- Το στερεό υπόλειμμα βύνης (**Brewer's Spent Grains: BSG**) που μένει στη δεύτερη δεξαμενή συλλέγεται ως **παραπροϊόν** και επιδέχεται περαιτέρω διαχείρισης όπως αναλύεται εκτενέστερα στην ενότητα 1.3

Στάδιο 4° : Βρασμός Ζυθογλεύκους

- Το ζυθογλεύκος επιστρέφει στη δεξαμενή βρασμού, όπου πραγματοποιείται ο βρασμός (45-90 λεπτά) με στόχο αφενός την αποστείρωση του γλεύκους από ανεπιθύμητα βακτήρια και αφετέρου την περάτωση κάθε ενζυμικής δραστηριότητας. Πολλές φορές εδώ, προστίθεται και ο λυκίσκος.

Στάδιο 5° : Φυγοκέντρωση

- Το βρασμένο ζυθογλεύκος οδηγείται στη φυγόκεντρο, όπου απομακρύνονται και τα τελευταία υπολείμματα λυκίσκου και πρωτεϊνών.

Στάδιο 6° : Ζύμωση

- Έχοντας αποκτήσει την απαιτούμενη καθαριότητα και θερμοκρασία, το γλεύκος μεταφέρεται στα δοχεία ζύμωσης.
- Η μαγιά που προστίθεται αρχικά αναπτύσσεται ταχεία, καταναλώνοντας οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά (ο πληθυσμός της πολλαπλασιάζεται περίπου 7 φορές).
- Μόλις καταναλωθεί το οξυγόνο, ξεκινάει η αναερόβια ανάπτυξη της, που συνοδεύεται από παραγωγή αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα.
- Η απελευθέρωση διοξειδίου είναι ένας τρόπος να ελεγχθεί, οπτικά, η πορεία της ζύμωσης. Ωστόσο, ελέγχεται και φυσικοχημικά (μέτρηση σακχάρων, πυκνότητας) με τη λήψη δειγμάτων καθημερινά.
- Το στάδιο της ζύμωσης διαρκεί 5-9 μέρες και εξαρτάται άμεσα με το επιθυμητό τελικό αποτέλεσμα.

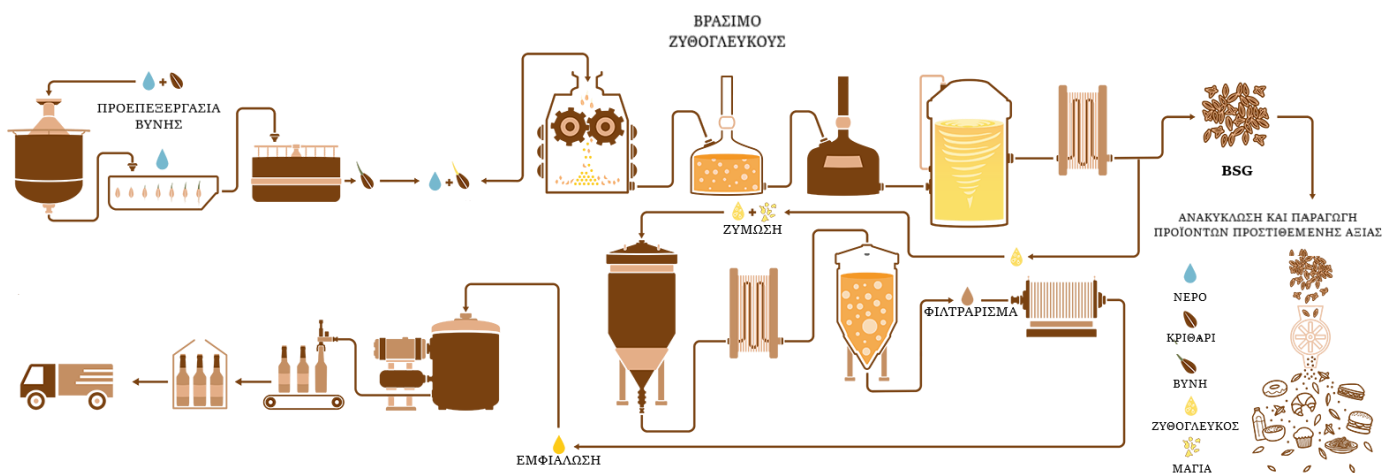
Στάδιο 7° : Ωρίμανση

- Μετά τη ζύμωση, η μαγιά απομακρύνεται μέσω βαρυτικού διαχωρισμού ή διήθησης και η μπίρα, πλέον, καταλήγει σε δοχεία (*lager*) όπου ωριμάζει, συνήθως για 2-4 εβδομάδες. Βέβαια το στάδιο της ωρίμανσης μπορεί να διαρκέσει ακόμα και χρόνια.

Στάδιο 7° : Φιλτράρισμα

- Ολοκληρώνοντας, για την παραγωγή των περισσότερων μπιρών του εμπορίου, πραγματοποιείται και το στάδιο του φιλτραρίσματος, πριν εμφιαλωθεί και καταλήξει στους καταναλωτές. Το πιο διαδεδομένο μέσο φιλτραρίσματος είναι η γη διατόμων.

Σχήμα 3: Στάδια Ζυθοποίησης



Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας της μπίρας

1.3 Υπολείμματα βύνης (BSG)

Τα υπολείμματα βύνης ή αλλιώς Brewer's Spent Grains (BSG) (Εικόνα 2), όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προκύπτουν από το στάδιο παραγωγής του ζυθογλεύκου και είναι το κύριο παραπροϊόν της ζυθοβιομηχανίας, καθώς αποτελεί το 85% των συνολικών αποβλήτων.⁶ Η τελική τους μάζα αντιστοιχεί περίπου στο 31% της αρχικής ποσότητας βύνης και υπολογίζεται ότι για κάθε 100 L μπίρας που παράγονται, δημιουργούνται κατά μέσο όρο 20 κιλά BSG.⁷

Δεδομένου ότι η ετήσια παραγωγή μπίρας σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχεται κοντά στα 1.9 δισεκατομμύρια εκατόλιτρα την τελευταία δεκαετία^{8,4}, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι πρόκειται για ένα άφθονο παραπροϊόν, με ρυθμό παραγωγής άνω των 3 εκατομμυρίων τόνων/χρόνο στην Ευρώπη και άνω των 4,5 εκατομμυρίων τόνων/χρόνο στις ΗΠΑ.^{9,10}

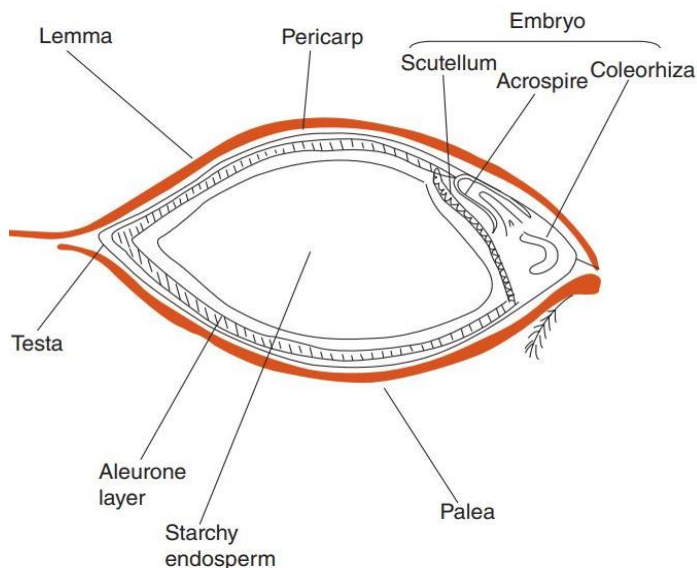


Εικόνα 2: Υπολείμματα βύνης (BSG)

1.3.1 Σύσταση των BSG

Τα BSG είναι ουσιαστικά το βυνοποιημένο κριθάρι το οποίο έχει εισέλθει στην παραγωγική διαδικασία, έχει προσδώσει μέρος από το περιεχόμενό του στο νερό μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης και έχει καταλήξει «απόβλητο» διατηρώντας στη μάζα του συστατικά όπως αδιάλυτες πρωτεΐνες, υπολείμματα κυτταρικών τοιχωμάτων και επικαλύμματα των σπόρων του κριθαριού.⁵ Από βοτανικής απόψεως ο κόκκος του κριθαριού είναι καρυόψις, δηλαδή ένας ξηρός, μονόσπορος καρπός που

το περίβλημα του είναι ενωμένο με το περικάρπιο, τον ιστό που προηγείται του φλοιού και περιβάλλει τον καρπό, προστατεύοντας το κατά την ανάπτυξη. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4) παρουσιάζονται τα σημαντικότερα μέρη ενός κόκκου κριθαριού, ενώ στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 2) περιγράφεται η σύσταση του κριθαριού σε ξηρή βάση.^{3,11,12}



Σχήμα 4: Εγκάρσια τομή κόκκου κριθαριού.³

- Φλοιός (Husk = Lemma + Palea) : αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, λιγνίνη και πυρίτιο και συνιστά περίπου το 10% του δημητριακού σε ξηρό βάρος. Έχει πολυστρωματική δομή, με την πιο λεπτή στρώση του να εφάπτεται στο περικάρπιο. Κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης ο φλοιός αποτρέπει την αφυδάτωση του κόκκου.
- Περικάρπιο (Pericarp): το περικάρπιο είναι η στρώση που διαφοροποιεί ως κατηγορία τα φρούτα από τους σπόρους: οι σπόροι έχουν μόνο περίβλημα (testa). Αποτελεί μόνο το 1% του συνολικού βάρους του κόκκου του κριθαριού και δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη βυνοποίηση και στη ζυθοποίηση. Ωστόσο το φαινολικό του περιεχόμενο δίνει ιδιαίτερη αξία στα BSG, στα οποία καταλήγει.
- Περίβλημα – Κέλυφος (Testa): είναι η λεπτότερη στρώση του κριθαριού και αποτελείται από δύο λιπιδικές στοιβάδες. Είναι διαπερατό στο γιββερελλικό οξύ αλλά δεν επιτρέπει τη διάχυση αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους, από το εσωτερικό προς τα έξω. Όμοια με το περικάρπιο εμπεριέχει ποσότητες φαινολικών.
- Στρώση αλευρώνης (Aleurone layer): βρίσκεται ακριβώς κάτω από το περίβλημα και αντιπροσωπεύει το 10% του συνολικού βάρους. Είναι πολύ σημαντική καθώς ευθύνεται για τη σύνθεση και απελευθέρωση υδρολυτικών και αναγωγικών ενζύμων στο αμυλούχο ενδόσπερμα. Τα κύτταρα της

περιέχουν ένα πλήθος διαφορετικών ενώσεων: λιπίδια (30%), πρωτεΐνες (20%), φυτικό οξύ (IP6: ρυθμιστής pH), πεντοσάνες, σουκρόζη, βιταμίνες B, β-γλυκάνες και ιχνοστοιχεία.

- Ενδόσπερμα (Endosperm) : το μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού του κόκκου κριθαριού αποτελείται από το αμυλούχο ενδόσπερμα. Είναι η «αποθήκη τροφίμων» του κριθαριού, μέσα στην οποία υπάρχουν κύτταρα με λεπτά τοιχώματα που περιέχουν κόκκους αμύλου (παράγονται από σακχαρόζη). Επίσης πολύ σημαντικό συστατικό του ενδοσπέρματος είναι η πρωτεϊνική μήτρα (πρωτεϊνόκοκκος), όπου περιέχονται ποσότητες πρωτεϊνών με κυριότερες την αλβουμίνη, τη σφαιρίνη, τη γλουτελίνη και την ορδεΐνη.
- Έμβρυο (Embryo) : μαζί με το ενδόσπερμα συνιστούν όλο το εσωτερικό του κόκκου, αποτελώντας ουσιαστικά το βλαστάρι του σπόρου. Είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και παράγει ορμόνες (π.χ. γιβερελίνες) που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του φυτού. Οι γιβερελίνες μεταφέρονται στην αλευρώνη, διεγείρουν την παραγωγή και την απελευθέρωση ενζύμων αποδόμησης του ενδοσπέρματος, κατά την έναρξη της βλάστησης. Σε ώριμη φάση το έμβρυο αποτελεί το 3-4% του συνολικού ξηρού βάρους του κριθαριού και τα κυριότερα συστατικά που περιέχει είναι: λιπίδια (25%), πρωτεΐνες (10%), σουκρόζη (10%), ραφινόζη (2%), βιταμίνες B.

Πίνακας 2: Σύσταση κριθαριού σε ξηρή βάση.¹¹

Συστατικό	Περιεχόμενο (% ξ.β.)
Άμυλο	60-64
Αραβινοξυλάνες	4,4 - 7,8
β-γλυκάνες	3,6 - 6,1
Κυτταρίνη	1,4 - 5,0
Απλοί Υδατάνθρακες (γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη)	0,41 - 2,9
Ολιγοσακχαρίτες (ραφινόζη, φρουκτοσάνη)	0,16 - 1,8
Πρωτεΐνες	8 - 15
Λιπίδια	2 - 3
Ιχνοστοιχεία	2 - 3

Από τη χημική σύσταση και δομή της πρώτης ύλης από την οποία προέκυψε, καθώς και από τις διεργασίες που υπεβλήθη μέχρι να αποβληθεί ως παραπροϊόν, συμπεραίνεται ότι τα BSG αποτελούνται κυρίως από τον φλοιό, το περικάρπιο και το περίβλημα (ή κέλυφος). Συνεπώς το περιεχόμενό τους σε άμυλο είναι πρακτικά μηδαμινό, λόγω της έλλειψης του αμυλούχου ενδοσπέρματος.

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση των BSG είναι: i) οι μέθοδοι και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη βυνοποίηση και κατά τον διαχωρισμό τους από το ζυθογλεύκος³, ii) η ποικιλία του κριθαριού και η περίοδος συγκομιδής⁶, iii) ο βαθμός καβουρδίσματος της βύνης.^{13,14} Σε γενικές γραμμές ωστόσο, γίνεται λόγος για ένα λιγνοκυταρρινούχο υλικό, με υψηλό ποσοστό σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες (ημικυτταρίνη και κυτταρίνη).¹⁵ Από τα δεδομένα μελετών που έχουν ασχοληθεί με τη χημική σύσταση των BSG τα τελευταία χρόνια, τα ποσοστά αυτά είναι περίπου 20% και 70% αντίστοιχα.⁶ Παράλληλα, θεωρούνται πλούσια πηγή φαιολικών ενώσεων, ειδικότερα υδροξυκιναμικών οξέων. Επιπλέον, τα BSG περιέχουν μια αξιόλογη ποσότητα βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Στις βιταμίνες συμπεριλαμβάνονται το φολικό οξύ (0,2 ppm), η νιασίνη (44 ppm), η βιοτίνη (0,1 ppm), η χολίνη (1800 ppm) κ.α.^{6,16} ενώ στα σημαντικότερα ιχνοστοιχεία συμπεριλαμβάνονται: το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, ο φώσφορος, το νάτριο, το κάλιο, το θείο, το σελήνιο, το κοβάλτιο, ο χαλκός και το μαγγάνιο · όλα σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 0,5%.⁶ Ακόμα, επισημαίνεται ότι ο φλοιός του κόκκου του κριθαριού περιέχει υψηλές ποσότητες πυριτίου. Μελέτες αναφέρουν ότι περίπου το 25% των ιχνοστοιχείων του κριθαριού είναι πυριτιούχα.¹⁷ Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζεται ενδεικτικά ανάλυση της χημικής σύστασης των BSG

Πίνακας 3: Κυριότερα συστατικά των BSG.¹⁶

Συστατικά (g/kg _{BSG}) σε ξηρή βάση					
Πρωτεΐνες	Λιγνίνη	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνη		Βιβλιογραφική Μελέτη
		(γλυκόζη)	(ξυλόζη)	(αραβινόζη)	
153	278	168	199	85	Mussato and Roberto (2006)
240	119	254	-	-	Kanauchi et al (2001)
246	217	219	206	90	Carvalho et al (2004)
-	169	253	-	-	Moreira et al (2004)
247	194	217	136	56	Moreira et al (2013)

1.3.2 Αποθήκευση και Συντήρηση των BSG

Τα ζυμώσιμα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες και η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία¹⁶ (77-81%) των BSG, συνεπάγονται εύφορο έδαφος για ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ο μικρός χρόνος ζωής τους, που υπολογίζεται στις 7-10 μέρες⁹, και ο μεγάλος τους όγκος εξαιτίας της ποσότητας νερού, δυσχεραίνουν την περαιτέρω διαχείρισή τους και την αξιοποίησή τους σε νέες εμπορικές δραστηριότητες. Για τον λόγο αυτόν, όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια μελετώνται μέθοδοι που θα παρατείνουν την αποθήκευσή τους.

Αρχικά, αύξηση του χρόνου ζωής μπορεί να επιτευχθεί μέσω κατεργασίας με οξέα¹⁸ (γαλακτικό, βενζοϊκό, μυρμηκικό, οξικό) ή άλλων χημικών (π.χ. σορβικό κάλιο¹⁹), όμως η νοοτροπία αυτή έρχεται σε αντίθεση με την τάση της εποχής και την επιθυμία των καταναλωτών και επιχειρήσεων για πιο «καθαρά» και φυσικά προϊόντα και διεργασίες. Συνεπώς, η καλύτερη λύση για τη διεύρυνση του χρόνου ζωής των BSG θεωρείται η ξήρανση. Οι βασικότερες τεχνικές ξήρανσης που μπορούν να εφαρμοστούν σε βιομηχανικό επίπεδο είναι:

- Ξήρανση σε φούρνο, με περιορισμό η θερμοκρασία να είναι χαμηλότερη των 60 °C, ώστε η σύσταση των BSG να παραμείνει αμετάβλητη. Αποτελεί ίσως την πιο εύχρηστη λύση αλλά μειονεκτεί ως προς την κατανάλωση ενέργειας.⁶
- Ξήρανση με υπέρθερμο ατμό σε λεπτή στρώση δείγματος. Βελτιώνει σημαντικά τη συνολική απόδοση της διεργασίας.^{20,21}
- Ξήρανση σε κλίβανο αποστείρωσης, στους 121 °C. Πολύ αποδοτική διεργασία, ωστόσο εγκυμονεί ο κίνδυνος διαλυτοποίησης πολυσακχαριτών και φαινολικών ενώσεων.²²
- Λυοφιλοποίηση (freeze drying). Η απόδοση της μεθόδου είναι πολύ υψηλή και τα συστατικά της πρώτης ύλης παραμένουν αναλλοίωτα. Ωστόσο χαρακτηρίζεται οικονομικά ασύμφορη.⁶

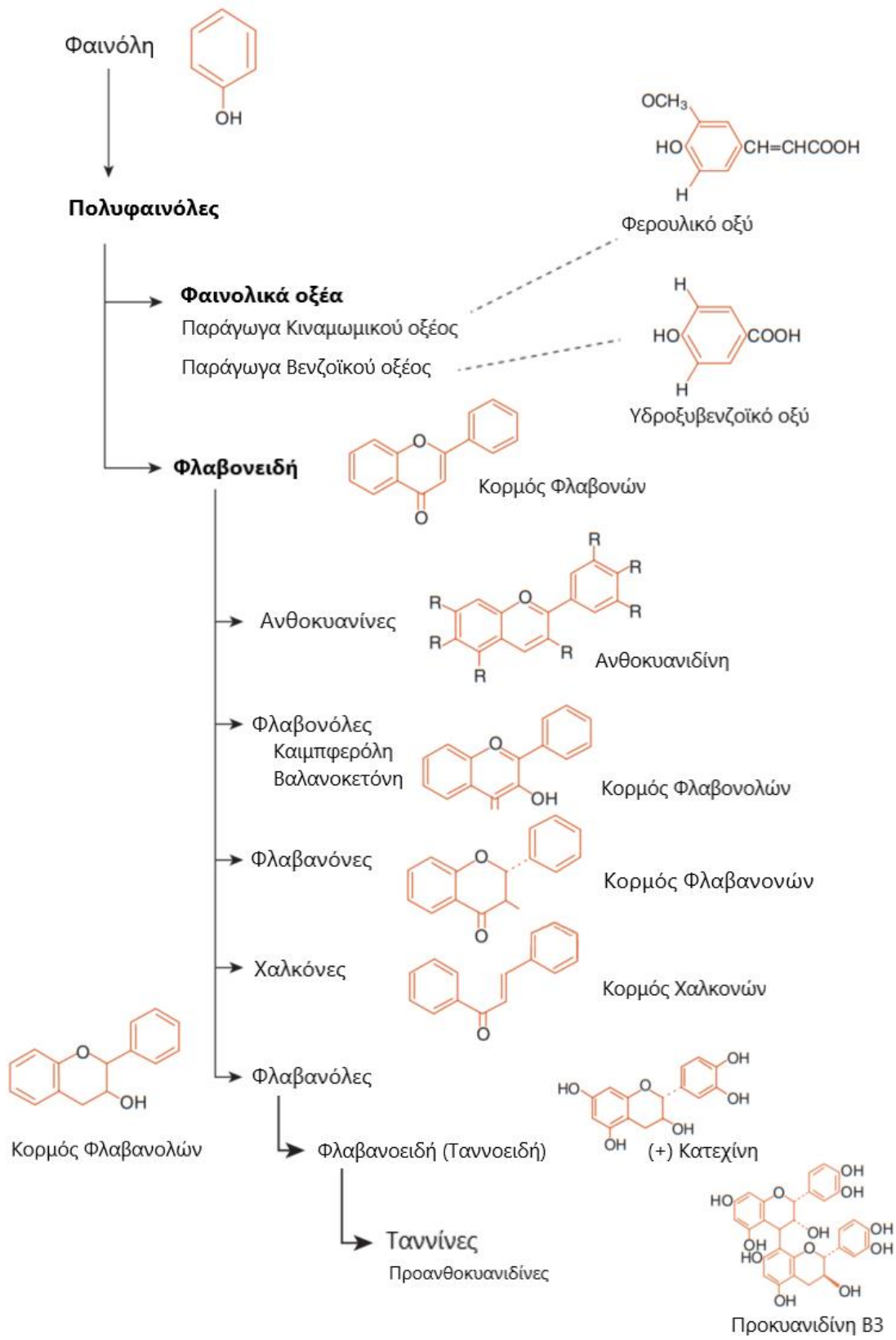
Γενικότερα, για ένα προϊόν που προορίζεται για μακρά αποθήκευση, συνίσταται η υγρασία να μην ξεπερνάει το 10%. Οι ζυθοβιομηχανίες προκειμένου να αποφύγουν όσο γίνεται τα υψηλά ενεργειακά κόστη, ακολουθούν μια τεχνική δύο σταδίων, όπου αρχικά η υγρασία μειώνεται στο 65% ή χαμηλότερα μέσω άσκησης

πίεσης και στη συνέχεια με χρήση ξηραντήρων περιστρεφόμενου τυμπάνου, η υγρασία φτάνει στα επιθυμητά επίπεδα (<10%).

Επιπλέον έχει εξετασθεί η μείωση της υγρασίας μέσω μεμβρανών φιλτραρίσματος υψηλής πίεσης. Η μελέτη της βρίσκεται σε πιλοτικό στάδιο²³ και σύμφωνα με αυτήν τη ελπιδοφόρα για τη βιομηχανία τροφίμων σύνθετη μέθοδο, επιτυγχάνεται υψηλός βαθμός απόδοσης και περιορίζεται μικροβιακή ανάπτυξη για τουλάχιστον 6 μήνες.

1.3.3 Φαινολικές Ενώσεις των BSG

Με τον όρο φαινόλη, γίνεται αναφορά στις ενώσεις που αποτελούνται από αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Από τον συνδυασμό των φαινολών προκύπτουν οι πολυφαινόλες, δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται ευρέως σε φυτικές πρώτες ύλες, όπως τα λαχανικά και τα φρούτα, καθώς και σε διάφορους μικροοργανισμούς, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή ύπαρξη σημαντικών ιδιοτήτων για την υγεία του ανθρώπου.²⁴ Μελέτες επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό, καθώς πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει τις αντιοξειδωτικές^{25,26}, τις αντικαρκινικές^{27,28}, τις αντιφλεγμονώδεις^{29,30}, και τις αντιγηραντικές/αντι-οστεοπορωτικές^{31,32} ιδιότητες των φαινολών. Επιπρόσθετα, πολυφαινόλες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη γεύση και το χρώμα των φυτών από τα οποία προέρχονται. Αυτό συμβαίνει και στα τελικά καταναλωτικά προϊόντα που εμπεριέχονται, όπως η μπίρα, όπου τόσο οι πολυφαινόλες στο κριθάρι όσο και στον λυκίσκο επηρεάζουν έντονα το χρώμα και τη γεύση της, αλλά παράλληλα συμβάλλουν και στη σταθεροποίηση του προϊόντος, χάρη στην αντιοξειδωτική τους δράση και τη δυνατότητα να συνδέονται με πρωτεΐνες (κολλοειδή συστήματα και σταθεροποιητές). Η χημεία των φαινολικών είναι αρκετά σύνθετη λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού μεμονωμένων συστατικών που αποτελούν μέλη αυτής της ομάδας ενώσεων. Ο όρος τανίνη και τα παράγωγα του: ταννόλες, ταννοειδή, συχνά χρησιμοποιούνται με συνώνυμο τρόπο με τις πολυφαινόλες. Όμως δεν έχουν όλες οι πολυφαινόλες ταννικές ιδιότητες. Πρακτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να καταταχθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, οι οποίες μαζί και με άλλες σημαντικές για τη ζυθοποιία υποομάδες παρουσιάζονται παρακάτω (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Οι κυριότερες ομάδες φαινολικών ενώσεων που συναντώνται στη ζυθοποιία.³

1.3.3.1 Φαινολικά οξέα

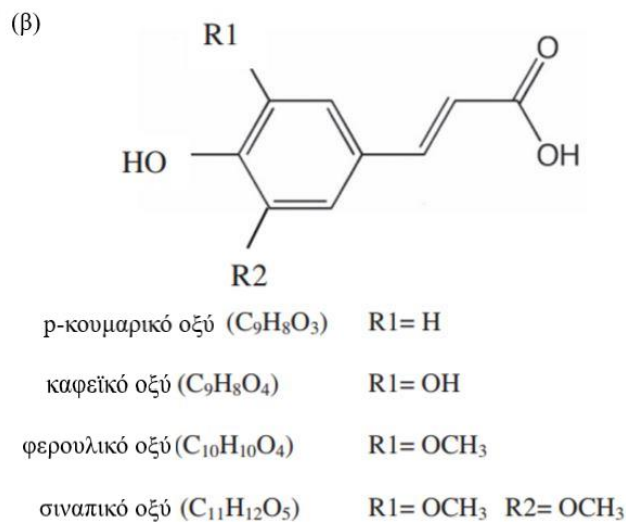
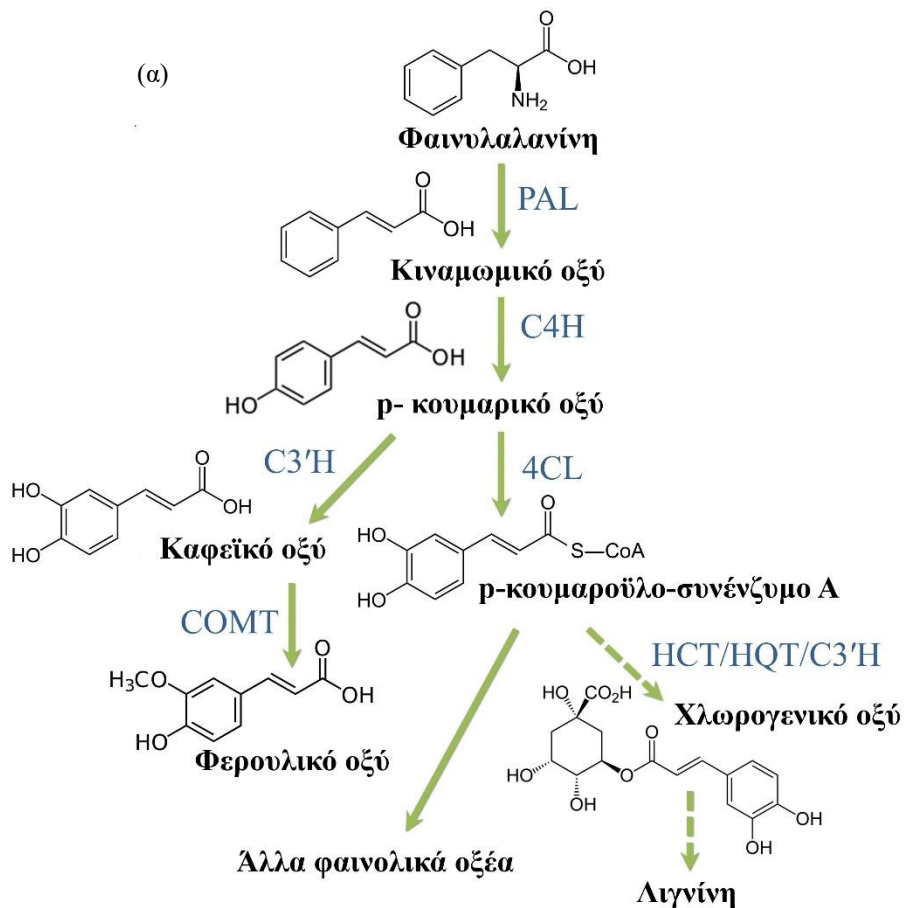
Τα φαινολικά οξέα είναι ενδιάμεσα προϊόντα του φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού που οδηγεί στη σύνθεση της λιγνίνης (Σχήμα 6.α).^{33,34} Μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υποκατηγορίες : τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (ΥΒΟ) και τα υδροξυκιναμικά (ΥΚΟ). Το περιεχόμενο των ΥΒΟ είναι γενικά σημαντικά μικρότερο (Πίνακες 4,5) στα BSG, ωστόσο οξέα όπως το συριγγικό, το p-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλινικό και το πρωτοκατεχικό συναντώνται σε μη αμελητέες ποσότητες. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3 το φερουλικό και το p-κουμαρικό είναι τα κυριότερα ΥΚΟ των BSG. Εκτενής μελέτη για την παρουσία φαινολικών σε ποικιλίες κριθαριών που προορίζονται για τη ζυθοβιομηχανία έδειξε ότι το 53% των μονομερικών φαινολικών οξέων που παρίστανται στα BSG, είναι φερουλικά οξέα.³⁵ Ακολούθως, τα επόμενα σε αφθονία οξέα είναι το σιναπικό και το καφεϊκό. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 6.β,³⁶ τα ΥΚΟ χαρακτηρίζονται από μια κοινή δομή «C6-C3», δηλαδή έναν αρωματικό δακτύλιο και μια αλυσίδα 3 ατόμων άνθρακα. Από εκεί και πέρα διαφοροποιούνται μέσω των υποκαταστατών του αρωματικού δακτυλίου.

Πίνακας 4: Περιεχόμενο ΥΒΟ στα BSG.³³

ΥΒΟ (mg/ 100g ξηρών BSG)	Βιβλιογραφικές αναφορές	
	Szwajgier et al ¹⁴	Athanasios et al ¹³
Συριγγικό	6.5 ± 0.1	6.84 ± 0.1
p-ΥΒΟ	1.2 ± 0.6	1.15 ± 0.02
Βανιλινικό	-	3.49 ± 0.01
Πρωτοκατεχικό	0.5 ± 0.1	-

Πίνακας 5: Περιεχόμενο ΥΚΟ στα BSG.³³

ΥΚΟ (mg/ 100g ξηρών BSG)	Βιβλιογραφικές αναφορές	
	Szwajgier et al ¹⁴	Athanasios et al ¹³
Φερουλικό	336.3 ± 16.0	271.6 ± 20.2
p-κουμαρικό	64.4 ± 4.6	137.3 ± 11.5
Σιναπικό	42.0 ± 1.1	-
Καφεϊκό	9.9 ± 0.7	-



Σχήμα 6: (α) Φαινυλοπροπανοειδές βιοσυνθετικό μονοπάτι ΥΚΟ. 4CL: 4-κουμαρικό-συνένζυμο A-λιγάση, C3'H: p-κουμαροϋλο-εστερ-3-υδροξυλάση, C4H: 4-υδροξυλάση κινναμωμικού οξέος, CHS: συνθάση της χαλκόνης; COMT: καφεϊκ-O-μεθυλοτρανσφεράση; HCT, υδροξυκινναμοϋλο-τρανσφεράση, HQT, υδροξυκινναμοϋλο-συνένζυμο A; PAL: λύση αμμωνίας φαινυλαλανίνης. (β) Γενικός κορμός C6-C3 ΥΚΟ και οι μοριακοί τύποι δημοφιλών ΥΚΟ συναρτήσεως των υποκαταστατών τους.

1.3.3.2 Φλαβονοειδή

Η ομάδα των φλαβονοειδών περιέχει πάνω από 8000 διαφορετικές ταυτοποιημένες ενώσεις. Ως κοινό χαρακτηριστικό διαθέτουν έναν ανθρακικό σκελετό που αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος με τη σειρά του είναι συνδεδεμένος στη μία πλευρά με έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο που φέρει ένα άτομο οξυγόνου αντί για άνθρακα δίπλα στην κοινή πλευρά των δακτυλίων. Τέλος οι δύο δακτύλιοι συνδέονται και με έναν άλλο αρωματικό δακτύλιο. Αυτό που προκαλεί τη διαφοροποίηση μεταξύ των ενώσεων είναι οι υποκαταστάτες που μπορούν να συνδεθούν σε οποιοδήποτε τμήμα της παραπάνω δομής, προσφέροντας ποικιλομορφία.³⁷ Στα φλαβονοειδή διακρίνονται αρκετές σημαντικές υποκατηγορίες, όπως οι ανθοκυανίνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβονόνες και οι χαλκόνες.³⁷ Στη βύνη και άρα ενδεχομένως στα BSG, είναι πιθανότερη η εύρεση φλαβανολών ή πιο ορθά φλαβανο-τρι-ολών, δηλαδή μονομερικές πολυφαινόλες που περιέχουν τον σκελετό: 2 φαινυλ-3,4 υδροξυ-2H- χρωμενο-3-ολη. Στην μπίρα, οι πιο σημαντικές σε ποσότητα και ουσία φλαβονόλες είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη.³

1.3.3.3 Βιοδραστικότητα των BSG

Το γεγονός ότι οι φαινολικές ενώσεις του κόκκου του κριθαριού περιέχονται ως επί το πλείστον στον φλοιό του και τα υδροξυκινναμικά οξέα συσσωρεύονται στα κυτταρικά τοιχώματα, συνιστά τα BSG μια δυνητικά πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Άλλωστε ως λιγνοκυταρρινούχο υλικό, με τη λιγνίνη - ένα πολυφαινολικό πολυμερές - να καταλαμβάνει το 10-28% του ξηρού βάρους των BSG, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις αναμένεται υψηλή. Στη μελέτη EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) αναφέρεται ότι η μπίρα είναι η κυριότερη πηγή πρόσληψης υδροξυβενζοϊκών οξέων στην ανθρώπινη διατροφή και παράλληλα πλούσια πηγή πολλών φαινολικών ενώσεων.¹⁷ Αυτά τα συστατικά, τα οποία θεωρούνται η δημοφιλέστερη πηγή αντιοξειδωτικών στα δημητριακά, υπάρχουν τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την αξία της εκχύλισης ως διεργασία για την παραλαβή τους. Η πλειοψηφία των ελεύθερων φαινολικών στο κριθάρι είναι φλαβονόλες, ενώ τα δεσμευμένα φαινολικά είναι κυρίως φαινολικά οξέα.

1.3.3.4 Πιθανές Εφαρμογές και Αξιοποίηση των BSG

Η χημική σύσταση των BSG, σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες - καθ' όλη τη διάρκεια του έτους - μεγάλες ποσότητες και το χαμηλό κόστος εγείρουν το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση τους σε εφαρμογές και διεργασίες προστιθέμενης αξίας (Σχήμα 7).^{10,38}



Σχήμα 7: Τομείς αξιοποίησης παραπροϊόντων βιομάζας, όπως τα BSG, ταξινομημένοι ως προς την εκτιμώμενη προστιθέμενη αξία σε μορφή πυραμίδας.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ποικίλες πιθανές εφαρμογές των BSG, υποδεικνύοντας τόσο τις δυνατότητές τους όσο και την ανάγκη για αξιοποίηση και επαναχρησιμοποίησή τους. Ενδεικτικά παραδείγματα χρήσης των BSG αναφέρονται στη συνέχεια:

- Στην κτηνοτροφία ως **ζωοτροφή**: Η χρήση των BSG ως ζωοτροφές αποτελεί την κύρια υπάρχουσα εφαρμογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε υγρή μορφή και ειδικά με την προσθήκη μιας -φθίνης- πηγής αζώτου (π.χ. ουρία), τα BSG μπορούν να παρέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την ολοκληρωμένη διατροφή ενός ζώου. Μελέτες έχουν δείξει πως, η συμπερίληψη των BSG στην τροφή των αγελάδων, οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή γάλακτος.³⁹
- Στη **διατροφή του ανθρώπου** προσφέροντας αναρίθμητα οφέλη στην υγεία. Πιο συγκεκριμένα βοηθάει στην καλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος, μειώνει τις

πιθανότητες για εμφάνιση πέτρας στη χολή (χολόλιθος), μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και αυτά τις γλυκόζης στο αίμα μετά από ένα γεύμα. Μετατρέποντας τα BSG σε άλευρο, μπορούν να εισαχθούν σε οποιαδήποτε παρασκευή αρτοποιίας (ψωμί, μπισκότα, κέικ, κ.α.), αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη και φυτικές ίνες, μειώνοντας παράλληλα το θερμιδικό περιεχόμενο. Πέρα από αρτοποιήματα, τα BSG μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο του λίπους, στην παραγωγή αλλαντικών με χαμηλά λιπαρά. Παρόλη τη διατροφική αξία που προσδίδουν τα BSG στα τρόφιμα, είναι αναγκαίο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα με στόχο τη βελτίωση της εμφάνισης, της οσμής, της υφής και της γεύσης των τελικών προϊόντων και κατ' επέκταση την αποδοχή των καταναλωτών. Με τα υπάρχοντα δεδομένα και προκειμένου να μην προκαλούνται έντονες αλλαγές στις παραπάνω παραμέτρους, συνιστάται η προσθήκη μικρών ποσοτήτων (μέχρι 100 γρ. / κιλό)³⁹

- Για την καταπολέμηση της ενεργειακής κρίσης, είτε μέσω **παραγωγής ενέργειας** από αντιδράσεις πυρόλυσης και καύσης, είτε μέσω παραγωγής **βιοαερίου** ή **αιθανόλης**. Τα BSG παρουσιάζουν αξιόλογη κατώτερη και ανώτερη θερμογόνο δύναμη (18,64 και 20,14 MJ/kg αντίστοιχα). Για να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες καύσης το περιεχόμενο τους σε υγρασία πρέπει να είναι μικρότερο από 550 γρ/κιλό, επομένως πρέπει να ξηραθούν. Μια ακόμη ενδιαφέρουσα εφαρμογή θα μπορούσε να ήταν η παραγωγή κάρβουνου, μέσω ξήρανσης, συμπίεσης και ανθρακοποίησης σε ατμόσφαιρα χαμηλού οξυγόνου. Παραγωγή βιοαερίου με απόδοση 3476 cm³ / 100 g BSG/ 15 μέρες μπορεί να επιτευχθεί μέσω αναερόβιας χώνευσης. Όσον αφορά την αιθανόλη, οι ανάγκες για παραγωγή της ως εναλλακτικό καύσιμο έχουν αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Συνεπώς τα BSG μπορούν να ενισχύσουν αυτήν την προσπάθεια ή να αντικαταστήσουν μερικώς το καλαμπόκι, το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον ως πρώτη ύλη για την παραγωγή της, καθώς κρίνεται πιο απαραίτητο ως τρόφιμο.³⁹
- Σε **χημικές διεργασίες**, με σκοπό είτε την ανάκτηση (μέσω εκχύλισης με διαλύτες) είτε την παραγωγή συστατικών υψηλού ενδιαφέροντος. Για παράδειγμα συστατικά όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, η λιγνίνη, υδροξυκινναμικά οξέα και αντιοξειδωτικά φαινολικά συστατικά μπορούν να ανακτηθούν από τα BSG. Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες και ελπιδοφόρες προοπτικές είναι η χρήση των BSG ως απορροφητικό μέσο για την απομάκρυνση «ακαθαρσιών» από αέρια (waste gases) ή την απορρόφηση βαφών από υγρά απόβλητα. Ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για τη διαμόρφωση πολτού που παράγει το χαρτί.³⁹

- Σε **διεργασίες βιοτεχνολογίας**, καθώς η σύσταση τους δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την κατάστροψη διεργασιών ζύμωσης ή με ένζυμα. Το γεγονός ότι τα BSG είναι πολύ ασταθή προκαλεί ταχείες και ποικίλες μικροβιακές δράσεις και έτσι μπορούν να αξιοποιηθούν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και για την παραγωγή ενζύμων. Επιπρόσθετα, το ενδεχόμενο χρήσης των BSG ως μια καθαρά πηγή άνθρακα και θρεπτικών συστατικών μπορεί να αποδώσει σημαντικά για τη βιομηχανία μεταβολικά προϊόντα, μέσω αντιδράσεων ζύμωσης.^{39,40}
- Σε προηγμένες **πράσινες διεργασίες**:
 - Παραγωγή βιοπολυμερών, όπως πολύ(υδροξυ αλκανοϊκών) εστέρων (PHAs), χρησιμοποιώντας τα BSG ως υπόστρωμα. Πρόκειται για υλικά που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν δυνητικά τα πλαστικά που παράγονται από ορυκτά καύσιμα.⁴¹
 - Παραγωγή βιοφίλμ, ιδανικά για συσκευασίες τροφίμων. Η ενσωμάτωση χιτοζάνης στις πρωτεΐνες των BSG, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μικροφίλμ με αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η προσθήκη πλαστικοποιητή (π.χ. σορβιτόλη, , γλυκερόλη) είναι απαραίτητη για να προσδώσει στο φιλμ ελαστικότητα και ανθεκτικότητα.⁴²
 - Παραγωγή εκχυλισμάτων προστιθέμενης αξίας, πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, μέσω χρήσης φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES), τα οποία μπορούν να εισαχθούν σε φαρμακοτεχνικές μορφές και σκευάσματα κοσμητολογίας.

1.4 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)

Τα πολλαπλά περιβαλλοντικά ζητήματα που έχουν προκύψει τις τελευταίες δεκαετίες από την αλματώδη και αλόγιστη βιομηχανική ανάπτυξη, οδήγησαν στην ανάγκη υιοθέτησης μιας νέας προσέγγισης στη χημική έρευνα και στην ανάπτυξη χημικών διεργασιών, στα πλαίσια της βιωσιμότητας και της αειφορίας. Η νέα αυτή «φιλοσοφία» ακούει στο όνομα *Πράσινη Χημεία* και πρόκειται για ένα πολύ-επιστημονικό πεδίο που συνδυάζει τη χημεία, τη χημική μηχανική, τη βιολογία, τη φυσική, τα οικονομικά και τα νομικά. Από τον συνδυασμό των παραπάνω επιστημών, έχουν προκύψει 12 *θεμελιώδεις αρχές* (Σχήμα 8) που συγκεντρωτικά στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση: (i) της επικινδυνότητας και του κόστους των διεργασιών, (ii) της κατανάλωσης ενέργειας, (iii) της παραγωγής αποβλήτων και της χρήσης πρώτων υλών, καθώς και την προμήθειά τους από βιώσιμες πηγές.⁴³



Σχήμα 8: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας

Εστιάζοντας στην 5^η αρχή της Πράσινης Χημείας, η οποία αναφέρεται μεταξύ άλλων και στη διαχείριση διαλυτών, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα για περιορισμό των συμβατικών διαλυτών και καθιέρωση ασφαλέστερων πρακτικών.⁴⁴ Οι οργανικοί διαλύτες συγκαταλέγονται στα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στη βιομηχανία και πιο συγκεκριμένα η ετήσια παγκόσμια κατανάλωσή τους υπολογίζεται στους 14 Gt. Οι συνηθέστεροι περιέχουν πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs), για παράδειγμα βενζόλιο, χλωροφόρμιο, ή οργανοαλογονωμένες ενώσεις, όπως οι χλωρο-φθοράνθρακες (CFCs), οι υδροχλωροφθοράνθρακες (HCFCs) και το υπερχλωρο-αιθυλένιο (PERC). Οι παραπάνω ουσίες εμφανίζουν άριστη διαλυτική ικανότητα αλλά θεωρούνται εξαιρετικά τοξικές και προκαλούν πληθώρα προβλημάτων στην υγεία (αναπνευστικό σύστημα, συκώτι, νεφρά, καρκινογενέσεις, κ.α.) και στο περιβάλλον (καταστροφή της στοιβάδας του όζοντος, ρύπανση υδάτων, κ.α.). Επιπλέον, προέρχονται συνήθως από μη-ανανεώσιμες πηγές, δημιουργούν διαποτισμένα υποπροϊόντα που μπορεί να είναι τοξικά ή διαβρωτικά και παρουσιάζουν υψηλό οικονομικό και ενεργειακό κόστος κατά την ανακύκλωσή τους.⁴⁵

Είναι σαφές ότι, η εφαρμογή ενός συστήματος απουσία διαλύτη προτιμάται, όποτε είναι εφικτό.⁴⁴ Επειδή όμως, με τα υπάρχοντα δεδομένα, η τακτική αυτή σπάνια εξυπηρετεί τους βιομηχανικούς σκοπούς, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς

εναλλακτικούς διαλύτες. Αρχικά, ως εναλλακτικοί πράσινοι διαλύτες δοκιμάστηκαν το νερό και τα υπερκρίσιμα ρευστά, τα οποία χρησιμοποιούνται έως και σήμερα, αλλά σε περιορισμένο εύρος εφαρμογών. Επιπλέον, τα ιοντικά υγρά (ΙΥ) αποτέλεσαν την πρώτη αξιόπιστη λύση που θα μπορούσε να αντικαταστήσει τους κλασικούς διαλύτες σε μεγάλο βαθμό.⁴⁶

Ως Ιοντικά Υγρά (ΙΥ), έχουν οριστεί οι ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από ιόντα και εμφανίζουν σημείο τήξης κάτω των 100 °C.⁴⁷ Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως η θερμοκρασία των 100 °C δεν αποτελεί περιορισμό στον ορισμό των ΙΥ.⁴⁸ Το χαμηλό σημείο τήξης τους επιτρέπει να είναι κατά βάση σε υγρή κατάσταση ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή και ακόμα χαμηλότερες, χάρη στη μειωμένη ενέργεια πλέγματος που εξασφαλίζουν. Η χαμηλή ενέργεια πλέγματος οφείλεται κυρίως στη δομή και το μέγεθος των ιόντων που τα απαρτίζουν. Συνήθως συναντώνται οργανικά κατιόντα, συχνά μεγάλου μεγέθους με μικρή συμμετρία, και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα. Βιβλιογραφικές μελέτες έχουν αναφερθεί στις σημαντικές ιδιότητες των ΙΥ κάποιες από τις οποίες είναι η υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα, η αμελητέα τάση ατμών, η χαμηλή ευφλεκτότητα, η εξαιρετική διαλυτική ικανότητα, κ.α. Ακόμα, λόγω των πολυάριθμων πιθανών συνδυασμών ανιόντων και κατιόντων, οι ιδιότητες των ΙΥ ποικίλουν · έτσι, με την κατάλληλη επιλογή των ιόντων μπορούν να σχεδιαστούν στοχευμένα ΙΥ με επιθυμητές ιδιότητες για συγκεκριμένες εφαρμογές.

Χάρη σε αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε διάφορες εφαρμογές: νανοτεχνολογίας, διαλυτοποίησης και μετατροπής βιομάζας, δέσμευσης CO₂, παγίδευσης ιωδίου, αλλά και ως ηλεκτρολύτες σε μπαταρίες και κυψέλες καυσίμου.⁴⁹

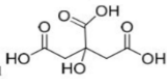
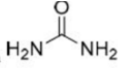
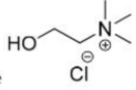
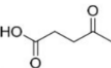
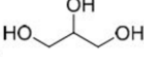
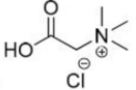
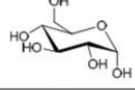
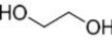
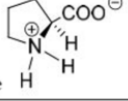
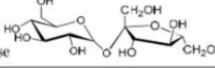
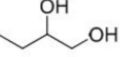
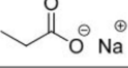
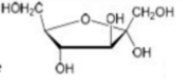
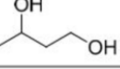
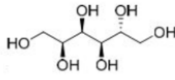
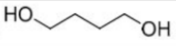
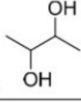
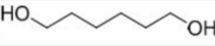
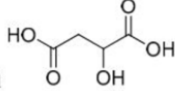
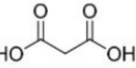
Παρ' όλη την εξέλιξη και τη βελτίωση χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης κατηγορίας διαλυτών τις τελευταίες δεκαετίες, (3^{ης} Γενιάς ΙΥ, Βιο-ΙΥ), μερικά μειονεκτήματα ΙΥ παλαιότερης γενιάς (κυρίως 1^{ης}), όπως το υψηλό κόστος, καθώς και ότι μερικές φορές δεν ικανοποιούν τις πράσινες αρχές, απορροφούν υγρασία από την ατμόσφαιρα και εξατμίζονται σε ήπιες σχετικά συνθήκες, οδήγησαν στην αναζήτηση ακόμα καλύτερων λύσεων.⁵⁰

Έτσι, λειτούργησαν ως πρόδρομος για την ανακάλυψη μιας πολλά υποσχόμενης κατηγορίας πράσινων διαλυτών, αυτή των βαθέως ευτηκτικών

διαλυτών (*Deep Eutectic Solvents, DES*). Ο παράγοντας «κόστος» ήταν αυτός που αρχικά έδωσε το κίνητρο για την ενασχόληση με τα DES, αφού εκτιμάται ότι κοστίζουν μόλις το $\frac{1}{5}$ συγκριτικά με τα ΙΥ και άρα οι πιθανότητες για ανακλιμάκωση είναι αυτομάτως μεγαλύτερες. ⁴⁶

Στους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, ο ορισμός των ΙΥ διευρύνεται: εδώ το μίγμα μπορεί να αποτελείται από δύο ή παραπάνω καθαρά συστατικά, δεκτών και δωτών δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor: HBA (Hydrogen Bond Donor: HBD). (Πίνακας 6)

Πίνακας 6: Συνήθη συστατικά των DESs που προορίζονται για εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων.

Δότες Δεσμού Υδρογόνου (HBD)		Δέκτες Δεσμού Υδρογόνου (HBA)	
Citric acid 	Urea 	Choline Chloride 	
Levulinic Acid 	Glycerol 	Betaine Chloride 	
Glucose 	Ethylene Glycol 	L-Proline 	
Sucrose 	1,2-Butanediol 	Sodium Propionate 	
Fructose 	1,3-Butanediol 		
Sorbitol 	1,4-Butanediol 		
	2,3-Butanediol 		
	1,6-Hexanediol 		
	Malic Acid 		
	Malonic Acid 		

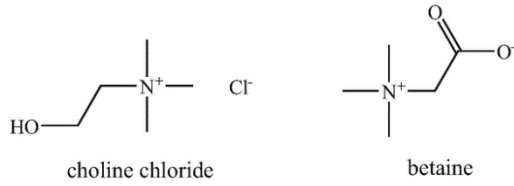
Οι θερμοκρασίες τήξεως των μιγμάτων είναι «βαθέως» χαμηλότερες από ότι θεωρητικά θα αναμενόταν σύμφωνα με τις αρχές ιδανικής ανάμιξης ρευστών. Αυτό

συμβαίνει χάρη στην ισχυρή αλληλεπίδραση που σχηματίζεται μεταξύ των συστατικών, μέσω των δεσμών υδρογόνου. Οι DES είναι υγρά σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών – συμπεριλαμβανομένης και της θερμοκρασίας περιβάλλοντος - γεγονός που ευνοεί τη χρήση τους σε διεργασίες εκχύλισης. Είναι διαλύτες εύχρηστοι, φθινοί, και ως επί το πλείστον βιοδιασπώμενοι, ενώ ταυτόχρονα δεν είναι πτητικοί ή αναφλέξιμοι και εμφανίζουν χαμηλή (χαμηλότερη από τα ΙΥ) ή μηδενική τοξικότητα. Ακόμα, σε σύγκριση με τα ΙΥ, οι DES παρασκευάζονται εύκολα - με πιο συνήθη τρόπο την απλή ανάμειξη υπό ήπια θέρμανση και ανάδευση - χωρίς να παράγουν παραπροϊόντα ή να απαιτούν κάποιο στάδιο καθαρισμού δεδομένα που κάνουν τη σύνθεση να χαρακτηρίζεται από 100% οικονομία ατόμου.⁵¹

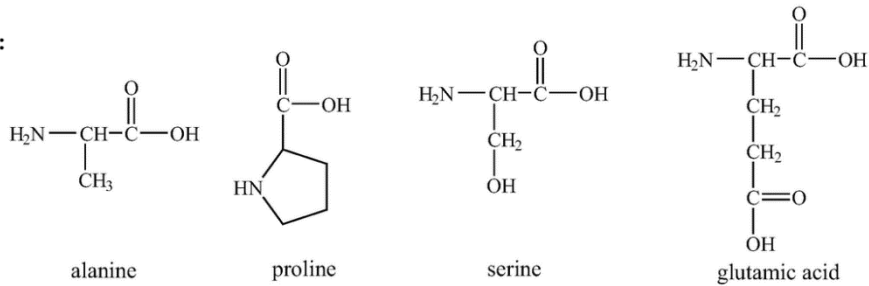
1.4.1 Φυσικοί Βαθώς Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES)

Αντικείμενο ιδιαίτερης μνείας, χρήζει μία υποκατηγορία των DES, οι Φυσικοί Βαθώς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents: NaDES), που όπως προΐδεάζει και το όνομά τους αποτελούνται από φυσικά συστατικά. Οι NaDES ανακαλύφθηκαν σε μία προσπάθεια αφενός να ερμηνευτεί η υψηλή συγκέντρωση ορισμένων συστατικών, και αφετέρου να εξηγηθεί η ύπαρξη διαλυμένων εσωκυτταρικών ενώσεων, τα οποία υπό «φυσιολογικές» συνθήκες θα έπρεπε να είναι αδιάλυτα στις υγρές φάσεις του κυττάρου. Έτσι, αποδείχθηκε ότι σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, τα κύτταρα σχηματίζουν με φυσικό τρόπο DES, από συστατικά που τείνουν να συσσωρεύονται στα φυτά, όπως σάκχαρα, άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου, αμινοξέα πολυόλες και οργανικά οξέα, προκειμένου να διατηρήσουν την ακεραιότητα λειτουργιών και συστατικών ζωτικής σημασίας. Παράλληλα, αιτιολογήθηκε και η βιοσύνθεση, η αποθήκευση και η μεταφορά μακρομορίων που είναι πρακτικά αδιάλυτα στις δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσεις των κυττάρων, την υδατική και τη λιπιδική, καθώς η παρουσία των NaDES λειτουργεί ως μια τρίτη υγρή φάση που επιτρέπει την πραγματοποίηση των παραπάνω κυτταρικών δραστηριοτήτων. Σύμφωνα, λοιπόν, με τις γνώσεις που έχουν αντληθεί από τη φύση, η εργαστηριακή παρασκευή NaDES είναι εφικτή, μέσω χρήσης των κατάλληλων πρωτογενών μεταβολιτών φυσικών προϊόντων (άλατα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, αμίνες, σάκχαρα κ.α.), στην κατάλληλη αναλογία, ώστε να προκύψει ομογενές μίγμα. Τυπικά συστατικά των NaDES που δρουν ως δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου παρουσιάζονται στο Σχήμα 9, ανά κατηγορία:

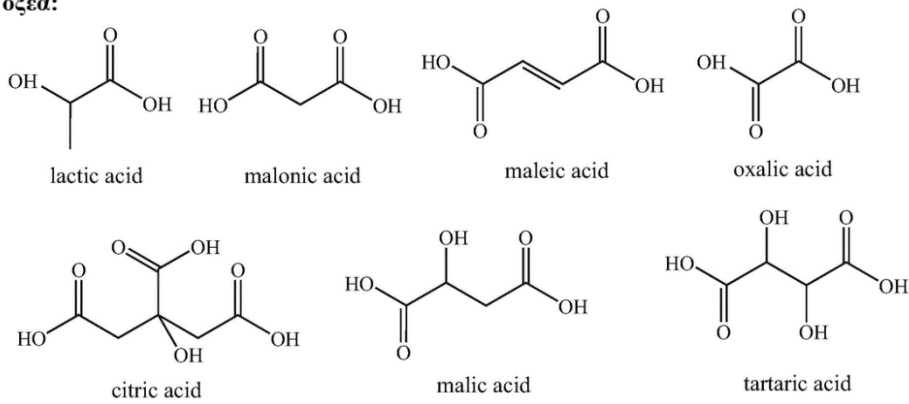
Άλατα:



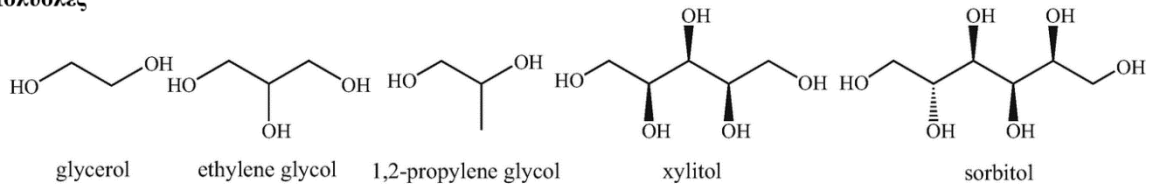
Αμινοξέα:



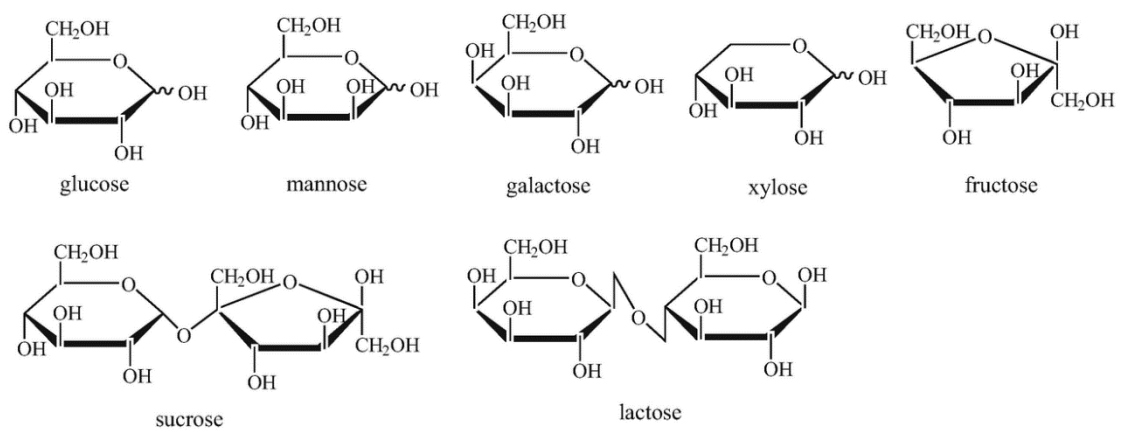
Οργανικά οξέα:



Πολυόλες



Σάκχαρα

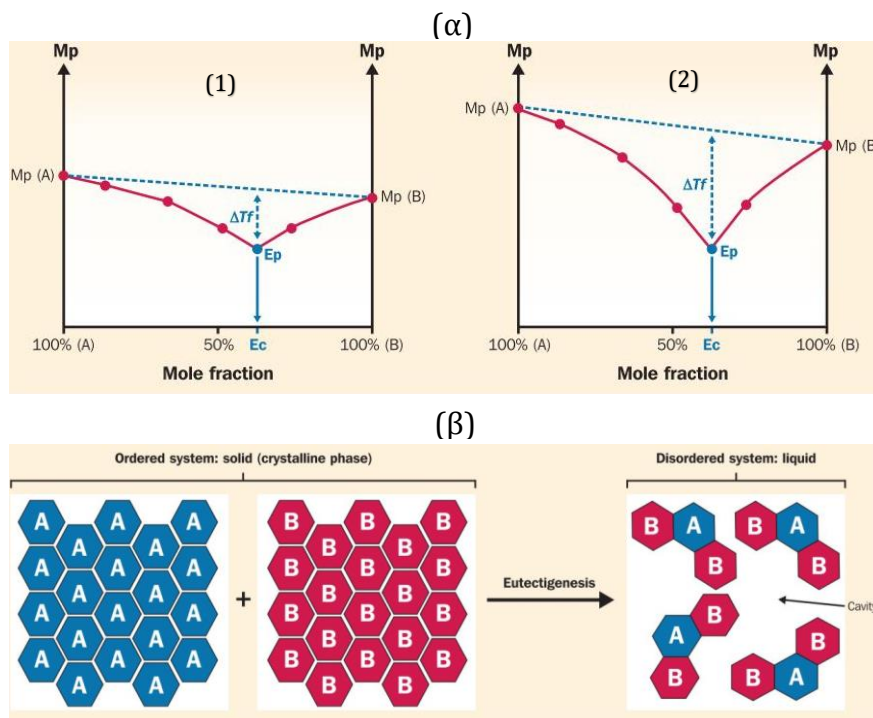


Σχήμα 9: Ενδεικτικά φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται συνθέστερα για την παρασκευή NaDES.⁵⁰

1.4.1.1 Ιδιότητες των NaDES

Όπως προαναφέρθηκε, οι (Na)DES, προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών αλλά και πολλών «πράσινων» διαλυτών. Στην ίδια λογική με τους DES, αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι είναι συστήματα πολλών συστατικών. Συνεπώς η δομή και ο χαρακτήρας τους μπορούν εύκολα να σχεδιαστούν σύμφωνα τις ανάγκες της διεργασίας, παρέχοντας - έως έναν βαθμό - ευελιξία στην επιρροή των ιδιοτήτων του NaDES. Κατ' επέκταση, το είδος του HBD και του HBA, καθώς και η μοριακή τους αναλογία επηρεάζουν σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του DES και γενικότερα τα χαρακτηριστικά του.⁴⁶

Αναλυτικότερα, η τάση ατμών στους NaDES είναι πολύ χαμηλή και άρα η πτητικότητα τους πρακτικά αμελητέα. Εξ' ορισμού το ίδιο ισχύει και για το σημείο τήξεως των μιγμάτων, με τη θερμοκρασία τήξεως να μπορεί να μειωθεί έως και 200 °C, σε σχέση με αυτές των αρχικών συστατικών (Σχήμα 10.α). Τα παραπάνω, όπως και πολλές από τις ιδιότητες που θα αναλυθούν στη συνέχεια, μπορούν να εξηγηθούν από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων - κυρίως δεσμοί υδρογόνου, αλλά και δυνάμεις Van der Waals - οι οποίες διαταράσσουν το κρυσταλλικό πλέγμα, με αποτέλεσμα η μοριακή διάταξη των NaDES να χαρακτηρίζεται από αυξημένες κοιλότητες (κενός όγκος) και ασύμμετρη κατανομή φορτίου (Σχήμα 10.β).^{52,53}



Σχήμα 10: (α) Ταπείνωση σημείου τήξεως σε ένα βαθέως ευτηκτικό μίγμα σε σύγκριση με ένα ευτηκτικό μίγμα. (β) Απλοποιημένη απεικόνιση του φαινομένου δημιουργίας ευτηκτικού μίγματος σε μοριακό επίπεδο.

Από την άλλη, το ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου, συνδυαστικά και με τις υπόλοιπες διαμοριακές δυνάμεις, περιορίζουν την κινητικότητα των μορίων, γεγονός που συνεπάγεται υψηλό ιξώδες και πυκνότητα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν διαχειριστικές δυσκολίες σε διεργασίες που απαιτούν διάχυση ή ροή. Το ιξώδες των περισσότερων DES σημειώνεται μεγαλύτερο των 100 cP και η πυκνότητα τους μεγαλύτερη από αυτήν του νερού.

Τα εμπόδια αυτά μπορούν να ξεπεραστούν με την προσθήκη νερού ή με την αύξηση της θερμοκρασίας, μιας και τα DES υπακούουν στο μοντέλο Arrhenius. Επισημαίνεται ότι υπερβολική προσθήκη νερού μπορεί να αποδυναμώσει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, που είναι ανεπιθύμητο.^{51,53} Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι τα DES με συστατικά μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας (π.χ. χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη) παρουσιάζουν χαμηλότερο ιξώδες. Το πόρισμα αυτό πρέπει να αξιολογείται πάντα και με την ύπαρξη διάφορων χαρακτηριστικών ομάδων.^{50,54}

Μια ακόμα ιδιότητα που επηρεάζεται σημαντικά από την προσθήκη νερού είναι η πολικότητα. Η πολικότητα είναι κομβικής σημασίας παράμετρος για τους NaDES, καθώς καθορίζει άμεσα τη διαλυτική τους ικανότητα. Αλλάζοντας την αναλογία NaDES:νερού είναι δυνατή η διάλυση διαφορετικών ενώσεων-στόχων. Όσοι NaDES αποτελούνται από οργανικά οξέα φαίνεται να εμφανίζουν την υψηλότερη πολικότητα, σύμφωνα με πειραματική μελέτη. Ακολουθούν οι NaDES με αμινοξέα, ενώ τη χαμηλότερη εμφανίζουν αυτά που περιέχουν σάκχαρα και πολυόλες · με την πολικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις να παρομοιάζεται με αυτή του νερού και της μεθανόλης.⁵⁵

Συνολικά, όσον αφορά τον πράσινο χαρακτήρα των NaDES, πράγματι ικανοποιούν πλήρως πολλές από τις αρχές της Πράσινης Χημείας. Ωστόσο, οι όροι της τοξικότητας και της βιοαποικοδομησιμότητας, δύο παράγοντες πολύ σημαντικοί για τον προσδιορισμό του πράσινου χαρακτηρισμού, συχνά παρερμηνεύονται. Παρόλο που τα συστατικά ενός DES μπορεί να είναι ασφαλή, καθόλου ή ελάχιστα τοξικά, δεν ισχύει κατ' ανάγκη το ίδιο και για τα μίγματα τους. Μόνο για τα συστατικά των NaDES, τα οποία είναι από τη φύση τους μη τοξικά, μπορεί να δοθεί αυτός ο προσδιορισμός με βεβαιότητα. Το γνωστικό επίπεδο σ' αυτό το πεδίο είναι κάπως περιορισμένο μέχρι και σήμερα, γι' αυτό προτείνεται η αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων κάθε φορά

που ένα NaDES πρόκειται να αξιοποιηθεί σε κάποια εφαρμογή. Βέβαια, όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με τέτοιου είδους προβληματισμούς, δημοσιοποιώντας πειραματικές μελέτες από τις οποίες μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα-οδηγοί. Για παράδειγμα η βιοαποικοδομησιμότητα, ανάλογα με τα συστατικά των (Na)DES, φαίνεται να ακολουθεί την εξής σειρά : αμίνες \approx σάκχαρα > αλκοόλες > οξέα.⁵⁶ Από την άλλη η κυτταροτοξικότητα έχει συσχετισθεί με τους παρακάτω παράγοντες:⁵⁰

- **pH** : μειωμένο pH, με κυριότερη αιτία την παρουσία οργανικών οξέων ως HBD, συνεπάγεται αυξημένη τοξικότητα
- **Μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων**: τα κύτταρα φαίνεται να έχουν υψηλή ανοχή σε συστατικά όπως η χολίνη, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη, καθώς είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Γι' αυτό NaDES από αυτά τα συστατικά εμφανίζουν πολύ χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Απεναντίας, το μηλονικό οξύ, που είναι γνωστό ότι αναστέλλει μεταβολικές οδούς (π.χ. κύκλος του κιτρικού οξέος), έχει εντοπισθεί σε NaDES υψηλότερης τοξικότητας. Συνεπώς, για την παραγωγή ασφαλών NaDES πρέπει να χρησιμοποιούνται βιοϋλικά κυτταρικής αναγκαιότητας.
- **Φυσικοχημικές ιδιότητες, ειδικά το ιξώδες**: θεωρείται ότι υψηλό ιξώδες σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα κυττάρων.
- **Αλληλεπίδραση NaDES με την κυτταρική μεμβράνη**: προσομοιώσεις έχουν αποδώσει την κυτταροτοξικότητα ορισμένων NaDES στην ισχυρή τους αλληλεπίδραση με μερικές λειτουργικές ομάδες στην κυτταρική μεμβράνη, που οδηγεί στη διείσδυση και συσσώρευση τους στην κυτταρική επιφάνεια.

1.4.1.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων με χρήση NaDES

Μιας και ο πρωταρχικός ρόλος των NaDES, μέσω και του οποίου ανακαλυφθήκαν, ήταν η διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων συστατικών στα κύτταρα, είναι φυσικό επόμενο να χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα διάλυσης βιοδραστικών μορίων και γι' αυτό θεωρούνται εξαιρετικοί υποψήφιοι ως νέας γενιάς διαλυτές εκχύλισης. Λόγω των ελκυστικών ιδιοτήτων τους και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους επιστημονικούς τομείς. Για παράδειγμα έχει ερευνηθεί η χρήση τους στην επιστήμη των υλικών (σύνθεση και επεξεργασία υλικών, πλαστικοποιητές πολυμερών, σύνθεση νανοσωματιδίων), αλλά

και σε σημαντικούς κλάδους της χημείας (αναλυτική, συνθετική, φαρμακευτική χημεία, ηλεκτροχημεία, βιοχημεία).^{53,57,58}

Εστιάζοντας στο θεματικό πλαίσιο της παρούσας εργασίας, οι NaDES έχουν αξιοποιηθεί επανειλημμένα ως εκχυλιστικά μέσα βιοδραστικών ουσιών που περιέχονται σε φυτικές πρώτες ύλες για ποικίλους λόγους.^{59,60} Αρχικά, η ιδιότητα των NaDES να μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τις ανάγκες της περίπτωσης και τον εκχυλιστικό στόχο, τα φέρνει σε πλεονεκτική θέση έναντι των συμβατικών διαλυτών. Εκτός της μεγάλης διαλυτικής ικανότητας, έρευνες έχουν δείξει πως οι NaDES δρουν και ως μέσα σταθεροποίησης ευπαθών ενώσεων, χάρη στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που δημιουργείται. Για παράδειγμα, ενώ στην προηγούμενη ενότητα παρουσιάστηκε ως ένα μειονέκτημα, το υψηλό ιξώδες που προκύπτει από την ύπαρξη αυτών των δυνάμεων, εδώ συνεισφέρει στη μεγάλη σταθερότητα των - διαλυμένων στο εκχύλισμα - φυσικών ενώσεων (π.χ. φαινολών). Συγκεκριμένα, η κινητικότητα τους μειώνεται λόγω του πλέγματος των δεσμών υδρογόνου και με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από την οξειδωτική διάσπαση.⁶¹ Σύμφωνα με πειραματική μελέτη η παρουσία NaDES [ChCl : lactic acid] κατά την εκχύλιση ανθοκυανινών βελτίωσε τη σταθερότητα του εκχυλίσματος, αναφορικά με την επίδραση του φωτός, του οξυγόνου, της υγρασίας και του pH.⁴⁹

Εφόσον αποτρέπεται η υποβάθμιση του προϊόντος, ο διαχωρισμός των βιοδραστικών ουσιών δεν κρίνεται απαραίτητος, αφού ο διαλύτης λειτουργεί ως αποθηκευτικό μέσο.⁶² Το χαρακτηριστικό αυτό, που δεν το διαθέτουν ούτε τα ΙΥ, θεωρείται σπουδαίο πλεονέκτημα, ειδικά για διεργασίες εκχύλισης που πρόκειται να εφαρμοσθούν σε βιομηχανική κλίμακα. Ιδιαίτερα οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων μπορούν να επωφεληθούν σημαντικά, καθώς τα υψηλής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα και άφοβα στα προϊόντα τους, χάρη στον πράσινο χαρακτήρα και τη βιοσυμβατότητά τους.⁷ Σε περίπτωση που χρειαστεί να απομονωθούν, μπορούν να εφαρμοσθούν τεχνικές διαχωρισμού, όπως η υγρή χρωματογραφία, η οπισθοεκχύλιση με τη χρήση ενός συν-διαλύτη (πχ μεθανόλη), η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και η κρυστάλλωση.^{37,61}

Παραδοσιακά, για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από τα BSG χρησιμοποιούνταν συμβατικές μέθοδοι, όπως υδρόλυση με οξέα (45 °C / 30–60

λεπτά / HCl 1–2 N / 5–10% S/L), αλκαλική εκχύλιση (θερμοκρασία περιβάλλοντος/ 15 λεπτά/ NaOH 1–4 M / 5-10% S/L), εκχύλιση υγρού-υγρού ή υγρού-στερεού, εκχύλιση στερεάς φάσης, εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (μέθοδος Soxhlet / 12 ώρες/ μεθανόλη, αιθανόλη, ή αιθανικός αιθυλεστέρας 70-95%). Εντούτοις, οι παραπάνω τεχνικές παρουσιάζουν ποικίλα μειονεκτήματα, με κυριότερα το κόστος, την αναφλεξιμότητα και την τοξικότητα των διαλυτών. Με τη χρήση των DES, και δη των NaDES, αυτά τα προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν και γι' αυτόν τον λόγο έχουν ανέλθει στο προσκήνιο - τόσο σε ερευνητικό/εργαστηριακό επίπεδο, όσο και σε βιομηχανικό - για την παραγωγή εκχυλισμάτων προστιθέμενης αξίας.⁷ Είναι σαφές ότι η «αξία» της διεργασίας μεγαλώνει ακόμα περισσότερο, όταν απόβλητα της βιομηχανίας χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη. Τέλος, οι NaDES σε συνδυασμό με τεχνικές υψηλής ενέργειας (όπως π.χ. η χρήση υπερηχητικής ή μικροκυματικής ακτινοβολίας), επιφέρουν μείωση του χρόνου εκχύλισης και αύξηση της απόδοσης της διεργασίας.^{63,64}

1.4.1.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους με χρήση NaDES

Η χρήση υπερηχητικής ακτινοβολίας ως πηγή ενέργειάς έχει σημαντική χρησιμότητα στον τομέα της πράσινης χημείας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης, όπως η Soxhlet, η εκχύλιση στερεού υγρού με θερμική αναρροή και η εκχύλιση με διαβροχή ζεστού νερού, είναι συχνά χρονοβόρες, καταναλώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας και παρουσιάζουν χαμηλή αποδοτικότητα, με αποτέλεσμα να μη θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον.

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound Assisted Extraction: UAE) είναι μια μέθοδος απλή και οικονομική, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνει τη συνολική απόδοση της διεργασίας, καταναλώνοντας λιγότερη ενέργεια και πετυχαίνοντας υψηλούς βαθμούς απόδοσης σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή μπορεί να επιδράσει θετικά και στις τελικές φυσικοχημικές ιδιότητες των εκχυλιζόμενων ενώσεων · για παράδειγμα να μειώσει το μοριακό βάρος και να ενισχύσει την αντιοξειδωτική του δράση.⁶⁵ Για τους παραπάνω λόγους έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκχύλιση συστατικών, από φυτικές πρώτες ύλες. Μάλιστα, η τεχνική των υπερήχων έχει τη δική της προϊστορία με την παρασκευή

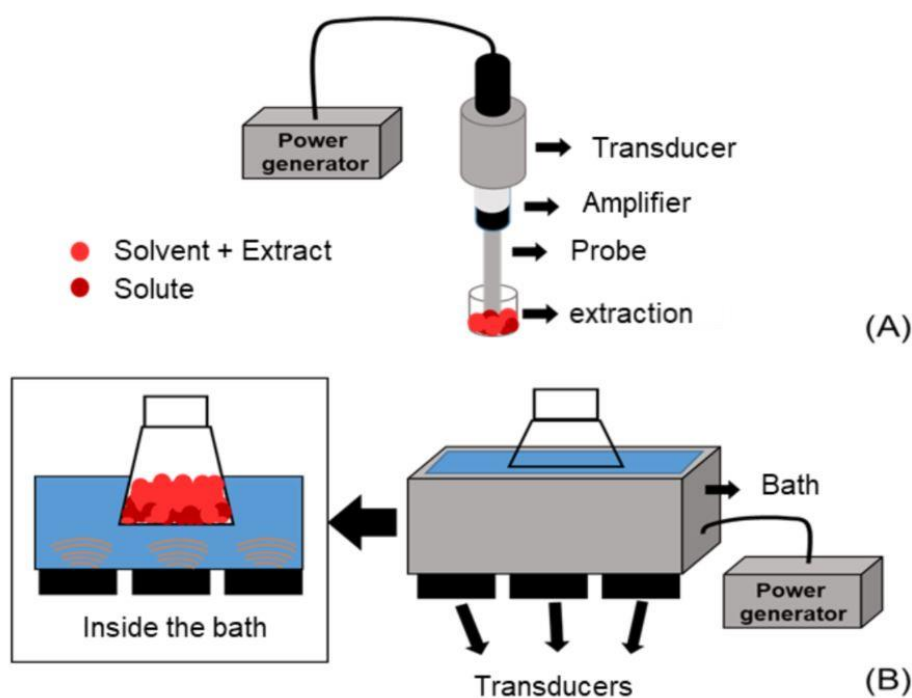
μπίρας, καθώς μια από τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές (1952) που έχουμε σήμερα στη διάθεσή μας για την UAE, ασχολήθηκε με την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση λυκίσκου, συμπεραίνοντας ότι η εφαρμογή αυτής της μεθόδου μπορεί να εξοικονομήσει το 30-40% της ποσότητας του αρωματικού φυτού κατά την παραγωγική διαδικασία.⁶⁶

Ειδικότερα, η τεχνική UAE με χρήση NaDES, αποτελεί συνδυασμό πολύ ελπιδοφόρο, διότι εναρμονίζει τους υψηλούς βαθμούς απόδοσης, που αναζητά η βιομηχανία, με τις αρχές της πράσινης χημείας και τεχνολογίας.⁶⁴ Έτσι, η NaDES-UAE αναμένεται να χρησιμοποιηθεί συχνότερα στο μέλλον στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, μολονότι πρέπει ακόμα να ξεπεραστούν ορισμένα ζητήματα που σχετίζονται με την ανακλιμάκωση (scale-up) της διεργασίας, όπως (i) η απόσβεση των υπερηχητικών κυμάτων για πολύ συμπυκνωμένη διεσπαρμένη φάση, (ii) η ελλιπής μετάδοση των κυμάτων μακριά από το γειτονικό περιβάλλον της γεννήτριας, (iii) η ανάπτυξη μονάδων πολλαπλών συχνοτήτων, μέσω πολλών μορφομετατροπέων (transducers) αλλά και (iv) η βελτίωση των υλικών κατασκευής των τελευταίων, ώστε να αποφεύγεται η διάβρωση.^{67,68}

Ως προς το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου, η UAE βασίζεται στο φαινόμενο της σπηλαιώσης, κατά το οποίο, υψηλής συχνότητας κύματα δημιουργούν κοιλότητες (μικροφυσαλίδες ατμού/κενού), που μετέπειτα διογκώνονται – ακόμα και παραπάνω από δύο φορές το αρχικό τους μέγεθος – και στο τέλος σπάνε απελευθερώνοντας ποσά ενέργειας της τάξης των 10-1000 W/cm².⁶⁹ Η σπηλαιώδης κατάρρευση των φυσαλίδων στο υγρό μέσο, ουσιαστικά αυξάνει έντονα και απότομα την τοπική θερμοκρασία (5000 K) και πίεση (~1000 atm), γεγονός που με τη σειρά του επιφέρει δομικές αλλαγές στην επιφάνεια των στερεών σωματιδίων της πρώτης ύλης, διευκολύνοντας την εκχύλιση των συστατικών της.^{70,71} Το αθροιστικό αποτέλεσμα εκατομμυρίων συνεχών μικροσκοπικών διασπάσεων μικροφυσαλίδων προσφέρει την απαραίτητη ενέργεια για τη διείδυση του διαλύτη στα κυτταρικά τοιχώματα του φυτικού υλικού, επιταχύνοντας έτσι τους ρυθμούς της εκχύλισης, χωρίς τις δαπανηρές καταναλώσεις ενέργειας που απαιτούν οι παραδοσιακές τεχνικές.

Αναφορικά με τη διεξαγωγή της τεχνικής UAE, είναι προφανές ότι απαιτείται η παρουσία υγρού μέσου στο οποίο θα μπορούν να σχηματιστούν οι κοιλότητες, ώστε

στη συνέχεια να μεταδώσουν τη μεγάλη τους ισχύ. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εύκολα με σχετικά απλό εξοπλισμό, το λουτρό υπερήχων, όπου η γεννήτρια δίνει ηλεκτρική ενέργεια και οι μορφομετατροπείς (transducers) τη μετατρέπουν σε μηχανική. Στο λουτρό, η ενέργεια που δέχεται είναι παγιωμένη (fixed) και συνήθως είναι συχνότητας 20 ή 40kHz. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 11.β, σε τέτοιου είδους συστήματα τα κύματα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με το δείγμα. Αντιθέτως, τα συστήματα με probe υπερήχων – μια πιο σύνθετη διάταξη (Σχήμα 11.α)– καθιστούν την ακτινοβολία έως και 100 φορές πιο ισχυρή λόγω των άμεσων αλληλεπιδράσεων υπερήχων – δείγματος και των μηδαμινών απωλειών ενέργειας. Τρωτά σημεία αυτών των συστημάτων πιθανώς μπορεί να θεωρηθούν: (i) ο συνολικός χρόνος αναμονής, αφού δέχονται μέχρι ένα δείγμα τη φορά, (ii) η τοπική ανάπτυξη πολύ υψηλών θερμοκρασιών, ειδικά όταν διαχειρίζονται θερμοευαίσθητες ενώσεις.^{69,72}



Σχήμα 11: Διατάξεις UAE. (Α) σύστημα με probe υπερήχων και (Β) λουτρό υπερήχων.⁷²

1.5 Πειραματικός Σχεδιασμός

Είναι δεδομένο ότι για την επιβίωση και την οικονομική ανάπτυξη μιας εταιρείας του βιομηχανικού κλάδου σε εποχές αυξημένης ανταγωνιστικότητας, όπως οι σημερινές, η παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας με το κατά δύναμιν ελάχιστο κόστος, αποτελεί μονόδρομο. Έτσι τα τμήματα έρευνας και καινοτομίας των βιομηχανιών επιδιώκουν συνεχώς τη μέγιστη εφικτή αποδοτικότητα κατά την ανάπτυξη διεργασιών. Ο στατιστικός έλεγχος αποτελεί έναν παράγοντα που δε γίνεται να απουσιάζει όταν γίνεται λόγος για επίτευξη ποιότητας και για βελτιστοποίηση. Ο στατιστικός έλεγχος ποιότητας μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρία επιμέρους υποσύνολα, ανάλογα με τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας που τους αντιστοιχούν:⁷³

1. Σχεδιασμός και ανάλυση πειραμάτων (Design of Experiments: DoE)
2. Στατιστικός έλεγχος διεργασίας (Statistical Process Control)
3. Δειγματοληψία αποδοχής (Acceptance Sampling)

Στο πλαίσιο της πειραματικής μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η ενασχόληση περιορίζεται στην πρώτη κατηγορία, τον πειραματικό σχεδιασμό. Ο σχεδιασμός και η ανάλυση πειραμάτων, περιέχει όλες εκείνες τις στατιστικές τεχνικές οι οποίες μας βοηθούν στην εκτίμηση της επίδρασης που έχουν τα διάφορα επίπεδα των παραγόντων (μεταβλητών), που επηρεάζουν τις ποιοτικές παραμέτρους του τελικού προϊόντος, και συνεπώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο βέλτιστο σχεδιασμό της διεργασίας παραγωγής. Ο παραδοσιακός πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώνεται στο πως οι παράγοντες σχεδιασμού επηρεάζουν μεμονωμένα την ποιότητα. Αντίθετα, πιο σύγχρονες προσεγγίσεις, όπως η μέθοδος Taguchi που θα αναλυθεί παρακάτω, θέτουν στο επίκεντρο της συζήτησης τη μεταβλητότητα. Με τον όρο μεταβλητότητα, εννοούμε την επίδραση κάποιων αιτιών στη διαδικασία παραγωγής, οι οποίες δημιουργούν στατιστική μεταβολή του μέσου όρου των ποιοτικών χαρακτηριστικών. Προϊόντα μικρότερης μεταβλητότητας έχουν μικρότερη απώλεια ποιότητας.

Η μέθοδος Taguchi αναπτύχθηκε από τον ομώνυμο Ιάπωνα μηχανικό και στατιστικολόγο κατά τη δεκαετία του '90 και στηρίχτηκε σε δυο καινοτόμα εργαλεία: τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο (Signal to Noise Ratio: SNR) και τη χρήση ορθογώνιων πινάκων (Orthogonal Arrays: OA), προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μεταβλητότητα με το μικρότερο δυνατό κόστος. Ο SNR είναι ένας δείκτης που

ποσοτικοποιεί την αλληλεπίδραση των «παραγόντων ελέγχου» με τους «παράγοντες θορύβου». Το προϊόν-στόχος πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να μην επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν μπορούν να ελεγχθούν · με άλλα λόγια ο λόγος της ποιότητας (σήμα/signal) προς τους ανεξέλεγκτους παράγοντες (θορύβους/noise) πρέπει να είναι υψηλός. Τότε η διεργασία θα είναι λιγότερο ευαίσθητη στη μεταβλητότητα και η διακύμανση των αποκρίσεων που παρατηρούνται (s^2) θα είναι μικρή, δηλαδή ο μέσος της ποιότητας πλησιάζει το στόχο της ποιότητας. Από την άλλη τα ορθογώνια διανύσματα επιτρέπουν τη σημαντική μείωση του αριθμού πειραμάτων και προσομοιώσεων. Η σημασία των ΟΑ έγκειται στο ότι οι προκαθορισμένες δοκιμές είναι στατιστικά ανεξάρτητες.

Συνοπτικά, η Taguchi οδηγεί στην εύρεση βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας μιας διεργασίας ή ενός προϊόντος, δίνοντας λύση σε προβλήματα όπου δεν υπάρχει αντικειμενική συνάρτηση. Αποτελεί μέθοδο βελτιστοποίησης με μικρό υπολογιστικό κόστος, που παράλληλα, μειώνει το κόστος και τον χρόνο έρευνας και ανάπτυξης διεργασιών. Τα βήματα της μεθόδου που πρέπει να ακολουθηθούν παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Καθορισμός προβλήματος : επιλογή της μεταβλητής απόκρισης (output).
2. Καθορισμός παραγόντων ελέγχου και πηγών θορύβου: προσδιορισμός των συνθηκών πειραματισμού.
3. Σχεδιασμός πειραμάτων: επιλογή των κατάλληλων ΟΑ.
4. Διεξαγωγή πειραμάτων: εκτελείται ο απαιτούμενος αριθμός πειραμάτων.
5. Ανάλυση αποτελεσμάτων: χρήση στατιστικών μεθόδων ανάλυσης (π.χ. ανάλυση διασποράς-ANOVA ή πολλαπλής παλινδρόμησης-Multiple Regression)
6. Επικύρωση αποτελεσμάτων: εκτέλεση πειράματος με τα δεδομένα που έχουν προκύψει από την ανάλυση αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά τα συστήματα NaDES-UAE, η αποδοτικότητα της διεργασίας είναι μια συνάρτηση πολλών μεταβλητών. Μερικά παραδείγματα παραμέτρων που εμπεριέχονται σε αυτό το πολυμεταβλητό σύστημα είναι ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία διαλύτη:πρώτης ύλης, η ισχύς που μεταδίδεται (άμεσα ή έμμεσα) από του υπερήχους, η ίδια η φύση του διαλύτη, η θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο δείγμα, καθώς και η προκατεργασία που πιθανώς έχει υποστεί (τεχνικές ξήρανσης, ανάλυση κοκκομετρίας). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μεταβλητών επηρεάζουν έντονα το βιοδραστικό προφίλ των εκχυλισμάτων.⁷² Γι' αυτόν τον λόγο η εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού, μέσω της μεθόδου Taguchi, προτείνεται, αφού προσφέρει

χρήσιμες πληροφορίες για τις συνθήκες εκχύλισης. Για να αντληθούν οι πληροφορίες αυτές χωρίς τη χρήση της μεθόδου, ο όγκος των πειραμάτων που θα απαιτούνταν θα ήταν σημαντικά μεγαλύτερος και ενδεχομένως απαγορευτικός ως προς τον διαθέσιμο χρόνο.

1.6 Κοσμητολογία

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό Νο1223/2009/EC ως «καλλυντικό προϊόν» νοείται “κάθε ουσία ή μείγμα που προορίζεται να έλθει σε επαφή με εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, τριχωτά μέρη του σώματος και της κεφαλής, νύχια, χείλη και εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, με αποκλειστικό ή κύριο σκοπό τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, τη μεταβολή της εμφάνισής τους, την προστασία τους, τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση των σωματικών οσμών”.⁷⁴ Ελαφρώς διαφοροποιημένος ορισμός έχει δοθεί και από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA).⁷⁵

1.6.1 Κρέμες και γαλακτωματοποιητές

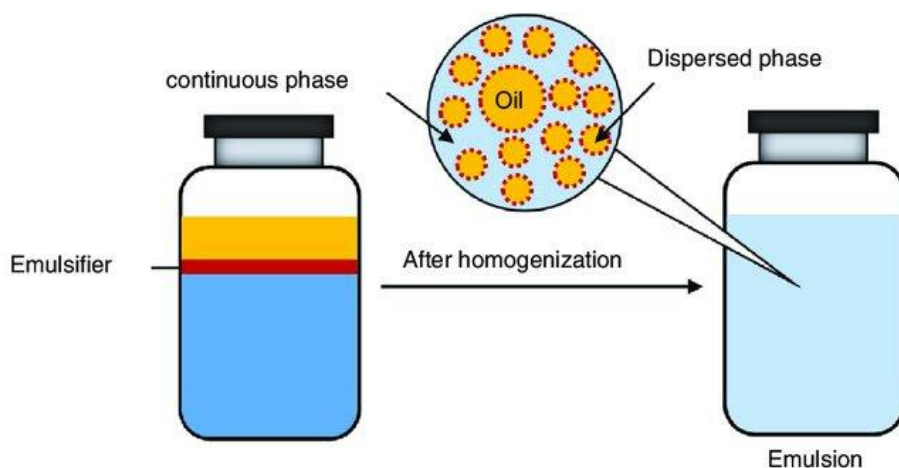
Για τη βιομηχανία καλλυντικών, κρέμες χαρακτηρίζονται τα ημιστερεά γαλακτώματα που προορίζονται για εξωτερική εφαρμογή. Τα γαλακτώματα είναι ασταθή συστήματα από θερμοδυναμικής απόψεως και σε μικροσκοπικό επίπεδο ορίζονται ως ένα σύστημα που αποτελείται από διεσπαρμένη φάση υγρών σταγονιδίων σε μια συνεχή υγρή φάση. Η διάμετρος των σταγονιδίων κυμαίνεται από 0,5-100μm και παρόλο που τα γαλακτώματα συνίστανται συνήθως από 2 υγρά στοιχεία, υπάρχουν πολλά συστήματα όπου παρατηρείται παρουσία στερεών σωματιδίων.

Ανάλογα με το είδος των δύο παραπάνω φάσεων τα γαλακτώματα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες και συνδυασμούς αυτών:

- * Ελαίου σε νερό (Oil-in-water emulsion: o/w):
Διεσπαρμένη φάση: λιπαρή / Συνεχής φάση: υδατική
- * Νερού σε έλαιο (Water-in-oil emulsion: w/o):
Διεσπαρμένη φάση: υδατική / Συνεχής φάση: λιπαρή
- * Πολλαπλά γαλακτώματα (o/w/o) ή (w/o/w)

Πρακτικά, ο/w κρέμες αποτελούνται από 10-25% ελαιώδη φάση, έχουν μη λιπαρή υφή και ξεπλένονται εύκολα. Αντίθετα, οι w/o κρέμες είναι λιπαρές, με μεγαλύτερο ιξώδες. Χάρη στην ελαιώδη τους φάση, τα γαλακτώματα έχουν την ικανότητα να απλώνονται στο δέρμα και να επιδρούν σε αυτό μέσω των ιδιοτήτων των συστατικών που περιέχουν.⁷⁶

Για να γίνουν οι δυο φάσεις συμβατές μεταξύ τους και να σχηματιστεί το γαλάκτωμα (emulsion), είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός γαλακτωματοποιητή (emulsifier) · μία ιδιαίτερη κατηγορία επιφανειοδραστικών ουσιών (Σχήμα 12).⁷⁷ Ως επιφανειοδραστικοί παράγοντες προσδιορίζονται τα μόρια εκείνα που είναι ικανά να διασπείρουν μια λιπιδική φάση σε μια υδατική, χάρη στην αμφιπαθή (ή αμφίφιλη) δομή τους: συνδυασμός υδρόφιλης και υδρόφοβης (λιπόφιλης) ομάδας στο ίδιο το μόριο. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, εντοπίζονται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο αυτών φάσεων και σταθεροποιούν το γαλάκτωμα μειώνοντας τη μεταξύ τους επιφανειακή τάση. Ουσιαστικά, σχηματίζοντας ένα στρώμα γύρω από τα διεσπαρμένα σταγονίδια ελέγχουν απόλυτα τις ρεολογικές ιδιότητες των δύο φάσεων.⁷⁸ Ο ρόλος του γαλακτωματοποιητή είναι καίριος και για το είδος τους γαλακτώματος που θα προκύψει και όχι απλά για τον σχηματισμό του. Κατά την ανάμιξη των δύο ασύμβατων φάσεων, ισόποσα σταγονίδια σχηματίζονται εκατέρωθεν. Η συνεχής φάση θα σχηματισθεί ως αποτέλεσμα της έντονης αστάθειας που δημιουργείται στα σταγονίδια μιας εκ των δυο φάσεων, τα οποία θα συνενωθούν αστραπιαία. Από την άλλη, ο γαλακτωματοποιητής σύμφωνα με τη φύση του, θα «προστατέψει» τα σταγονίδια της εναπομένουσας φάσης, διατηρώντας τη μορφή τους. Επιπλέον, διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των συστατικών τους δεν επηρεάζουν σημαντικά τον θερμοδυναμικό τους χαρακτήρα.



Σχήμα 12: Σύνθεση γαλακτωμάτων και ο ρόλος των γαλακτωματοποιητών

Στη βιομηχανία, συνήθως χρησιμοποιούνται παραπάνω από ένας γαλακτωματοποιητές για την επίτευξη σταθερότερων γαλακτωμάτων. Μια παράμετρος εξέχουσας σημασίας για την επιλογή των κατάλληλων γαλακτωματοποιητών είναι ο δείκτης Υδρόφιλης-Λιπόφιλης Ισορροπίας (HLB, Hydrophilic-Lipophilic Balance). Πρόκειται για μια κλίμακα υδροφιλίας που λαμβάνει τιμές από το 0 έως το 20 και στην οποία κάθε επιφανειοδραστικός παράγοντας κατατάσσεται σύμφωνα με την υδρόφιλη/λιπόφιλη τάση του. Ένας καλός γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να έχει περιορισμένη διαλυτότητα τόσο στην φάση του ελαίου, όσο και στην υδατική, δηλαδή να μη λαμβάνει ακραίες τιμές της κλίμακας. Τέτοιου είδους γαλακτωματοποιητές χαρακτηρίζονται από «αυτό-ισορροπία» και έτσι συγκεντρώνονται πολύ αποτελεσματικά στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Γενικά, υδρόφιλοι γαλακτωματοποιητές έχουν υψηλή τιμή HBL (πάνω από 10), ενώ χαμηλή τιμή HBL (1-10) υποδηλώνει λιπόφιλο χαρακτήρα. Ωστόσο, η κλίμακα HBL αποτελεί μια μέθοδο αποκλειστικά ποιοτική. Έτσι, δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τις ποσότητες των γαλακτωματοποιητών που πρέπει να περιέχονται σε ένα άρτιο γαλάκτωμα. Συνεπώς, αφότου βρεθούν οι κατάλληλοι γαλακτωματοποιητές, ο συνδυασμός των οποίων θα οδηγήσει στο επιθυμητό, βέλτιστο HBL (critical HBL: cHBL) για το εκάστοτε σύστημα γαλακτώματος, πρέπει να προετοιμαστούν διαφορετικά μίγματα, που θα ποικίλουν ως προς τις αναλογίες και τις συνολικές ποσότητες των γαλακτωματοποιητών. Το τελικό σύστημα επιλέγεται με γνώμονα την

υψηλότερη σταθερότητα, που όμως δε θα απαιτεί την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων γαλακτωματοποιητών για να επιτευχθεί.⁷⁹

1.6.2 Αξιολόγηση καλλυντικών κρεμών

Από τεχνολογικής απόψεως τα κοσμητολογικά σκευάσματα οφείλουν να έχουν τα επιθυμητά ποιοτικά χαρακτηριστικά και να διατηρούν τη σταθερότητά τους και παράλληλα πρέπει να ικανοποιούν τις ανάγκες των καταναλωτών. Γι' αυτόν τον λόγο, τα παραπάνω προϊόντα πρέπει να αντιμετωπίζονται ισότιμα, τόσο ως προς τις δερματολογικές ιδιότητες, όσο και ως προς τα επιθυμητά αισθητήρια χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με μελέτες τα κύρια χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την κρίση του καταναλωτή είναι η οσμή, η εμφάνιση (π.χ. χρώμα) και η υφή (επαφή με το δέρμα και αίσθηση).

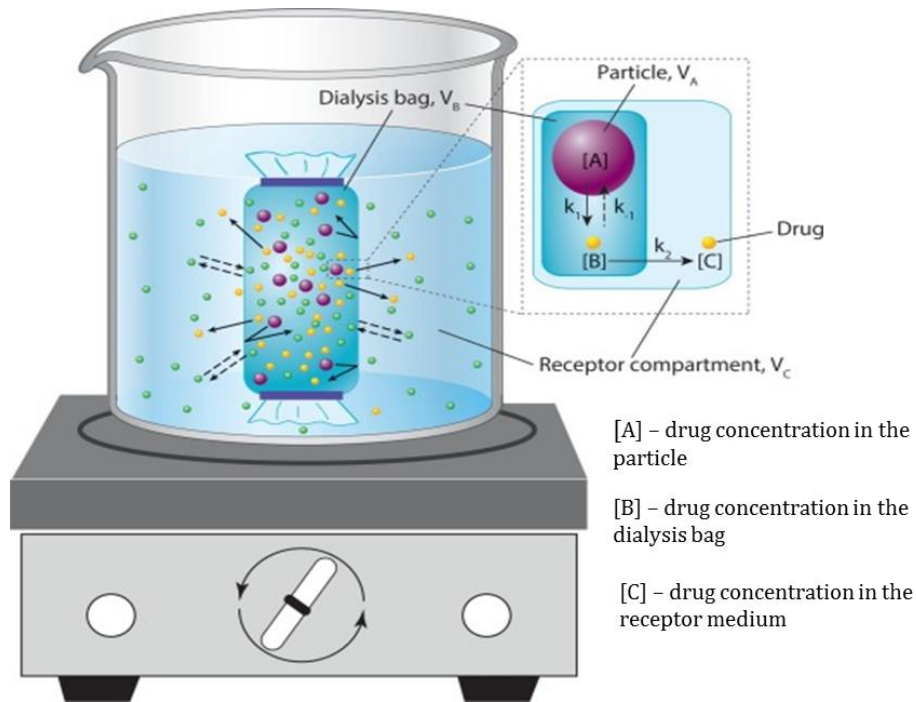
- **Μελέτη σταθερότητας**

Πολλά ερευνητικά τμήματα εταιριών του κλάδου, καταστρώνουν εξειδικευμένες έρευνες (sensory analysis) σε εκπαιδευμένο κοινό και αντιπροσωπευτικό δείγμα καταναλωτών, ώστε να αξιολογήσουν τα προϊόντα τους. Η παραπάνω τακτική αποτελεί πολύτιμο εργαλείο, όμως είναι ακριβή και χρονοβόρα. Έτσι συχνά προτιμάται η εφαρμογή οργανοληπτικής ανάλυσης (instrumental analysis) ή ιδανικά ένα κράμα των δύο ειδών ανάλυσης. Χαρακτηριστικά όπως η επαρκής ρεολογική συμπεριφορά, η κατάλληλη συνάφεια των υλικών και οι επιθυμητές μηχανικές ιδιότητες (σταθερότητα, ολισθηρότητα) μπορούν να μετρηθούν εργαστηριακά.⁸⁰ Μια ακόμα παράμετρος που πρέπει να εξεταστεί είναι το pH, το οποίο πρέπει να παρομοιάζεται με τα αντίστοιχα επίπεδα του δέρματος. Για να διαπιστωθεί αν το προϊόν μπορεί να διατηρεί τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά για ένα εύλογο – αποδεκτό για την αγορά χρονικό διάστημα, εφαρμόζονται μέθοδοι όπως: ο κύκλος ψύξης-θέρμανσης (freeze-thaw cycle), η φυγοκέντριση, καθώς και η προσφορά ενέργειας μέσω συστημάτων υπερήχων με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της τοπικής θερμοκρασίας. Κατά τη φυγοκέντριση, ο μη διαχωρισμός επιβεβαιώνει τη σταθερότητα του προϊόντος. Από την άλλη ο διαχωρισμός δεν αποτελεί αναγκαία συνθήκη απόρριψης του, αφού θεωρείται ότι δε θα του ασκηθούν ποτέ ισχυρές βαρυτικές δυνάμεις.⁸⁰⁻⁸²

Όλα τα καλλυντικά σκευάσματα είναι επιρρεπή σε μικροβιακές μολύνσεις, εξαιτίας του υψηλού ποσοστού υγρασίας που τα χαρακτηρίζει. Πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπόψιν ότι τέτοιες επιμολύνσεις δεν είναι εφικτό να συμβούν μόνο κατά τις διαδικασίες παραγωγής, συσκευασίας ή διανομής των προϊόντων, αλλά καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους, έχοντας άμεση συσχέτιση και με τη διαχείριση που θα λάβουν από τον τελικό καταναλωτή. Γι' αυτόν το λόγο υπάρχει αυστηρή νομοθεσία αναφορικά με την παρουσία μικροοργανισμών. Γενικότερα, τα καλλυντικά δεν πρέπει να περιέχουν αερόβιους μεσόφιλους μικροοργανισμούς σε επίπεδα μεγαλύτερα των 100-1000 CFU/mL (CFU: Μονάδα σχηματισμού αποικιών). Παράλληλα, παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως ο χρυσίζων Σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*) και το Εντεροαιμορραγικό Κολοβακτηρίδιο (*Escherichia coli*) πρέπει να συναντώνται σε τέτοια συγκέντρωση, ώστε πρακτικά να απουσιάζουν σε όρους μικροβιολογικής. Είναι σαφές ότι μέθοδοι αποστείρωσης (αποστειρωμένη διήθηση, αποστειρωμένη συσκευασία) αποτελούν λύση στο πρόβλημα, όμως δεν είναι οικονομικά υποφερτές από τη βιομηχανία. Επιπρόσθετα, η ακτινοβόληση με ακτίνες-γ δε συμμορφώνεται με τις «πράσινες» πρακτικές. Ως συνέπεια των παραπάνω η πλειοψηφία των καλλυντικών και ιδίως όσα περιέχουν υδατικά εκχυλίσματα, απαιτεί προσθήκη συντηρητικών. Δυστυχώς όμως, το εύρος επιλογών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτόν χωρίς να υποβαθμιστεί η φυσικότητα του προϊόντος, είναι πολύ περιορισμένο.⁸³

- ***In vitro* μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης των δραστικών συστατικών από τη κρέμα**

Επιπλέον, απαραίτητες κρίνονται και οι μελέτες αποδέσμευσης των δραστικών ουσιών μέσα από τα καλλυντικά προϊόντα. Οι μελέτες αυτές μπορούν να πραγματοποιηθούν με *in vitro* τεχνικές προσομοίωσης της επιφάνειας εφαρμογής του προϊόντος σε συνδυασμό με φασματοσκοπικές μεθόδους ανίχνευσης ενώσεων (π.χ. UV-Vis, HPLC, LC-MS).



Σχήμα 13: Μελέτη αποδέσμευσης με τη μέθοδο μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης (Dialysis bag method)

Παράλληλα, χρήσιμο εργαλείο κατά τη διαδικασία μελέτης αποδέσμευσης αποτελούν και τα κινητικά μοντέλα. Τα κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης χρησιμοποιούνται κυρίως για την πρόβλεψη της αποδέσμευσης των εγκλωβισμένων μορίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα αποδέσμευσης είναι: ^{84,85}

- Μηδενικής τάξης (Zero order)
- Πρώτης τάξης (First order)
- Higuchi
- Korsmeyer-Peppas
- Hixson-Crowell
- Μοντέλο Weibull

1.6.3 Χρήση NaDES σε καλλυντικά προϊόντα

Η απαγόρευση συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών σε προϊόντα της κοσμητολογίας που έχει επιβάλλει ο κανονισμός REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) — κανονισμός για την καταχώριση,

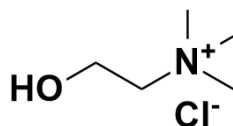
αξιολόγηση, αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων – έχει εκτοξεύσει τη ζήτηση για πρόσθετα φυσικής προέλευσης. Χάρη στον βιώσιμο χαρακτήρα τους και το χαμηλό τους κόστος, τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας που έχουν προκύψει από τη χρήση αγροτικών πρώτων υλών αλλά και γενικότερα απόβλητα γεωργικής καταγωγής, θεωρούνται εξαιρετικές πηγές ουσιών με αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και άλλες ευεργετικές δράσεις. Η κύρια ανησυχία πάνω στο θέμα αυτό, σχετίζεται με την εκχύλιση των παραπάνω φυσικών συστατικών, αφού ο επιτακτικός περιορισμός των τοξικών συμβατικών διαλυτών έχει μειώσει σημαντικά τις διαθέσιμες λύσεις. Το νερό, παρότι είναι ένας διαλύτης που συναντάται σε αφθονία, δεν αποτελεί ανταγωνιστική επιλογή, καθώς αδυνατεί να εκχυλίσει μη πολικές ενώσεις. Η χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (NaDES), παρά το γεγονός ότι μέχρι προσφάτως αποτελούσε ένα μη επαρκώς εξερευνημένο πεδίο για τη βιομηχανία καλλυντικών, θεωρείται μια σημαντική εναλλακτική λύση για τις εταιρείες καλλυντικών να επιτύχουν και να διαφοροποιηθούν από τον ανταγωνισμό, αναπτύσσοντας καινοτόμα εκχυλίσματα φυτοχημικής φύσεως με υψηλή βιοδραστικότητα.⁸³

Όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, δεκάδες μίγματα και συνδυασμοί που οδηγούν σε παρασκευή NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων, παρουσιάζοντας μάλιστα και κάποια παράπλευρα πλεονεκτήματα. Τα φαινολικά αποτελούν κατηγορία των παραπάνω ενώσεων ειδικού ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία καλλυντικών, χάρη στην αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη ή/και αντιγηραντική τους δράση. Σκευάσματα εμπλουτισμένα με αντιοξειδωτικά φαινολικά λαμβάνουν ολοένα και περισσότερο στρατηγική θέση στη κοσμητολογία, ως μέσο άμυνας απέναντι στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species: ROS) ή αλλιώς ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες μπορούν να δημιουργηθούν εξαιτίας διαφόρων διαταραχών, γνωστές στο σύνολό τους ως οξειδωτικό στρες.⁸⁰ Αυτό μπορούν να το πετύχουν λαμβάνοντας διαφορετικούς ρόλους, αφού ανάλογα τον μηχανισμό μπορούν να δράσουν δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ως αναγωγικοί, συνεργιστικοί ή χηλικοί παράγοντες.⁸⁰ Γενικότερα τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην παραγωγή καλλυντικών φροντίδας του δέρματος, για τους παραπάνω λόγους. Ειδικότερα, προσφέρουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, μείωση της μελανίνης και αύξηση των επιπέδων ενυδάτωσης του δέρματος.⁷⁶ Συνάμα,

λειτουργούν και ως συντηρητικά για το ίδιο το προϊόν, προστατεύοντάς το από τη λιπιδική υπεροξείδωση.⁸⁰

Η χλωριούχος χολίνη (Σχήμα 14) αποτελεί ίσως το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συστατικό για την παραγωγή NaDES. Ωστόσο, εκείνη και τα παράγωγά της συγκαταλέγονται στο *Παράρτημα II* της Ευρωπαϊκού Κανονισμού για τα καλλυντικά (No.1223/2009/EC), ως απαγορευμένες ενώσεις. Οι πρώτες βιβλιογραφικές μελέτες για την ανακάλυψη καινοτόμων και αποδοτικών NaDES, που θα συμμορφώνονται με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία κάνοντας δυνατή τη χρήση τους ως διαλύτες στην κοσμητολογία, χρονολογούνται από το 2012 και από τότε βασίζονται στις παρακάτω αρχές:⁸³

- * Πρώτα απ' όλα, κανένα συστατικό δεν πρέπει να υπάρχει στο αντίστοιχο παράρτημα απαγορευμένων ενώσεων.
- * Όλα τα συστατικά πρέπει να φυσικής προέλευσης, από βιώσιμες πηγές και σε λογικό κόστος για αξιοποίηση σε βιομηχανική κλίμακα.
- * Το τελικό μίγμα – διαλύτης θα πρέπει να έχει μοριακή δομή και χαρακτηριστικά σαν και αυτά που περιεγράφηκαν στην ενότητα 1.4 για τα NaDES.
- * Επίσης τα μίγματα θα πρέπει να έχουν χαμηλό ή ρυθμιζόμενο ιξώδες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τέτοιο ώστε να επιτρέπεται η ομοιογενής διασπορά του φυτικού υλικού και ο εύκολος διαχωρισμός στερεού/υγρού.
- * Παράλληλα, πρέπει να επιδεικνύουν μακροχρόνια σταθερότητα – συμπεριλαμβανομένης και της μικροβιακής σταθερότητας – είτε μόνα τους είτε με τη βοήθεια πράσινων συντηρητικών προσθέτων.
- * Τέλος, οι διαλύτες πρέπει να εμφανίζουν άριστη συμβατότητα με κλασικές καλλυντικές μορφές, όπως οι κρέμες, τα τζελ και οι λοσιόν.

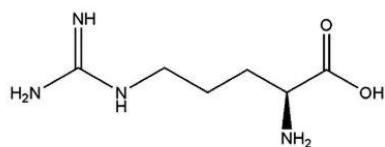


Σχήμα 14: Μοριακή δομή της χλωριούχου χολίνης.

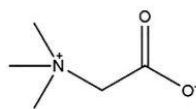
Λαμβάνοντας υπόψιν τα κριτήρια που αναφέρθηκαν, παρακάτω διακρίνονται τα δημοφιλέστερα συστατικά που κρίνεται ότι θα απασχολήσουν έντονα τη βιομηχανία καλλυντικών στο μέλλον (Σχήμα 15):⁸³

- * Τριμεθυλογλυκίνη: γνωστή και ως **βεταΐνη** αποτελεί ένα αμινοξύ που μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά τη χολίνη ως εναλλακτικό τεταρτοταγούς αμμωνίου. Είναι μη τοξική και χρησιμοποιείται ήδη τόσο σε καλλυντικά όσο και σε συμπληρώματα διατροφής. Διατίθενται σε μεγάλες ποσότητες και προσιτή τιμή, ικανοποιώντας όλες τις παραπάνω συνθήκες όταν παράγεται από φυτικές πηγές, όπως τα ζαχαρότευτλα.
- * **Γλυκίνη** και **αργινίνη**: δύο ακόμα αμινοξέα που επιλέχθηκαν για παρόμοιους λόγους με τη βεταΐνη.
- * **Φρουκτόζη** και **γλυκόζη**: επιλέχθηκαν ως οι κυριότεροι μονοσακχαρίτες.
- * **Σορβιτόλη** και **ξυλιτόλη**: επιλέχθηκαν ως οι κυριότερες πολυόλες.
- * **Προπανεδιόλη, βουτυλενογλυκόλη** και προπανο-1,2,3-τριόλη (ή **γλυκερόλη**): οι παραπάνω αλκοόλες μολονότι μικρής αλυσίδας εμφανίζουν ισχυρά πλεονεκτήματα για κοσμητολογικές εφαρμογές καθώς είναι υγρές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μπορούν να παραχθούν από φυσικές πηγές και είναι εύκολα προμηθεύσιμες σε πολύ λογική τιμή. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται συχνά κατά την παρασκευή διαφόρων NaDES, παρόλο που δε συναντώνται εύκολα στο φυτικό βασίλειο.

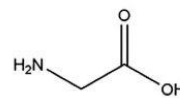
Παρόλο που τα οργανικά οξέα δεν αναφέρονται πουθενά ως ακατάλληλα για την παρασκευή NaDES, δεν συμπεριλαμβάνονται στην παραπάνω λίστα, καθώς μπορεί να προξενήσουν αστάθεια στα καλλυντικά σκευάσματα.⁸³



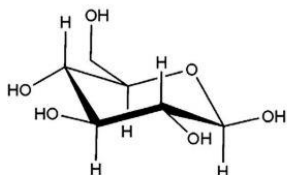
L-Arginine (Amino acid)
 = (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid
 CAS 74-79-3 ; C₆H₁₄N₄O₂ ; MW 174.20



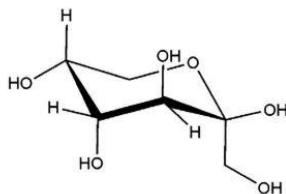
Betaine (Amino acid)
 = 2-Trimethylammonioacetate
 CAS 107-43-7 ; C₅H₁₁NO₂ ; MW 117.15



Glycine (Amino acid)
 = 2-Aminoethanoic acid
 CAS 56-40-6 ; C₂H₅NO₂ ; MW 75.07



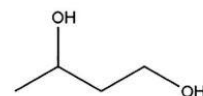
Glucose (Sugar)
 = β-D-glucopyranose
 CAS 50-99-7 ; C₆H₁₂O₆ ; MW 180.16



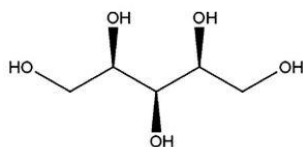
Fructose (Sugar)
 = β-D-fructopyranose
 CAS 57-48-7 ; C₆H₁₂O₆ ; MW 180.16



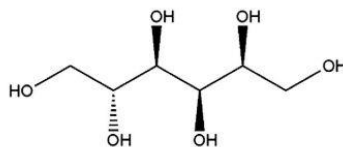
Propanediol (Glycol)
 = Propane-1,3-diol
 CAS 504-63-2 ; C₃H₈O₂ ; MW 76.09



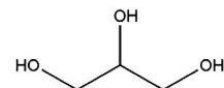
Butylene Glycol (Glycol)
 = Butane-1,3-diol
 CAS 107-88-0 ; C₄H₁₀O₂ ; MW 90.12



Xylitol (Polyol)
 = (2R,3R,4S)-pentane-1,2,3,4,5-pentanol
 CAS 87-99-0 ; C₅H₁₂O₅ ; MW 152.15



Sorbitol (Polyol)
 = (2S,3R,4R,5R)-hexane-1,2,3,4,5,6-hexol
 CAS 50-70-4 ; C₆H₁₄O₆ ; MW 182.17



Glycerol = Glycerin (Polyol)
 = 1,2,3-propanetriol
 CAS 56-81-5 ; C₃H₈O₃ ; MW 92.09

Σχήμα 15: Επιλεγμένα συστατικά για σχεδιασμό NaDES που προορίζονται για κοσμητολογική εφαρμογή και οι χημικές δομές τους.⁸³

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι ο σχεδιασμός, η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας καινοτόμου και πράσινης διεργασίας εκχύλισης ποικίλων βιοδραστικών ενώσεων από τα υπολείμματα βύνης ζυθοβιομηχανίας (Brewer's Spent Grains: BSG) και στη συνέχεια η έξυπνη αξιοποίηση των εκχυλισμάτων για την ανάπτυξη νέων καλλυντικών κρεμών προστιθέμενης αξίας. Τα υπολείμματα BSG επιλέχθηκαν ως το κύριο απόβλητο της ζυθοπαραγωγής, το οποίο αποτελεί πλούσια πηγή βιοδραστικών ουσιών και μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον ως ζωοτροφή. Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκε να επιστρατευτούν πράσινες τεχνικές όπως είναι η υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) εκχύλιση και η χρήση ενός Φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (NaDES), του NaDES Βεταΐνης-Γλυκερόλης, που σχεδιάστηκε και παρασκευάστηκε στοχευμένα για την διεργασία. Σημαντικός στόχος της παρούσας εργασίας, αποτελεί επίσης η βελτιστοποίηση της διεργασίας, κάτι που επετεύχθη με τη διενέργεια πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment – DoE) με τη μέθοδο Taguchi και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τέλος, το βέλτιστο ως προς το περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε – χωρίς περαιτέρω καθαρισμό ή στάδια απομόνωσης του διαλύτη- και ενσωματώθηκε σε καλλυντική κρέμα., η οποία με τη σειρά της υποβλήθηκε σε περαιτέρω αξιολόγηση, μέσω μελετών αποδέσμευσης και σταθερότητας.

2.2 Πειραματική Διαδικασία

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά οι πειραματικές μέθοδοι που ακολουθήθηκαν, καθώς και οι πρώτες ύλες, τα αντιδραστήρια και ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτών.

2.2.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Πρώτη ύλη

- * Υπόλειμμα βύνης:
Προμηθεύτηκε από το μικροζυθοποιείο ΑΘΗΝΕΟ, της ΑΘΗΝΑΪΚΗΣ ΖΥΘΟΠΟΙΑΣ Α.Ε., αμέσως μετά την αποβολή του ως παραπροϊόν.

Για την παρασκευή NaDES:

- * Βεταΐνη (άνυδρη) [$C_5H_{11}NO_2$] (*Alfa Aesar*)
- * Γλυκερόλη [$C_3H_8O_3$] (*Penta*)
- * Απιονισμένο νερό [*d. H₂O*]

Για τη μέθοδο προσδιορισμού ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic

Content - TPC) Folin-Ciocalteu:

- * Γαλλικό οξύ [$C_7H_6O_5$] (*Merck Millipore*)
- * Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu [Folin-Ciocalteu reagent – FCR] (*Merck Millipore*)
- * Ανθρακικό νάτριο [Na_2CO_3] (*Penta*)
- * Απιονισμένο νερό [*d. H₂O*]

Για τη μέθοδο προσδιορισμού ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων

(Total Flavonoid Content: TFC) Χλωριούχου Αργιλίου:

- * Κατεχίνη [$C_{15}H_{14}O_6$] (*Sigma - Aldrich*)
- * Νιτρώδες νάτριο [$NaNO_2$] (*Fluka AG. Buchs SG*)
- * Ένυδρο χλωριούχο αργίλιο [$AlCl_3 \cdot 6H_2O$] (*Sigma - Aldrich*)
- * Καυστικό νάτριο [$NaOH$] (*Panreac*)
- * Απιονισμένο νερό [*d. H₂O*]

Για την ανάλυση του βέλτιστου εκχυλίσματος με την τεχνική LC-MS:

- * Μεθανόλη (MeOH)
- * Αέριο Άζωτο (N₂)
- * Φορμικό οξύ (CH₂O₂)

Για την παρασκευή και την αξιολόγηση της καλλυντικής κρέμας:

- * Μελισσοκέρι
- * Γαλακτωματοποιητής Phytocream® 2000 (*Sinerga*)
- * Έλαιο αβοκάντο
- * Έλαιο αμυγδάλου
- * Ζελέ αλόης
- * Αιθέριο έλαιο
- * Υπερκάθαρο νερό
- * Αιθανόλη [$EtOH$] (*Sigma - Aldrich*)
- * Διβασικό φωσφορικό κάλιο [K_2HPO_4] (*Penta*)
- * Δισόξινο φωσφορικό κάλιο [KH_2PO_4] (*Penta*)

2.2.2 Όργανα και συσκευές

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζονται τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

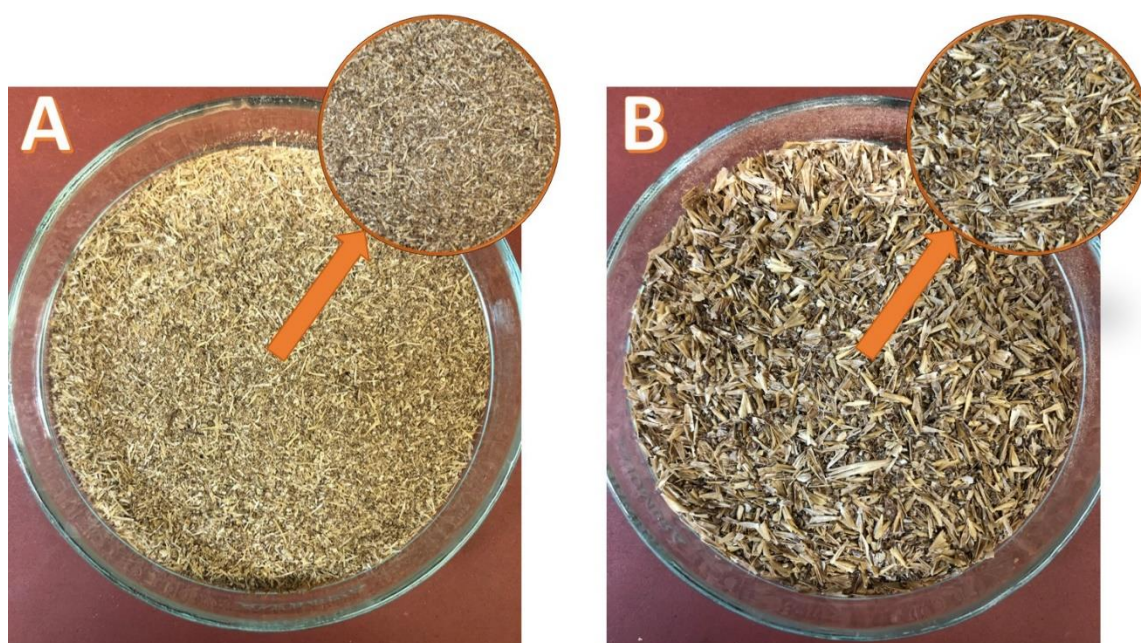
Πίνακας 7: Όργανα και συσκευές πειραματικής διαδικασίας.

Όργανα και Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Ζυγός Ακριβείας (μέχρι 110g)	Explorer	OHAUS
Ζυγός Ακριβείας (μέχρι 2g)	M2P	Sartorius
Συσκευή Λυοφιλοποίησης	Freeze dryer Lablyo Mini	Frozen in Time
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	UV-Vis V-770	Jasco
Αναδευτήρας τύπου Vortex	ZX4	Velp
Σύστημα Υπερήχων με probe	Vibra Cell probe sonicator (400 W)	Sonics & Materials Inc. company
Φασματόμετρο NMR	600 MHz	Varian
Φασματόμετρο FT-IR	FT/IR 4000	Jasco
Ιξωδόμετρο - Ροόμετρο	SVM 3001	Anton Paar
Συσκευή Karl Fischer	831 KF Coulometer/ 728 Stirrer	ΩMetrohm
Υγρός Χρωματογράφος	Varian 212-LC Ser No. A00287	Varian
Στήλη Υγρής Χρωματογραφίας	BDS Hypersil C ₁₈ (250mm x 4.6 mm) (Particle Sz: 5μ)	Thermo Scientific™
Φασματόμετρο μάζας	Varian 500-MS	Varian
Υπερφυγόκεντρος	SORVALL LYNX 6000 Centrifuge	Thermo Scientific™
Ρεόμετρο	HAAKE MARS iQ Air Modular Advanced Rheometry System	Thermo Scientific™
Πεχάμετρο	744 pH Meter	ΩMetrohm
Μεμβράνη Διάλυσης	SERVAPOR® dialysis tubing, MWCO 12,000 – 14,000	SERVA
Φίλτρα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE)	Nonsterile CA Syringe Filters, Pore:0,45μm, Ø0.25 mm (SFCA-245-100)	Branchia

2.2.3 Προετοιμασία πρώτης ύλης

Η πρώτη ύλη παραλήφθηκε απευθείας από το αντίστοιχο στάδιο παραγωγής, γεγονός που συνεπάγεται υψηλό ποσοστό υγρασίας, όπως αναφέρεται και στην *Ενότητα 1.3*. Παράλληλα, σε επόμενη ενότητα του ίδιου κεφαλαίου (1.3.2) σημειώνεται η σημαντικότητα προεπεξεργασίας της πρώτης ύλης, προκειμένου να διευκολυνθεί η διαχείριση της, να διευρυνθεί ο χρόνος ζωής της και να αποφευχθούν ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις μικροβιακής φύσεως. Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιήθηκε ξήρανση των BSG μέσω της μεθόδου της λυοφιλοποίησης (freeze drying). Το αρχικό δείγμα BSG τοποθετείται σε συμβατικό καταψύκτη και στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή λυοφιλοποίησης, όπου η υγρασία απομακρύνεται πλήρως μέσω εξάχνωσης, κατά την κατάψυξη του δείγματος στους -50°C για 48 ώρες.

Ακολουθεί κονιοποίηση του στερεού δείγματος με μηχανήμα άλεσης (πολυκόπτης). Το κονιοποιημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε κόσκινο οπής 1 mm, όπου και διαχωρίστηκε σε δύο μέρη ανάλογα με την κοκκομετρία του, ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος της ως πιθανή παράμετρος εκχύλισης.

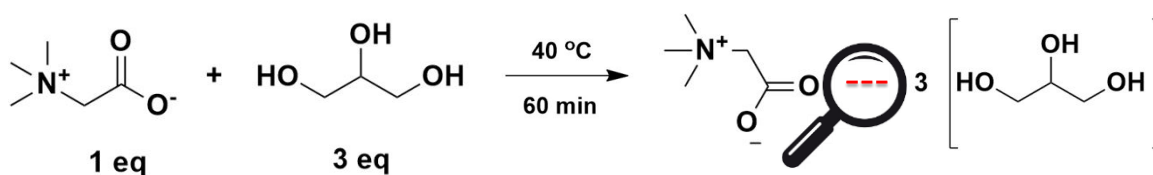


Εικόνα 3: BSG μετά από λυοφιλοποίηση και κονιοποίηση. **A.** κοκκομετρία < 1 mm. **B.** κοκκομετρία > 1mm.

2.2.4 Γενική μέθοδος παρασκευής NaDES

Για την παρασκευή του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη 1:3 (Bet-Gly 1:3), εντός σφαιρικής φιάλης προστίθενται 38,4 mmol (4,5 g) άνυδρης βεταΐνης (s) και 115,2

mmol (10,6 g) γλυκερόλης (l) [$\rho = 1,25 \text{ g/mL}$] προκειμένου να προκύψει η επιθυμητή μοριακή αναλογία. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα, όπου το μίγμα υποβάλλεται σε ήπια θέρμανση ($\sim 40^\circ\text{C}$) και ανάδευση έως ότου επιτευχθεί ομοιογένεια (~ 6 ώρες). Το επιθυμητό NaDES παραλαμβάνεται ως ένα διαυγές, ιξώδες υγρό. Ο NaDES Bet-Gly 1:3 ταυτοποιήθηκε δομικά μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance: ^1H NMR) και φασματοσκοπίας Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR). Επιπλέον μετρήθηκε το περιεχόμενο σε υγρασία, ενώ μελετήθηκαν και ορισμένες σημαντικές φυσικοχημικές του ιδιότητες, όπως το pH, το ιξώδες και η πυκνότητα.



Σχήμα 16: Απεικόνιση σχηματισμού NaDES Bet-Gly 1:3



Εικόνα 4: NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3 (Bet-Gly 1:3)

2.2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Η γενικής μέθοδος της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης των BSG με χρήση NaDES ως εκχυλιστικό διαλύτη, περιγράφεται παρακάτω:

Αρχικά, κατάλληλη ποσότητα πρώτης ύλης, συγκεκριμένης κοκκομετρίας, ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, σε ποτήρι ζέσεως μικρού όγκου, προστίθεται η πρώτη ύλη και σύστημα διαλύτη NaDES - H₂O σε κατάλληλη αναλογία. Το μίγμα μεταφέρεται στη συσκευή υπερήχων με probe, μέσα σε παγόλουτρο, ώστε να απορροφάται η θερμότητα που εκλύεται λόγω της δράσης των υπερήχων και να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του δείγματος. Μέσω του λογισμικού της συσκευής ρυθμίζονται κάθε φορά οι επιθυμητές παράμετροι της διεργασίας, όπως ο χρόνος, το ποσοστό έντασης της ισχύος της ακτινοβολίας και ο παλμός ακτινοβολίας. Με το πέρας της εκχύλισης, το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια των 1.5 mL, συμβατά με την υπερφυγόκεντρο. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 25 λεπτά σε 28.000 στροφές και σταθερή θερμοκρασία (25 °C). Στη συνέχεια, η υγρή φάση που έχει διαχωρισθεί από την κύρια μάζα στερεού, διηθείται υπό κενό για την απομάκρυνση και των τελευταίων στερεών μικροσωματιδίων. Η υπερφυγοκέντριση του προηγούμενου σταδίου διευκολύνει σημαντικά τη διεργασία της διήθησης. Τέλος, το εκχύλισμα συλλέγεται σε γυάλινα φιαλίδια και αποθηκεύεται στους 4 °C, όπου συντηρείται κατάλληλα μέχρι την περαιτέρω αξιολόγησή του.



Εικόνα 5: Συσκευή υπερήχων με probe.

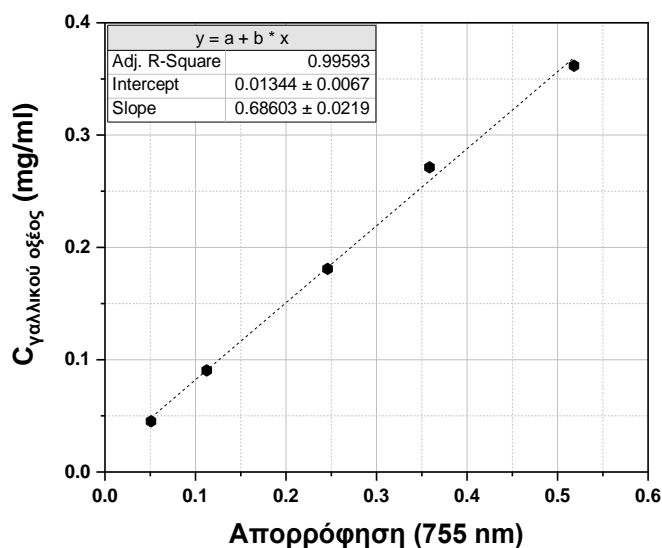
2.2.6 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων



Εικόνα 6: Εκχυλίσματα NaDES(Bet-Gly 1:3) - BSG διαφορετικής συγκέντρωσης σε βιοδραστικά συστατικά (πυκνό → αραιό).

2.2.6.1 Μέτρηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC)

Για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών συστατικών χρησιμοποιείται η μέθοδος *Folin-Ciocalteu (FC)*^{86,87} και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ($C_7H_6O_5$) προς mg πρώτης ύλης (ξηρά BSG), σύμφωνα με την παρακάτω καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος:



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος για απορρόφηση στα 755 nm.

Αναλυτικότερα, τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται περιγράφονται παρακάτω:

Ως πρώτο βήμα προετοιμάζεται stock αραιωμένου εκχυλίσματος σε απιονισμένο νερό, συνήθως σε αναλογία 1:1, ανάλογα και με την πυκνότητα τους εκχυλίσματος. Η αραιώση είναι απαραίτητη, ιδίως στα πολύ πυκνά διαλύματα, προκειμένου η απορρόφηση (A) ακτινοβολίας υπεριώδους-ορατού φάσματος που θα μελετηθεί σε επόμενο στάδιο να βρίσκεται εντός των επιθυμητών ορίων ($0 \leq A \leq 1$).

Για την εφαρμογή της μεθόδου FC, αρχικά σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (1,5 mL) προστίθενται 780 μL απιονισμένου νερού και 20 μL από το παραπάνω stock. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 50 μL από το Folin-Ciocalteu Reagent (FCR), το διάλυμα αποκτά κίτρινο χρώμα και αφήνεται 1 λεπτό σκεπασμένο με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το φως, στο οποίο το FCR είναι πολύ ευαίσθητο. Τέλος, ο συνολικός όγκος στο erpendorf φτάνει τα 1000 μL (1mL) με προσθήκη 150 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , το οποίο δρα ως ρυθμιστής pH του διαλύματος. Ακολουθεί ανάδευση με Vortex και το μίγμα φυλάσσεται για 1 ώρα σε αυστηρά σκοτεινό περιβάλλον. Με το πέρας της 1 ώρας, παρατηρείται ότι το χρώμα του διαλύματος έχει μετατραπεί από κίτρινο σε μπλε, γεγονός που συνεπάγεται ότι το FCR έχει αντιδράσει με φαινολικές ενώσεις και έχουν παραχθεί τα αντίστοιχα σύμπλοκα. Ακολουθεί μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 755 nm. Το συγκεκριμένο μήκος κύματος έχει επιλεγεί μέσω του εντοπισμού στην καμπύλη απορρόφησης των -αναμενόμενων από τη βιβλιογραφία - κορυφών απορρόφησης (peaks), οι οποίες προκύπτουν από την αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με το FCR. Το φασματοφωτόμετρο UV-VIS που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των μετρήσεων είναι διπλής δέσμης: στην πίσω κυψελίδα (κυψελίδα αναφοράς) τοποθετείται απεσταγμένο νερό καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και στην μπροστινή κυψελίδα τοποθετούνται τα προς εξέταση δείγματα. Πριν την πρώτη μέτρηση πραγματοποιείται μια μέτρηση τυφλού δείγματος (blank) και γι' αυτή τη φορά μόνο απεσταγμένο νερό τοποθετείται και στην μπροστινή κυψελίδα. Έτσι, η μετρούμενη απορρόφηση ισούται με:

$$A = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}$$

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος. Επίσης, όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για λόγους επαναληψιμότητας. Το αποτέλεσμα των μετρήσεων αντιστοιχίζεται στην καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος και από εκεί προκύπτουν τα ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος, μέσω των οποίων εκφράζεται το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε φαινολικά:

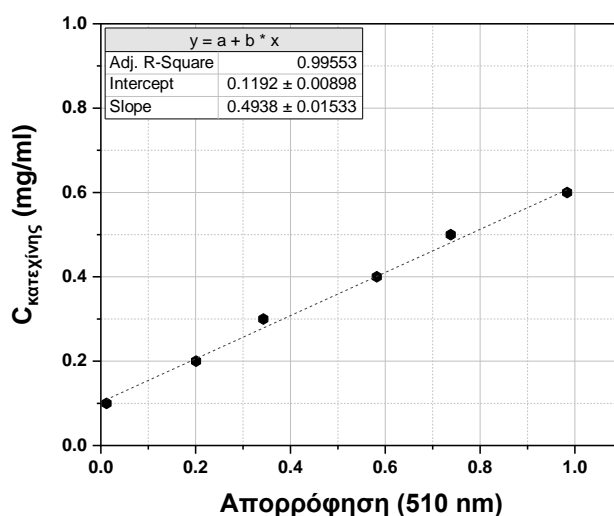
$$TPC \left(\frac{mg_{gal}}{mg_{d.BSG}} \right) = \frac{C_{gal_{eq}} \left(\frac{mg_{gal}}{mL} \right) \cdot V_{extract} (mL) \cdot D}{m_{BSG} (mg_{d.BSG})}$$

Όπου:

- * $C_{gal_{eq}}$ = συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που αντιστοιχεί στην απορρόφηση του εκχυλίσματος, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα X)
- * $V_{extract}$ = όγκος εκχυλίσματος
- * D = παράγοντας αραιώσης
- * m_{BSG} = μάζα ξηρών BSG που εκχυλίστηκαν

2.2.6.2 Μέτρηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC)

Για τη μέτρηση του περιεχομένου σε ολικά φλαβονοειδή χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου⁸⁸ και αυτή τη φορά τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη χρήση της κατεχίνης ως ένωση αναφοράς, σύμφωνα με την παρακάτω καμπύλη αναφοράς:



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για απορρόφηση στα 510 nm.

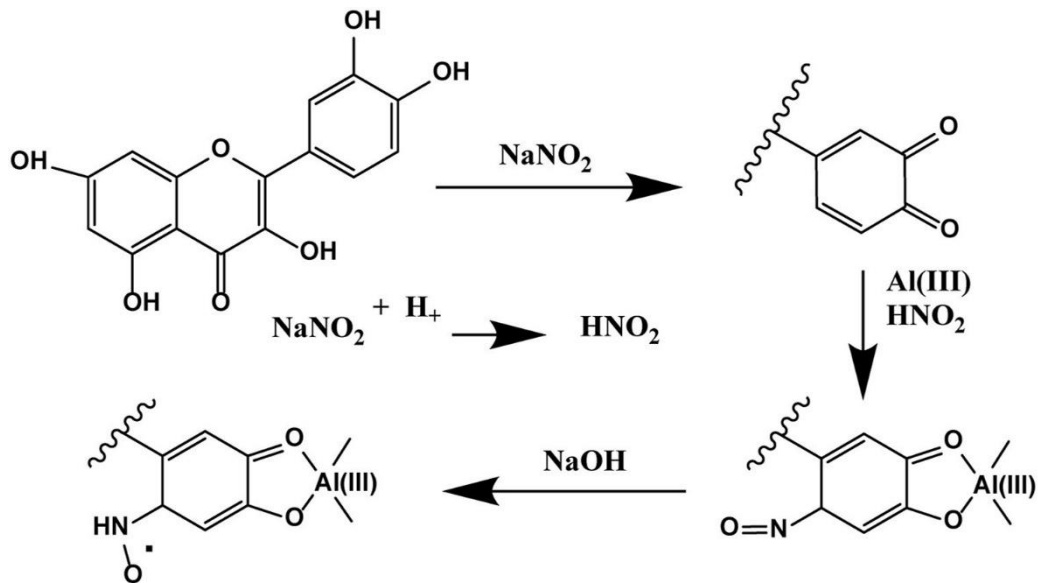
Ως προετοιμασία για την εφαρμογή μεθόδου του χλωριούχου αργιλίου απαιτείται η παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων:

- * Διάλυμα $AlCl_3$ (10% w/v): Σε 100 mL απιονισμένου νερού προστίθενται 18,1 g ένυδρου χλωριούχου αργιλίου [$AlCl_3 \cdot 6H_2O$]. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης της στερεάς ουσίας.
- * Διάλυμα $NaNO_2$ (5% w/v): Σε 20 mL απιονισμένου νερού προστίθεται 1 g νιτρώδους νατρίου [$NaNO_2$]. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης της στερεάς ουσίας.
- * Διάλυμα $NaOH$ (1M): Σε 25 mL απιονισμένου νερού προστίθεται 1 g καυστικού νατρίου [$NaOH$]. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης της στερεάς ουσίας.

Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

Αρχικά, σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (1,5 mL) εισάγονται 50 μ L εκχυλίσματος. Με την ίδια λογική όπως και στη μέτρηση TPC, για πυκνά εκχυλίσματα δημιουργείται stock, όπου το εκχύλισμα αραιώνεται σε ποσοστό 50% και η επιθυμητή ποσότητα λαμβάνεται από εκεί. Στη συνέχεια προστίθενται 30 μ L από το διάλυμα $NaNO_2$ και το μίγμα αφήνεται να επωαστεί για 6 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 60 μ L από το διάλυμα $AlCl_3$ και ακολουθεί νέα αναμονή 5 λεπτών. Στο διάστημα αυτό δημιουργούνται σύμπλοκα μεταξύ των κετο-ομάδων ή των υδροξυλίων των φλαβονοειδών και του αργιλίου, αντίδραση στην οποία στηρίζεται και η μέθοδος (Σχήμα 17). Τέλος προστίθενται 300 μ L NaOH (ρυθμιστής pH) και συμπληρώνεται απιονισμένο νερό έως τελικού όγκου 1 mL. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου αναδεύεται με Vortex και φυλάσσεται για 15 λεπτά, κατά προτίμηση σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας και της τελικής αναμονής, τα δείγματα οδηγούνται προς μέτρηση απορρόφησης στα 510 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η διαδικασία είναι όμοια με εκείνη που περιγράφηκε παραπάνω στη μέτρηση TPC,

τόσο για τον προσδιορισμό του TFC όσο και για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης.



Σχήμα 17: Μέθοδος του AlCl₃ για τον προσδιορισμού ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, βασισμένη στη δημιουργία συμπλόκων Al (III) – φλαβονοειδών.

(Για λόγους σχηματικής απεικόνισης, η βαλανοκετόνη έχει χρησιμοποιηθεί ως παράδειγμα γνωστού φλαβονοειδούς)

Για λόγους επαναληψιμότητας και εδώ, η διαδικασία εφαρμόζεται εις διπλούν για κάθε εκχύλισμα και η τελική συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών στο εκχύλισμα προκύπτει ως εξής:

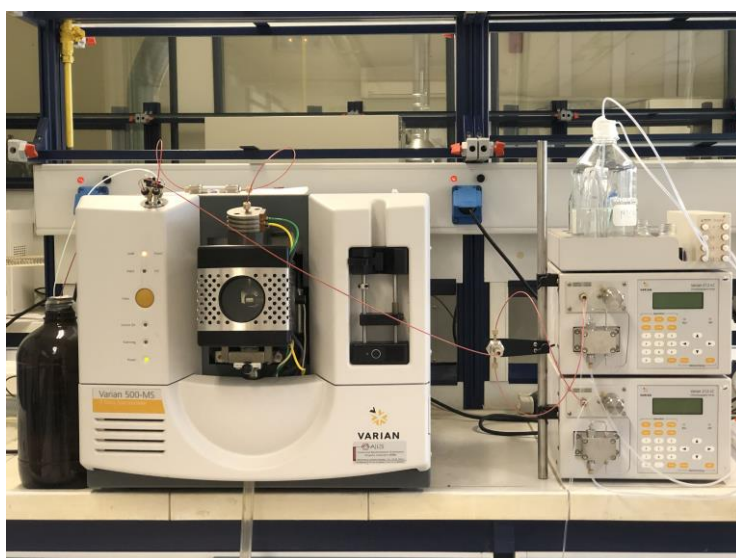
$$TFC \left(\frac{mg_{cat}}{mg_{d.BSG}} \right) = \frac{C_{cat_{eq}} \left(\frac{mg_{cat}}{mL} \right) \cdot V_{extract} (mL) \cdot D}{m_{BSG} (mg_{d.BSG})}$$

Όπου:

- * $C_{cat_{eq}}$ = συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που αντιστοιχεί στην απορρόφηση του εκχυλίσματος, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα Υ)
- * $V_{extract}$ = όγκος εκχυλίσματος
- * D = παράγοντας αραιώσης
- * m_{BSG} = μάζα ξηρών BSG που εκχυλίστηκαν

2.2.6.3 Ανάλυση βέλτιστου εκχυλίσματος με χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-MS

Με τη διαδοχική εφαρμογή των μεθόδων της υγρής χρωματογραφίας (LC) και της φασματομετρίας μάζας (MS), προκύπτει ένας πολύ αποτελεσματικός συνδυασμός (LC-MS), ιδανικός για χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση συστατικών που περιέχονται στο εκχύλισμα και κατά συνέπεια στο καλλυντικό σκεύασμα. Από τη μία, η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography: LC) διαχωρίζει με φυσικό τρόπο τα συστατικά του δείγματος - μέσω της κατάλληλης επιλογής κινητής και στατικής φάσης - και από την άλλη η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry: MS) παρέχει τη δομική ταυτότητα των υπό εξέταση συστατικών με υψηλή μοριακότητα και ευαισθησία ανίχνευσης, μέσω της δημιουργίας φορτισμένων μορίων - θραυσμάτων (ιόντων) και του μετέπειτα διαχωρισμού τους. Έτσι, λοιπόν, οι επιμέρους δυνατότητες κάθε τεχνικής ενισχύονται συνεργιστικά κατά τη σύζευξη τους, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο LC-MS μια εκ των δημοφιλέστερων στο πεδίο της χημικής ανάλυσης.



Εικόνα 7: Οργανολογική διάταξη συζευγμένης τεχνικής LC-MS.

Για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκε στήλη αντίστροφης φάσης *BDS HYPERSIL C₁₈*, η οποία αποτελείται από πληρωτικό υλικό μέτριας πολικότητας (Packing Material: Spherical, Fully Porous, Base-Deactivated Silica). Ο συγκεκριμένος αριθμός ανθράκων κρίθηκε ο κατάλληλος, καθώς εξασφάλιζε πιο διακριτό διαχωρισμό και οξείες κορυφές, συγκριτικά με τις στήλες *C₄*, *C₈*. Όσον αφορά το εκλουστικό σύστημα, μίγμα νερού - ακετονιτριλίου ($H_2O - ACN$) μεταβλητής

αναλογίας (βαθμιδωτή έκλυση) επιλέχθηκε ως κινητή φάση (Πίνακας 8) και η παροχή ρυθμίστηκε στο 1 ml/min. Η αναλογία του μίγματος διαλυτών μεταβάλλεται προκειμένου να διαχωριστούν όλα τα συστατικά ανάλογα με την πολικότητα που τα χαρακτηρίζει.

Τα παραπάνω επιλέχθηκαν με κριτήριο τους συντελεστές μερισμού (ή λιποφιλικότητας) και κατανομής logP και logD αντίστοιχα. Τα μεγάλα μόρια πάντα εκλούνται πρώτα, αλλά σε διαφορετικούς χρόνους ενώ παράλληλα, τα πολικά μόρια παρασύρονται γρηγορότερα, λόγω της παρουσίας και της αναλογίας του μίγματος ακετονιτριλίου - νερού (κινητή φάση, logP = -0.3 και logP = 0.1 αντίστοιχα), αλλά και λόγω της πολικότητας της στήλης.

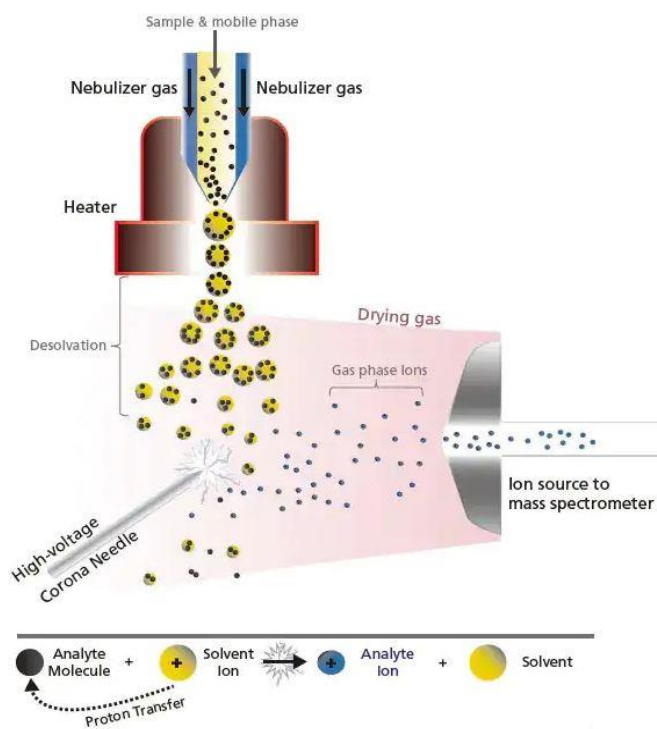
Πίνακας 8: Αναλογίες του μίγματος διαλυτών κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής μεθόδου LC

Χρόνος (min)	% H ₂ O	% ACN	Παροχή (mL/min)
0	90.0	10.0	1
20	70.0	30.0	1
40	10.0	90.0	1

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 100 μ L από το βέλτιστο εκχύλισμα αραιώθηκαν σε 500 μ L διαλύτη. Ως σύστημα διαλυτών χρησιμοποιήθηκε μίγμα μεθανόλης - νερού (με προσθήκη φορμικού οξέος 0.1%), αναλογίας 50:50 (v/v). Στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλισμάτων **NaDES-BSG** φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE), διαμέτρου 0.25 mm και μεγέθους πόρων 0,45 μ m. Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή δειγμάτων **NaDES Bet-Gly 1:3**. Για τη λήψη του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται έγχυση με ένεση ορισμένης ποσότητας (10 μ L) των παραπάνω δειγμάτων. Η πίεση που επικρατεί στη στήλη εξαρτάται άμεσα από την παροχή (ρυθμιζόμενη μεταβλητή), και υπολογίζεται από το λογισμικό του οργάνου ίση περίπου με 2000 psi. Η μέθοδος διαρκεί 40 λεπτά.

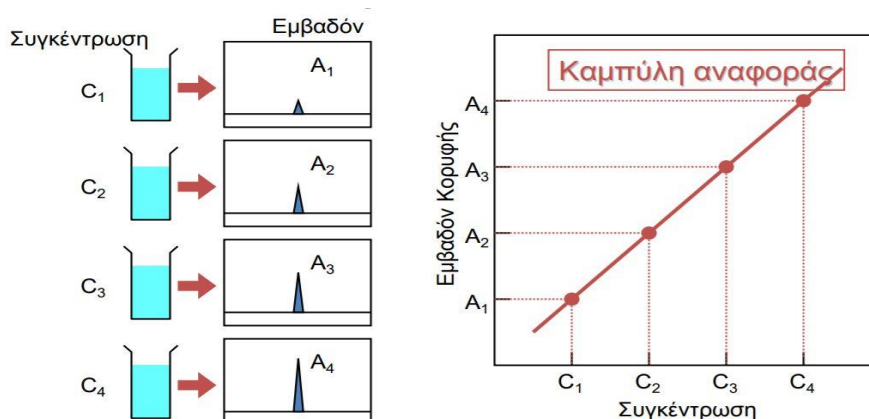
Εν συνεχεία, για την ακριβέστερη ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος αλλά και για λόγους ποσοτικής ανάλυσης, χρησιμοποιείται ανιχνευτής MS. Το MS λειτουργεί με τον σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών

θραυσμάτων, είτε σε περιοχή υψηλού κενού, είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή υψηλού κενού. Σήμερα υπάρχουν αρκετές εναλλακτικές μέθοδοι παραγωγής φορτισμένων μορίων. Στην παρούσα πειραματική μελέτη εφαρμόστηκε Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI). Στη μέθοδο αυτή, η οποία είναι ιδανική για τη μέθοδο LC-MS και η καταλληλότερη για συστατικά χαμηλής ή μέτριας πολικότητας, ο διαλύτης και τα μόρια του δείγματος αεριοποιούνται μέσω ψεκασμού του σε θερμοκρασιακές συνθήκες 50°C με παράλληλη χρήση αερίου N₂ (Αέριο εκνέφωσης), το οποίο προσφέρει την απαραίτητη ορμή στους εκλούντες της LC. Τα σταγονίδια του δείγματος που δημιουργούνται κατά τον ψεκασμό αεριοποιούνται με τη βοήθεια Αερίου Αεριοποίησης (N₂), το οποίο εισέρχεται σχεδόν ταυτόχρονα με τους διαλύτες σε θερμοκρασία 550°C, διευκολύνει τη ροή και βοηθά στην εξάτμιση. Στη συνέχεια, πρακτικά το αέριο N₂ «βομβαρδίζεται» από e⁻ υψηλής ενέργειας με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιόντων N₂⁺. Τα ιόντα αυτά συγκροούνται με τα αέρια πλέον μόρια του δείγματος και τα ιονίζουν με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων ή φορτίου, προσθήκης, ακόμα και πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Εν τέλει τα μόρια και τα θραύσματα τους διαχωρίζονται μέσω ηλεκτρικού πεδίου προκειμένου να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους.^{89,90}



Σχήμα 18: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου σχηματισμού ιόντων APCI.⁹⁰

Η μέθοδος LC-MS, χάρη στην ικανότητα της LC να διαχωρίζει ενώσεις πολυσυστατικών συστημάτων όπως τα εκχυλίσματα - προσφέρει και το βασικό πλεονέκτημα της ποσοτικής ανάλυσης, παρουσιάζοντας εξαιρετική εκλεκτικότητα. Για την ποσοτικοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος, η οποία πραγματοποιείται μέσω της ολοκλήρωσης των εμβαδών των κορυφών του χρωματογραφήματος, είναι απαραίτητη η δημιουργία καμπύλης αναφοράς των μελετώμενων ενώσεων. Για την καμπύλη αναφοράς εφαρμόστηκε η μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19: Δημιουργία καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο πολλαπλών εξωτερικών

2.2.7 Πειραματικός σχεδιασμός (μέθοδος Taguchi)

Για τον πειραματικό σχεδιασμό εφαρμόστηκε η στατιστική μέθοδος Taguchi, η οποία προσφέρεται ως αξιόπιστη λύση, καθώς συνδυάζει αποτελεσματικά την ελαχιστοποίηση των πειραμάτων και την αριστοποίηση της διεργασίας. Ως παράμετροι βελτιστοποίησης ορίστηκαν:

- A. Ο χρόνος εκχύλισης (t).
- B. Η ένταση της ισχύος των υπερήχων (%W), ως ποσοστό της μέγιστης κατασκευαστικής ισχύος του οργάνου (400 W).
- C. Η αναλογία NaDES : H₂O, εκφρασμένη ως ποσοστό (%) της περιεκτικότητας του NaDES ως προς τη συνολική ποσότητα διαλύτη.
- D. Η αναλογία στερεού : διαλύτη (S/L). Πρακτικά, η ποσότητα διαλύτη παραμένει σταθερή (4 mL) για κάθε πείραμα και μεταβάλλεται η ποσότητα της πρώτης ύλης.

Για την επιλογή των παραπάνω παραμέτρων και του εύρους τιμών τους διενεργούνται 10 προκαταρκτικά πειράματα, με σκοπό να ερευνηθεί η συμπεριφορά του συστήματος και να μελετηθούν τα όρια εφαρμογής των συνθηκών εκχύλισης (Πίνακας X). Αυτή η πρώτη σειρά εκχυλισμάτων, για την οποία πραγματοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω παραμέτρων, αξιολογείται ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις (TPC, TFC: μεταβλητές απόκρισης).

Πίνακας 9: Οι παράμετροι και οι τιμές που εφαρμόστηκαν κατά τα προκαταρκτικά πειράματα.
(A: > 1 mm και B: < 1 mm)

Κωδικός Πειράματος	ΥΚ3	ΥΚ4	ΥΚ5	ΥΚ6	ΥΚ7	ΥΚ8	ΥΚ9	ΥΚ10	ΥΚ11
Χρόνος (min)	15	15	15	15	15	30	15	5	15
Ισχύς (%)	40%	40%	40%	20%	40%	40%	40%	40%	40%
Κοκκομετρία (mm)	A	B	A	A	A	A	B	A	A
A' ύλη:DES (mg/mL)	300:4	300:4	200:4	200:4	300:4	300:4	300:4	300:4	400:4
NaDES:H₂O	3:1	3:1	3:1	3:1	1:1	3:1	1:1	3:1	3:1

Από τα συμπεράσματα που εξάγονται, οι προαναφερθείσες παράμετροι σε συνδυασμό με τα επιλεγμένα εύρη τιμών (Πίνακας 10) τους εισάγονται στο λογισμικό *Minitab*, όπου εκεί με τη χρήση της μεθόδου Taguchi προκύπτει η δεύτερη σειρά εκχυλίσεων (9 πειράματα) (Πίνακας 11). Αναλυτικότερα, σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου (ορθογώνιοι πίνακες, επίπεδα στατιστικών σφαλμάτων), οι 4 ανεξάρτητες μεταβλητές απαιτούν ως δεδομένα εισόδου 3 τιμές ($L9\ 3^4$ Array), επομένως ορίζονται για την καθεμία:

- * Μια ελάχιστη τιμή (min), η οποία ταυτίζεται με το κάτω όριο του επιλεγμένου εύρους
- * Μια μέγιστη τιμή (max), η οποία ταυτίζεται με το άνω όριο του επιλεγμένου εύρους
- * Μια ενδιάμεση τιμή (mean), η οποία προκύπτει ως μέσος όρος των δύο παραπάνω τιμών.

Οι αναλυτικές τιμές (Values) των 4 παραμέτρων (Factors) στα 3 επίπεδα (Levels) και ο συνδυασμός αυτών μέσω των οποίων έχουν προκύψει τα τελικά 9 πειράματα, παρουσιάζονται στους 2 παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 10: Πίνακας δεδομένων εισόδου για την εφαρμογή Πειραματικού Σχεδιασμού [Taguchi ($L_9 3^4$)]

		Levels		
		1	2	3
FACTORS	A	5	15	25
	B	20	35	50
	C	50	70	90
	D	100	250	400

Πίνακας 11: Συνδυασμός 3 τιμών 4 παραμέτρων για Πειραματικό Σχεδιασμό Taguchi 9 Επιπέδων

		FACTORS			
		A	B	C	D
Experiment No.	1	A1	B1	C1	D1
	2	A1	B2	C2	D2
	3	A1	B3	C3	D3
	4	A2	B1	C2	D3
	5	A2	B3	C3	D1
	6	A2	B2	C1	D2
	7	A3	B3	C3	D2
	8	A3	B1	C1	D3
	9	A3	B2	C2	D1

2.2.8 Παρασκευή καλλυντικής κρέμας

Για την καλλυντική κρέμα, παρασκευάζονται αρχικά 25g βάσης, δηλαδή ενός γαλακτώματος νερού σε έλαιο (w/o), όπου οι δύο φάσεις, λιπαρή και υδατική, αναμειγνύονται παρουσία γαλακτωματοποιητή. Ειδικότερα, για τη δημιουργία της λιπαρής φάσης σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται: ίσος όγκος (42 mL) από έλαιο αβοκάντο και αμυγδάλου και ίση ποσότητα (10,5 g) από μελισσοκέρι και γαλακτωματοποιητή Phytocream® 2000.

Το κερί μέλισσας είναι μία λιπώδης ουσία που εκκρίνεται από τους κηρογόνους αδένες των μελισσών και αποτελεί ένα πολύ σταθερό υλικό από υδρογονάνθρακες και εστέρες λιπαρών οξέων. Από την άλλη ο συγκεκριμένος γαλακτωματοποιητής είναι φυτικής προέλευσης και χαρακτηρίζεται από μια ισορροπημένη τιμή δείκτη HLB = 11 ± 1 . Χάρη στη σύνθεση του και στις ιδιότητες των συστατικών του, έχει την ικανότητα να περιέχει υψηλό ποσοστό λιπαρής φάσης (μέχρι και 40%).

Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται σε ελαιόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας (80 °C) και το μίγμα ανακατεύεται συνεχώς μέχρι να λιώσουν τα στερεά συστατικά και να επέλθει ομοιογένεια. Έπειτα, το λιπαρό μίγμα αφήνεται να ψυχθεί και όταν φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστίθεται σε αυτό 84g ζελέ αλόης, το οποίο αποτελεί την υδατική φάση. Το ζελέ αλόης αποτελεί διαδομένο συστατικό στη φαρμακευτική και καλλυντική βιομηχανία καθώς έχει επουλωτικές, μαλακτικές και καθαριστικές ιδιότητες ενώ παρουσιάζει και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Εφόσον αναμιχθούν οι δύο φάσεις, προστίθενται 12 σταγόνες αιθέριου ελαίου για να προσδώσουν ευχάριστο άρωμα στην κρέμα. Το μίγμα αναδεύεται και πάλι.

Στη συνέχεια, μεταφέρεται στη συσκευή υπερήχων με probe, μέσα σε παγόλουτρο, όπου ακτινοβολείται με ισχύ 160 W για 4 λεπτά με παλμό ακτινοβολίας 9.0-2.0 (για 9 δευτερόλεπτα οι υπέρηχοι λειτουργούν και για 2 δευτερόλεπτα η διαδικασία τίθεται σε παύση), προκειμένου να ομογενοποιηθεί.

Τέλος, στα 25 g βάσης, προστίθεται 1 mL εκχυλίσματος, το οποίο είναι πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά και έχει προκύψει σύμφωνα με τα δεδομένα που εξάγονται από τον πειραματικό σχεδιασμό.

2.2.9 Αξιολόγηση καλλυντικής κρέμας

2.2.9.1 Μελέτη αποδέσμευσης βιοδραστικών ενώσεων

Το προφίλ αποδέσμευσης των βιοδραστικών ενώσεων μελετάται μέσω εμβάπτισης μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης - στην οποία έχουν προστεθεί 4 g καλλυντικής κρέμας - σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (K_2HPO_4 και KH_2PO_4) με pH 5.5, προσομοιάζοντας αυτό της επιδερμίδας. Για τον ίδιο λόγο η θερμοκρασία κυμαίνεται σταθερά κοντά στους 32 °C, ενώ η ομοιογένεια του διαλύματος επιτυγχάνεται μέσω μαγνητικού αναδευτήρα. Για να διαπιστωθεί και για να ποσοτικοποιηθεί το ποσοστό που αποδεσμεύτηκε, λαμβάνεται δείγμα (1 mL) ανά τακτά και προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα (20', 1h, 4h, 5h). Προκειμένου να διατηρείται ο αρχικός όγκος του διαλύματος, κάθε φορά προστίθεται ποσότητα ίση με αυτή που αφαιρείται κατά τη δειγματοληψία. Τέλος τα δείγματα οδηγούνται προς LC-MS ανάλυση (βλ. 2.2.6).



Εικόνα 8: Πειραματική διάταξη για την εφαρμογή της μεθόδου μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης.

2.2.9.2 Μελέτη σταθερότητας κρεμών

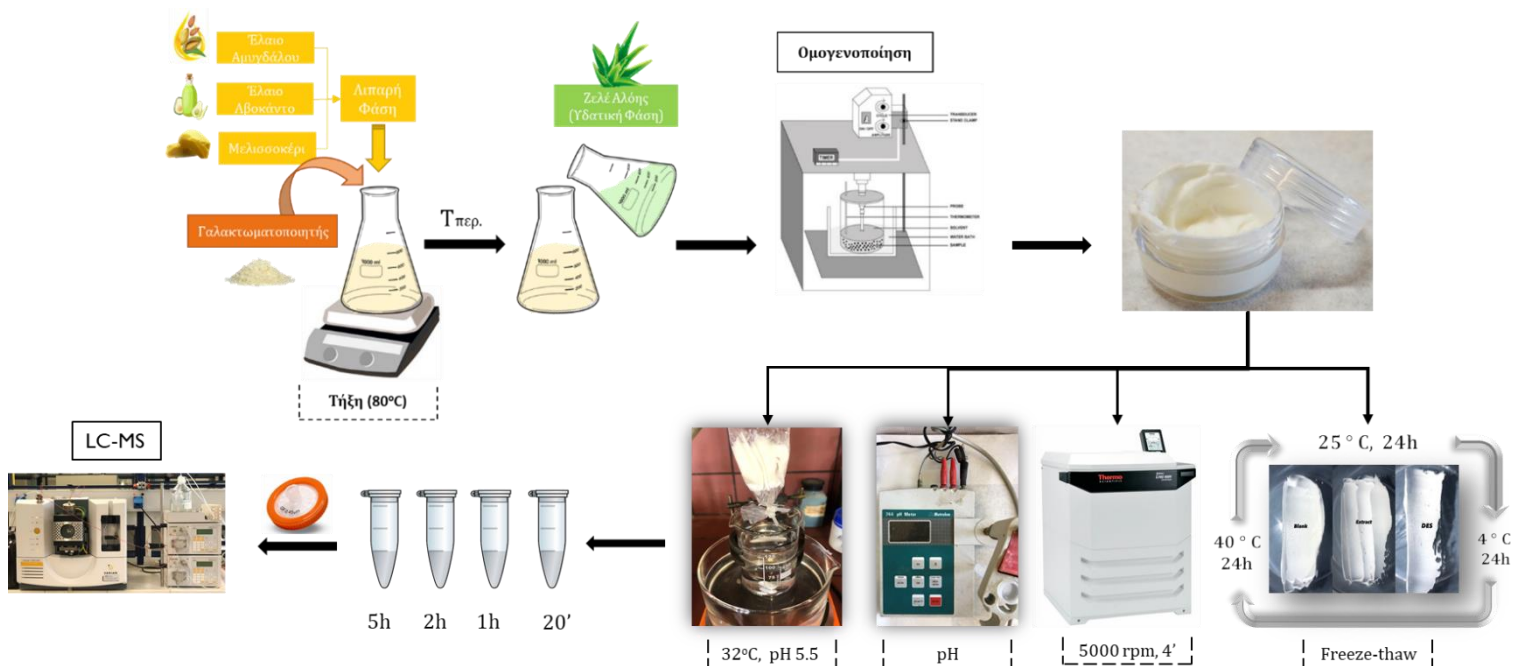
Για να ερευνηθεί η σταθερότητα του τελικού προϊόντος, η κρέμα υποβάλλεται στις παρακάτω τρεις διαδικασίες:

- * Φυγοκέντριση: δείγμα κρέμας συνολικού όγκου 1,5 mL τοποθετείται στην φυγόκεντρο (5.000 rpm) για 10 λεπτά στους 15 °C. Κριτήριο σταθερότητας αποτελεί ο διαχωρισμός υγρής-στερεής φάσης.
- * Κύκλος ψύξης-θέρμανσης (freeze-thaw cycle): δείγματα κρεμών εναλλάσσουν περιβάλλοντα διαφορετικών θερμοκρασιών, ειδικότερα:
 - ο ψυχρό περιβάλλον: 4 °C (ψυγείο)
 - ο θερμό περιβάλλον: 37 °C (incubator)
 - ο ουδέτερο περιβάλλον: 25 °C (θερμοκρασία δωματίου)

Εδώ, κριτήριο σταθερότητας αποτελούν ο διαχωρισμός φάσεων, το χρώμα και η υφή. Η μέθοδος αυτή θεωρείται αξιόπιστη και αντιπροσωπευτική, καθώς προσομοιάζει ρεαλιστικές συνθήκες, στις οποίες μπορεί να βρεθεί μια κρέμα κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση της.

2.2.9.3 Μέτρηση pH

- * Μέτρηση pH: 0,5 g από τα δείγματα των κρεμών που υποβλήθηκαν σε κύκλο ψύξης-θέρμανσης διαλύονται σε 50 mL απιονισμένου νερού και μετράται το pH του διαλύματος με πεχάμετρο. Η παραπάνω αναλογία κρέμας : απιονισμένου νερού δεν είναι δεσμευτική, καθώς το ζητούμενο είναι απλά η ομοιόμορφη διασπορά της κρέμας στο υδατικό μέσο.



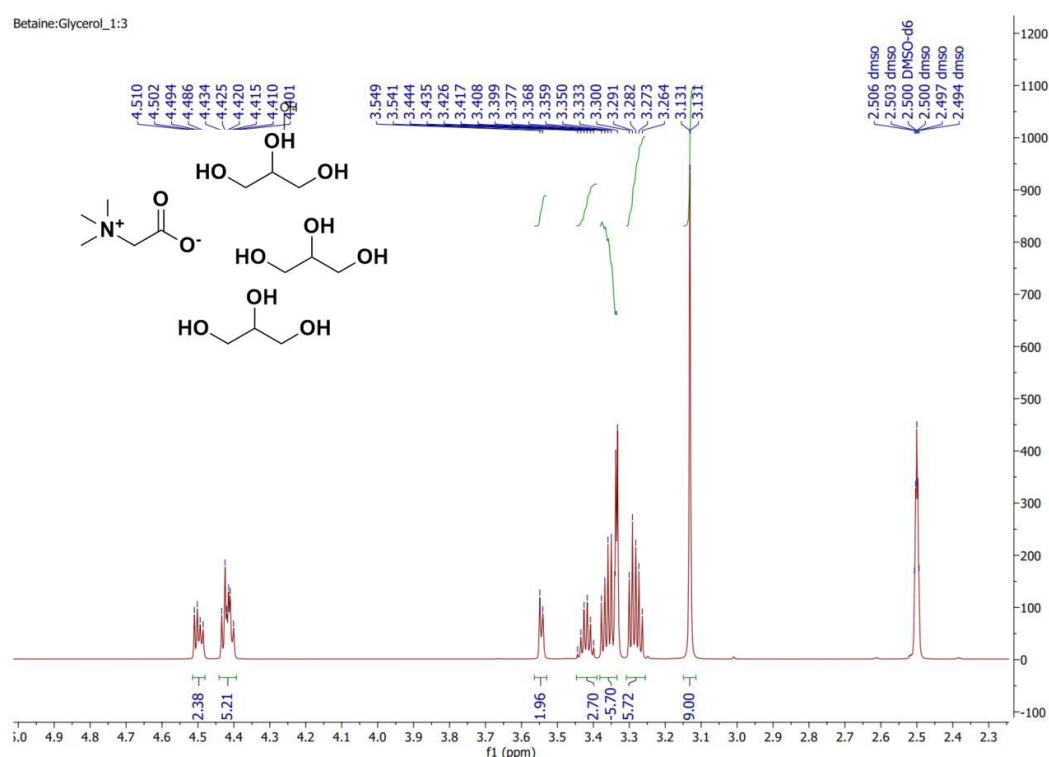
Σχήμα 20: Συνολικό διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας παρασκευής και αξιολόγησης καλλυντικής κρέμας

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Χαρακτηρισμός NaDES

3.1.1 Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Η ταυτοποίηση του NaDES που προέκυψε από αρχικά συστατικά την βεταΐνη και την γλυκερόλη σε αναλογία 1:3, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ με χρήση του δευτεριωμένου διαλύτη DMSO-d_6 , σε φασματογράφο NMR 600 MHz. Το φάσμα που προέκυψε παρουσιάζεται στο Σχήμα 21.



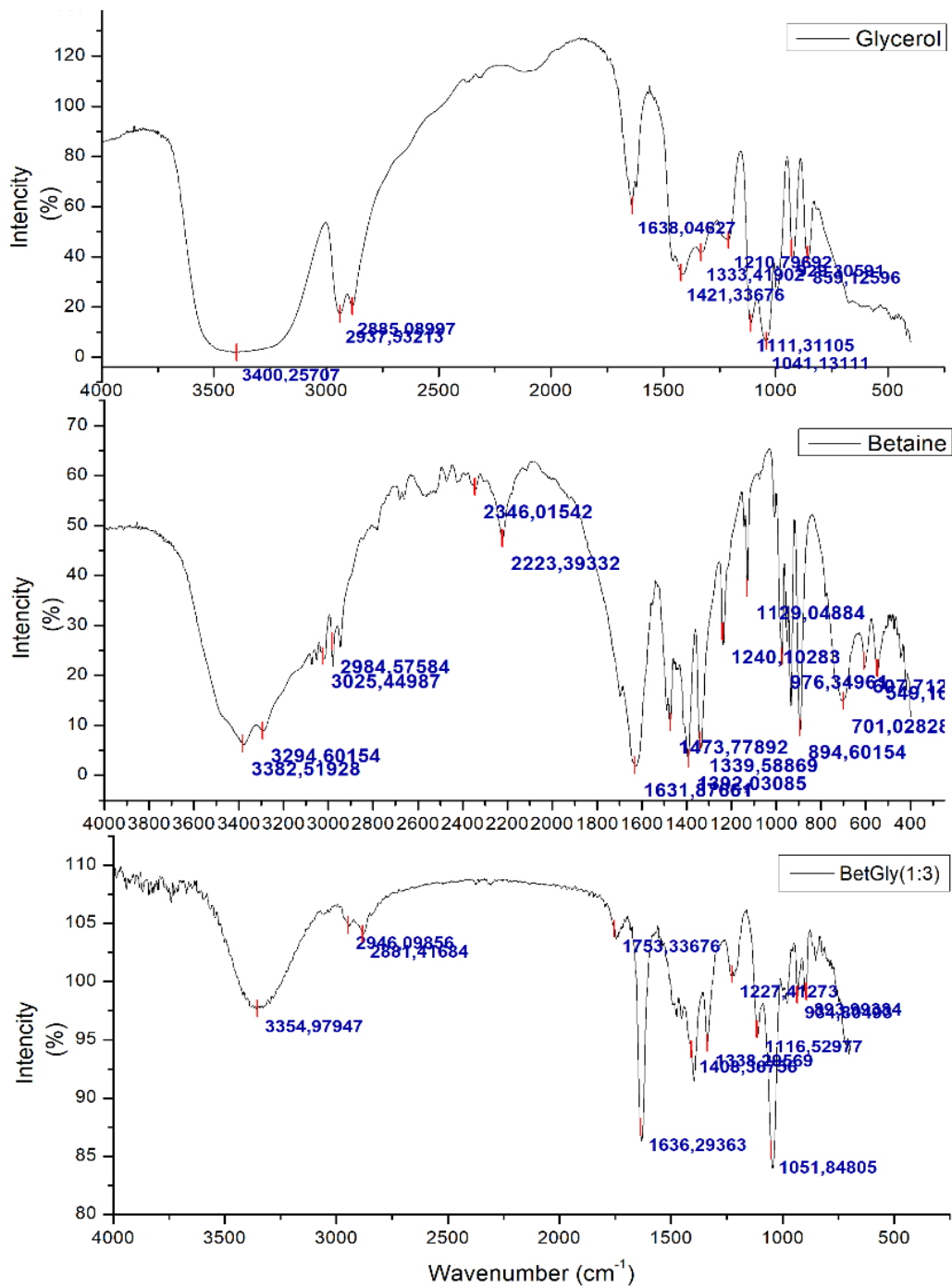
Σχήμα 21: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ Bet-Gly 1:3 (DMSO-d_6)

Αναλυτικότερα, στο φάσμα που απεικονίζεται στο Σχήμα 20, ξεκινώντας από τα υψηλότερα και κατευθυνόμενοι προς τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία, αρχικά στα 2.50 ppm, συναντάμε την κορυφή που αντιστοιχεί στον χρησιμοποιούμενο για τη λήψη του φάσματος δευτεριωμένο διαλύτη DMSO-d_6 . Στη συνέχεια, εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 3.13 ppm η οποία ολοκληρώνεται για 9 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πιο προστατευμένα πρωτόνια των μεθυλίων της βεταΐνης ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$). Ακολούθως, στα εύρη 3.26-3.30 ppm και 3.34-3.38 εμφανίζονται δυο πολλαπλές

κορυφές που ολοκληρώνονται για 6 πρωτόνια η καθεμιά τα οποία και αντιστοιχούν στις ομάδες των μεθυλενίων (-CH₂-) της γλυκερόλης. Στα 3.54 ppm, παρουσιάζεται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί σε αυτά του μεθυλίου της βεταΐνης ενώ στα 3.40-3.44 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια, αυτά του μεθανίου (-CH-) της γλυκερόλης. Τέλος, στα χαμηλότερα πεδία και πιο συγκεκριμένα στα 4.42 και 4.50 ppm συναντώνται δυο πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για 5 και για 2 πρωτόνια αντιστοίχως τα οποία μπορούν να αποδοθούν στις υδροξυλομάδες της γλυκερόλης.

3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR

Γενικά, η δόνηση τάσης ν-OH στο φάσμα υπερύθρου βρίσκεται μεταξύ των 3000 και 3500 cm⁻¹. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 21, η δόνηση τάσης ν-OH στη γλυκερόλη είναι στα 3400 cm⁻¹, ενώ μετατοπίζεται στα 3354 cm⁻¹ μετά τον σχηματισμό DES με την προσθήκη βεταΐνης. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στον δεσμό υδρογόνου (δ.Η) που δημιουργείται μεταξύ του HBD (Γλυκερόλη) και του HBA (Βεταΐνη) του DES, καθώς η συγκεκριμένη διαμοριακή αλληλεπίδραση εξασθενεί τη δόνηση τάσης ν-OH. Για τον ίδιο λόγο (δ.Η), η δόνηση τάσης ν-COO⁻ μετατοπίστηκε στο 1636 cm⁻¹ από τον σχηματισμό του NaDES Bet-Gly. Επιπλέον παρατηρείται ότι η κορυφή αυτή είναι πλέον πιο οξεία, ενώ συγκριτικά με την αντίστοιχη κορυφή που αναλογεί στο καρβονύλιο της βεταΐνης φαίνεται να είναι μεγαλύτερης έντασης. Σημειώνεται ότι η αλληλεπίδραση των δ.Η σχηματίζεται μεταξύ -COO⁻ στη βεταΐνη και μεταξύ -OH στη Γλυκερόλη. Το O⁻ στην ομάδα -COO⁻ έχει ισχυρή ηλεκτραρνητικότητα και όταν είναι κοντά στο θετικά φορτισμένο άτομο Η στο -OH πραγματοποιείται διαμοριακή αλληλεπίδραση που οδηγεί στον σχηματισμό ενός δ.Η, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μήκους κύματος της δόνησης τάσης της χαρακτηριστικής ομάδας.

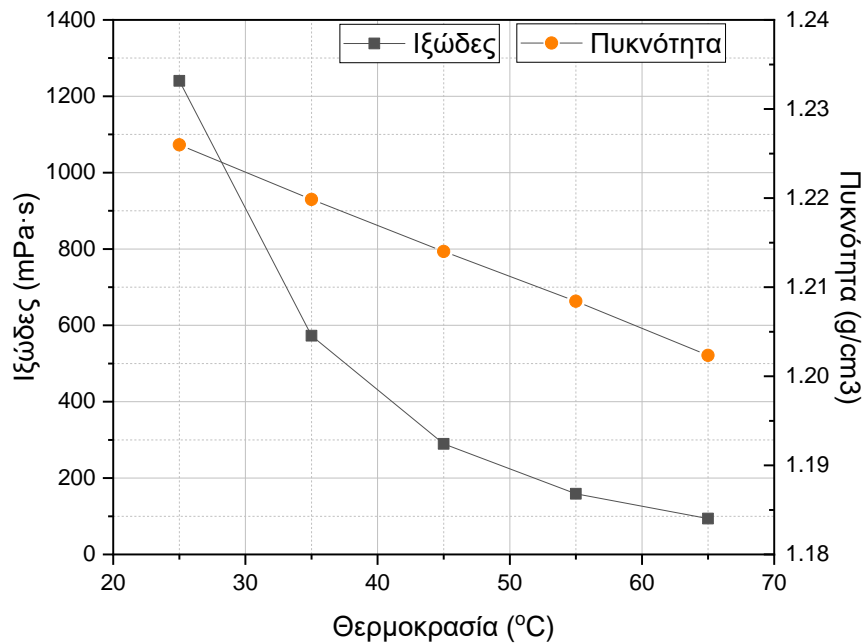


Σχήμα 22: Φάσμα FT-IR (ATR) του NaDES Bet-Gly 1:3

3.1.3 Μελέτη σημαντικών ιδιοτήτων

Μέσω συσκευής Karl Fischer το περιεχόμενο σε υγρασία του NaDES Βεταΐνη – Γλυκερόλης αναλογίας 1:3 υπολογίστηκε ίσο με 0,680% με συντελεστή τυπικής απόκλισης (STDEV = 0,011).

Επιπρόσθετα, ερευνήθηκε η συνάρτηση του ιξώδους και της πυκνότητας του NaDES με τη θερμοκρασία, και τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3, όπου παρατηρείται ότι: i) η πυκνότητα εξαρτάται με γραμμικό τρόπο από τη θερμοκρασία ii) το NaDES παρουσιάζει μη νευτωνική συμπεριφορά και το ιξώδες του μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας όπως είναι αναμενόμενο.



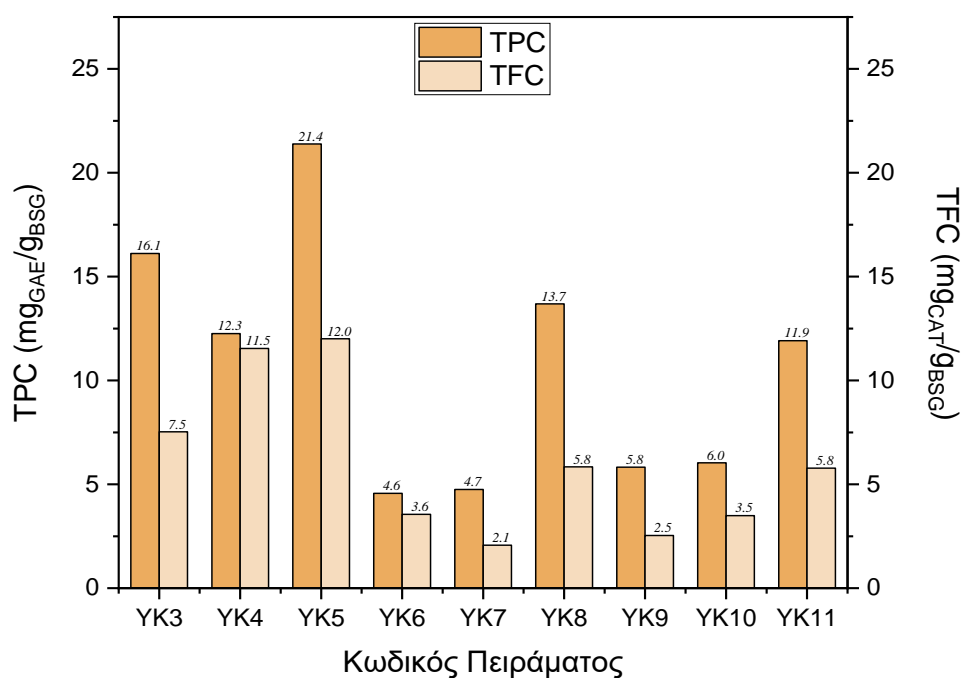
Διάγραμμα 3: Εξάρτηση της πυκνότητας και του ιξώδους από τη θερμοκρασία

Τέλος, σε ηλεκτρονικό πεχάμετρο μετρήθηκε το pH του NaDES και βρέθηκε ίσο με 7.2. Τόσο η τιμή αυτή του pH όσο και των παραπάνω μεγεθών είναι κρίσιμο να γνωρίζονται από τον πειραματιστή κατά τη χρήση του NaDES σε διεργασίες εκχύλισης.

3.2 Πειραματικός Σχεδιασμός

3.2.1 Προκαταρκτικά πειράματα

Τα προκαταρκτικά πειράματα αποτελούν πρώιμο και καθοριστικό στάδιο για τη διεξαγωγή του Πειραματικού Σχεδιασμού, μέσω των οποίων διερευνάται η συμπεριφορά του συστήματος και λαμβάνονται κάποια πρώτα στοιχεία ενδεικτικά της επίδρασης των υπό εξέταση παραμέτρων εκχύλισης στην απόδοση της διεργασίας. Τα 9 πειράματα που εκτελέστηκαν για τον σκοπό αυτόν, αξιολογήθηκαν ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή (Σχήμα 23), μεταβλητές δηλαδή που θα αποτελέσουν και τις αποκρίσεις στον ΠΣ.



Κωδικός Πειράματος	YK3	YK4	YK5	YK6	YK7	YK8	YK9	YK10	YK11
Χρόνος (min)	15	15	15	15	15	30	15	5	15
Ισχύς (%)	40%	40%	40%	20%	40%	40%	40%	40%	40%
Κοκκομετρία (mm)	>1	<1	>1	>1	>1	>1	<1	>1	>1
Α' ύλη:DES (mg/mL)	300:4	300:4	200:4	200:4	300:4	300:4	300:4	300:4	400:4
NaDES:H ₂ O	3:1	3:1	3:1	3:1	1:1	3:1	1:1	3:1	3:1

Σχήμα 23: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων και οι κωδικοί αυτών.

Αρχικά, επιλέχθηκαν να εξετασθούν ως προς την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης 5 παράμετροι: (i) η κοκκομετρία της πρώτης ύλης, (ii) ο χρόνος εκχύλισης, (iii) η ισχύς των υπερήχων, (iv) η αναλογία NaDES προς H₂O, (v) η αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη. Από τις εξεταζόμενες παραμέτρους από την πρώτη σειρά πειραμάτων συμπεραίνονται τα εξής:

- **Κοκκομετρία**

Όσον αφορά στην κοκκομετρία των BSG, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μικρή κοκκομετρία (<1 mm) και να παραμείνει σταθερή στα πειράματα του Πειραματικού Σχεδιασμού. Αυτό επιλέχθηκε σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, καθώς συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα **YK3** (TPC: 16.1 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 7.5 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK7** (TPC: 4.7 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 2.1 mg_{CAT}/g_{BSG}) με τα εκχυλίσματα **YK4** (TPC: 12.3 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 11.5 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK9** (TPC: 5.8 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 2.5 mg_{CAT}/g_{BSG}) αντίστοιχα, παρατηρείται ότι το εκχύλισμα μικρής κοκκομετρίας **YK4** υπερτερεί του **YK3** ως προς την τιμή του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC), αλλά υστερεί ως προς το του ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC) · βέβαια οι τιμές είναι σχετικά κοντινές. Από την άλλη όμως, όσον αφορά το δεύτερο πείραμα μικρής κοκκομετρίας, το εκχύλισμα **YK9**, είναι πλουσιότερο ως προς τα TPC και TFC του **YK7** και στα 2 αποτελέσματα-στόχους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές αναφορές όπου αναφέρεται πως η πρώτη ύλη μικρότερης κοκκομετρίας επιφέρει αποδοτικότερη εκχύλιση, λόγω της μεγαλύτερης δραστηκής επιφάνειας που διαθέτει, οδήγησε στην επιλογή της μικρότερης κοκκομετρίας (<1 mm).

- **Χρόνος εκχύλισης**

Όσον αφορά την παράμετρο του χρόνου παρατηρείται ότι μεταξύ των εκχυλισμάτων **YK3** (TPC: 16.1 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 7.5 mg_{CAT}/g_{BSG}), **YK8** (TPC: 13.7 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 5.84 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK10** (TPC: 6.0 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 3.5 mg_{CAT}/g_{BSG}), η εκχύλιση είναι πιο αποτελεσματική ως προς τα TPC και TFC αυξάνοντας τον χρόνο, που υποβάλλεται το δείγμα σε υπερηχητική ακτινοβολία, από τα 5 στα 15 min, ενώ σε υψηλότερο χρόνο (30 min) παρατηρείται μείωσή της. Αυτό συνεπάγεται ότι πράγματι υπάρχει βέλτιστος χρόνος εντός του μελετώμενου εύρους, ο οποίος πρέπει να αναζητηθεί κατά τον Πειραματικό Σχεδιασμό. Έτσι επιλέχθηκε για

ανώτατο όριο στον Πειραματικό Σχεδιασμό μια ελαφρώς χαμηλότερη τιμή όπως αυτή των 25 λεπτών.

- **Ισχύς**

Εξετάζοντας τα εκχυλίσματα **YK5** (TPC: 21.4 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 12.0 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK6** (TPC: 4.6 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 3.6 mg_{CAT}/g_{BSG}) παρατηρείται ότι με την αύξηση της ισχύος της ακτινοβολίας μπορούν να επιτευχθούν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα, και επομένως επιλέγεται να διευρυνθεί το όριο της παραμέτρου στον πειραματικό σχεδιασμό. Ωστόσο για λόγους που σχετίζονται με περιορισμούς του οργάνου, η μέγιστη ισχύς που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι τα 200 Hz, τα οποία ισοδυναμούν με το 50% της συνολικής ισχύος του οργάνου.

- **Αναλογία NaDES/H₂O**

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος, η προσθήκη νερού στους NaDES, μπορεί να βελτιώσει ορισμένες ιδιότητες του διαλυτικού συστήματος - όπως το ιξώδες - και κατ' επέκταση την απόδοση της διεργασίας της εκχύλισης, εξοικονομώντας παράλληλα και ποσότητα διαλύτη. Εντούτοις, από τα πειράματα **YK3** (TPC: 16.1 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 7.5 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK7** (TPC: 4.7 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 2.1 mg_{CAT}/g_{BSG}) παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη αναλογία NaDES:H₂O επιφέρει και βελτιωμένες τιμές TPC και TFC. Σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται πολύ σημαντική η εύρεση της βέλτιστης ποσότητας νερού που θα χρησιμοποιηθεί ώστε, αφενός το ιξώδες να μειώνεται και αφετέρου η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης να αυξάνεται.

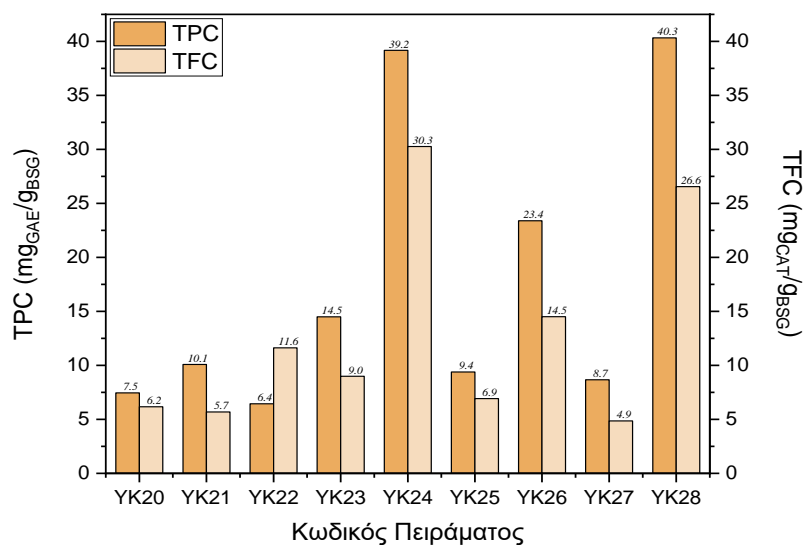
- **Αναλογία BSG/ NaDES**

Τέλος, η αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη είναι μια παράμετρος που πρέπει να μελετηθεί, όχι μόνο ως προς τη μεγιστοποίηση των μεταβλητών-στόχων (TPC, TFC), αλλά και ως προς τις διαχειριστικές συνθήκες που δημιουργούνται κατά την πειραματική διαδικασία. Συνάμα ενδείκνυται να εκτιμηθεί και ως παράγοντας κόστους της διεργασίας, καθώς πάντα πρέπει να συνυπολογίζεται ότι κύριος στόχος είναι η μέγιστη ανάκτηση εκχυλιζόμενων ενώσεων με την ελάχιστη δυνατή χρήση διαλύτη, για καθορισμένη ποσότητα πρώτης ύλης. Μελετώντας, τα εκχυλίσματα **YK5** (TPC: 21.4 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 12.0 mg_{CAT}/g_{BSG}), **YK3** (TPC: 16.1 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 7.5 mg_{CAT}/g_{BSG}) και **YK11** (TPC: 11.9 mg_{GAE}/g_{BSG} και TFC: 5.8 mg_{CAT}/g_{BSG}) - όπου οι

συνθήκες εκχύλισης είναι ίδιες και η μάζα των BSG μεταβάλλεται από 200 στα 300 και τα 400 mg αντιστοίχως - φαίνεται ότι υψηλότερες τιμές TPC και TFC επιτυγχάνονται σε μικρότερες αναλογίες πρώτης ύλης : διαλύτη. Έτσι, αξίζει να ερευνηθεί η συμπεριφορά του συστήματος σε ακόμη χαμηλότερες αναλογίες κατά τον προγραμματισμό του πειραματικού σχεδιασμού.

3.2.2 Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού

Με γνώμονα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκαν οι 4 μεταβλητές ελέγχου [(A) : χρόνος εκχύλισης, (B): ισχύς των υπερήχων, (C): αναλογία NaDES:H₂O στον διαλύτη, (D): αναλογία στερεής πρώτης ύλης προς διαλύτη] και τα όρια μελέτης αυτών, και ακολούθως καταστρώθηκε και διεξήχθηκε Πειραματικός Σχεδιασμός 9 πειραμάτων, τα οποία υποδείχθηκαν από τη μέθοδο Taguchi, μέσω του στατιστικού προγράμματος *Minitab*, και τα αποτελέσματα ως προς τις δύο επιθυμητές αποκρίσεις (TPC, TFC) παρουσιάζονται στο Σχήμα 24:



Κωδικός Πειράματος	YK20	YK21	YK22	YK23	YK24	YK25	YK26	YK27	YK28
Χρόνος (min)	5	5	5	15	15	15	25	25	25
Ισχύς (%)	20%	35%	50%	20%	35%	50%	20%	35%	50%
Α' ύλη:DES (mg/mL)	100:4	250:4	400:4	400:4	100:4	250:4	250:4	400:4	100:4
NaDES:H ₂ O	50:50	70:30	90:10	70:30	90:10	50:50	90:10	50:50	70:30

Σχήμα 24: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων στα 9 εκχυλίσματα του Πειραματικού Σχεδιασμού και οι κωδικοί αυτών.

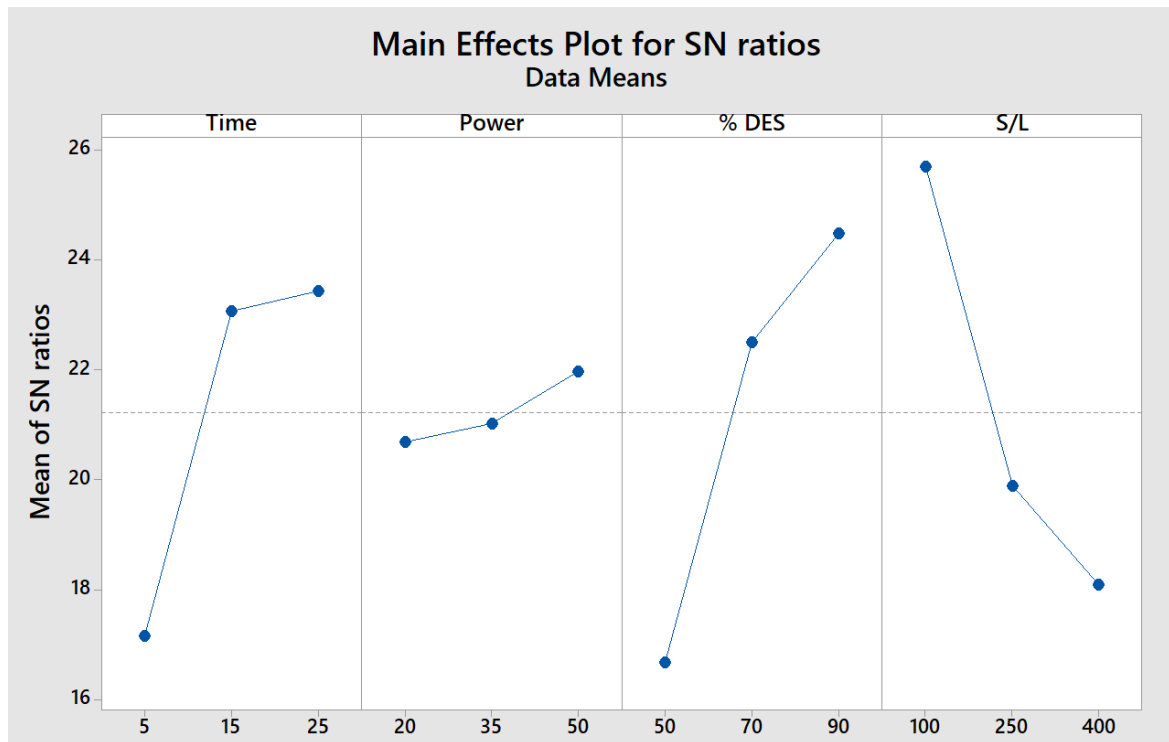
Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου Taguchi, η οποία στηρίζεται στον υπολογισμό του λόγου σήματος/θορύβου (S/N) και δεδομένου ότι σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βέλτιστης Κύριας Επίδρασης (Main Effect) της κάθε παραμέτρου στο σύστημα που θα οδηγήσει στην ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των μεταβλητών-στόχων (TPC, TFC) (the larger-the better analysis), ο λόγος S/N εκφράζεται ως εξής:

$$\left(\frac{S}{N}\right)_c = -10 \cdot \log\left(\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{1}{|C|_i^2}\right) \quad (1)$$

Όπου

- C=TPC, TFC
- n = αριθμός πειραμάτων = 9

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα γραφήματα S/N που προέκυψαν από το λογισμικό Minitab για τις 4 μεταβλητές ελέγχου και για τα 3



Διάγραμμα 4: Λόγοι S/N που προέκυψαν κατά τη μελέτη της επίδρασης των μεταβλητών ελέγχου στην ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.

επίπεδα (Levels) τιμών, εφαρμόζοντας ως απόκριση τις 2 επιλεγμένες αποκρίσεις, TPC και TFC:

Πίνακας 12: Πίνακας αποκρίσεων των λόγων S/N για ανάλυση “Large is better”

Level	Time (min)	Power (%)	% DES	S/L
1	17.15	20.68	16.67	25.69
2	23.07	21.02	22.50	19.89
3	23.44	21.96	24.48	18.08
Delta	6.28	1.28	7.81	7.60
Rank	3	4	1	2

Για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος, δηλαδή την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των τιμών των TPC και TFC, είναι σαφές ότι πρέπει να γίνει αντιληπτός ο βαθμός επιρροής των μεταβλητών ελέγχου στο σύστημα της διεργασίας της εκχύλισης. Δεδομένου ότι υψηλές τιμές S/N υποδηλώνουν και σημαντική επίδραση (Πίνακας 12), παρατηρείται ότι:

- Ο **χρόνος εκχύλισης (time)** είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη διεργασία (Delta=6.28), ιδίως σε μεταβολές που αφορούν αύξηση του από μικρές τιμές (Level 1: 5 λεπτά) σε μεσαίες (Level 2: 15 λεπτά). Περαιτέρω αύξηση του χρόνου από το μεσαίο επίπεδο (Middle Level) και άνω φαίνεται να μην επηρεάζουν δραματικά την απόδοση της εκχύλισης.
- Η επιβαλλόμενη **ισχύς (Power)** ακτινοβολήσης υπερηχητικών κυμάτων, εκφρασμένη ως ποσοστό (%) της συνολικής ισχύος του οργάνου, αποτελεί την παράμετρο, που συγκριτικά με τις υπόλοιπες επιλεγμένες μεταβλητές ελέγχου έχει τη μικρότερη μεταβολή του λόγου S/N (Delta=1.28, Rank = 4). Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από χαμηλά ποσοστά (20%, 80 Watt), ο λόγος S/N αλλάζει ελάχιστα προσεγγίζοντας τιμές ισχύος (35%, 140 Watt) μεσαίου επιπέδου. Επιπλέον αύξηση της ισχύος μέχρι και το άνω όριο (Maximum Level: 50%, 200 Watt) του επιλεγμένου εύρους τιμών, το οποίο ταυτίζεται και με το άνω όριο εφαρμογής ισχύος του οργάνου, φαίνεται να επιδρά στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών και μάλιστα με θετικό τρόπο.
- Η ποσότητα DES, ως ποσοστό του διαλύτη (**%DES**) στο χρησιμοποιούμενο για την εκχύλιση σύστημα **DES:H₂O**, επιβεβαιώνεται και από τους λόγους S/N ότι είναι

ένας παράγοντας που επιδρά έντονα στη συμπεριφορά του συστήματος (Delta=7.81), καθώς τόσο η αύξηση της αναλογίας από το ελάχιστο επίπεδο (Minimum Level: 50:50) στο μεσαίο (70:30), όσο και από το μεσαίο στο μέγιστο (90:10), βελτιώνει αισθητά την ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Επίσης, από τον Πίνακα 12 συμπεραίνεται ότι το ποσοστό χρήσης του NaDES, είναι ο παράγοντας με τη μεγαλύτερη επιρροή (Rank = 1).

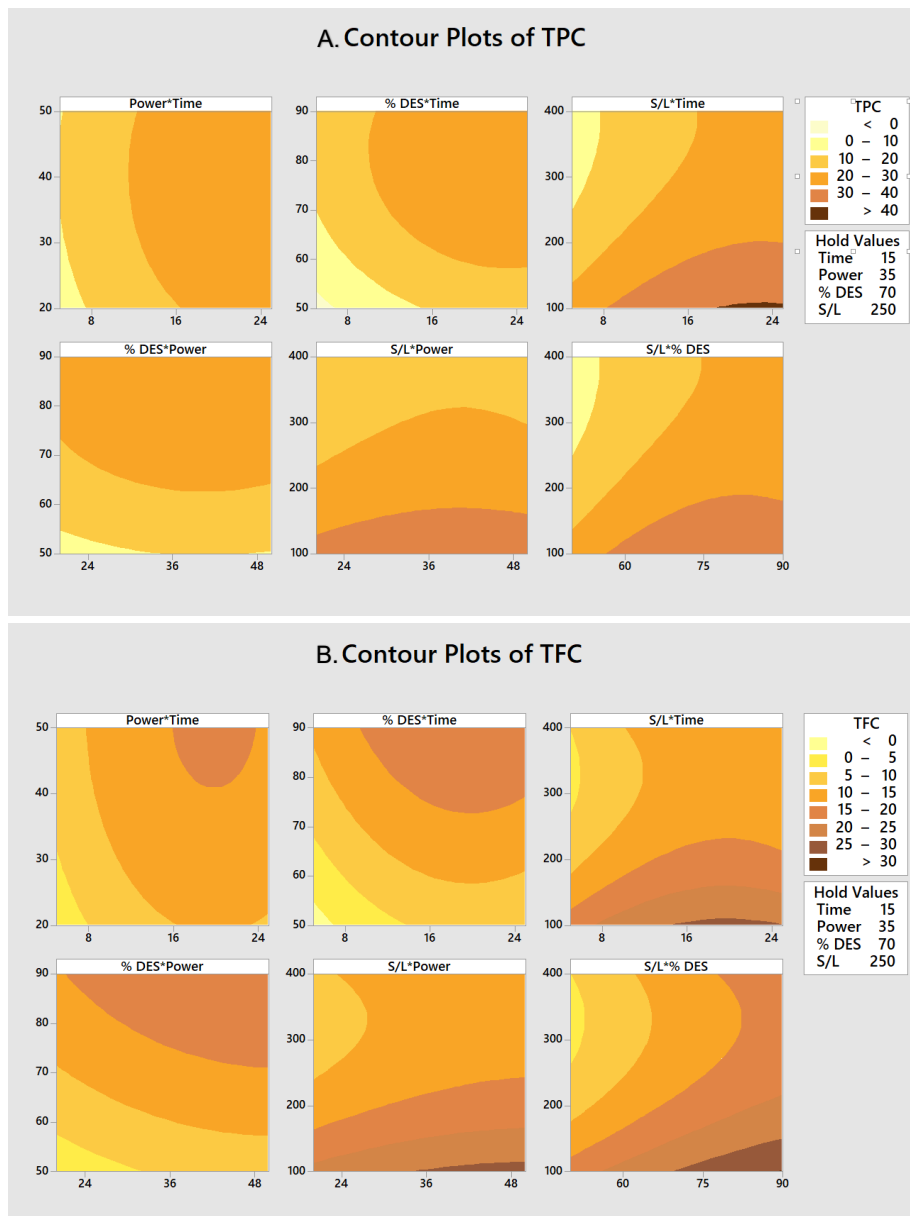
- Ο ρόλος της **αναλογίας στερεής πρώτης ύλης προς διαλύτη** (Solid to Liquid ratio: **S/L**) φαίνεται να είναι εξίσου σημαντικός παράγοντας για την απόδοση της εκχύλισης (Delta=7.60). Ωστόσο, αντίθετα με την παραπάνω παράμετρο, εδώ είναι η μικρότερη αναλογία S/L (Minimum Level: 100 mg BSG ανά 4 ml διαλύτη), αυτή που επιφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τις τιμές των αποκρίσεων TFC και TPC.

Σχόλια:

- Σημειώνεται ότι για πρακτικούς λόγους που σχετίζονται με την εφαρμογή του στατιστικού μοντέλου στο λογισμικό *Minitab*, οι εισαχθείσες τιμές στην παράμετρο **S/L** (100, 250, 400) αφορούν την ποσότητα της πρώτης ύλης (σε mg) που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, ανά σταθερό κάθε φορά όγκο διαλύτη (4 mL).
- Η μεγάλη - και ίδιου προσήμου στα επιμέρους διαστήματα μεταξύ των επιπέδων - κλίση που παρατηρείται στα διαγράμματα των λόγων S/N των παραμέτρων **%DES** και **S/L**, υποδηλώνει ότι το εύρος των επιπέδων του Πειραματικού Σχεδιασμού, και συγκεκριμένα το άνω και κάτω όριο αντίστοιχα, αξίζει να διευρυνθεί. Βέβαια, όπως έχει αναφερθεί και στην προηγούμενη ενότητα, η επιλογή ακόμα πιο «ακραίων» τιμών και στις 2 παραμέτρους χρειάζεται να εξετασθεί και από άλλες σκοπιές, όπως αυτήν της διαχείρισης και της οικονομικής βιωσιμότητας της διεργασίας. Παραδείγματος χάρη, η επιλογή διαλύτη με 100% DES πιθανό να δημιουργήσει διαχειριστικές δυσκολίες λόγω του ιξώδους του διαλύτη, ενώ η επιλογή να εκχυλιστεί ποσότητα πρώτης ύλης BSG ακόμα μικρότερη των 100 mg, ίσως να κρίνει τη διεργασία οικονομικά ασύμφορη.

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος χρήζει και η μελέτη της συνδυασμένης επίδρασης των παραπάνω παραγόντων κατά την εκχύλιση BSG με χρήση NaDES και με στόχο τη μέγιστη δυνατή ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών συστατικών. Παρακάτω παρατίθενται οι ισοϋψείς καμπύλες που έχουν κατασκευαστεί από το λογισμικό *Minitab* για την επιρροή που ασκούν στη διεργασία οι παρακάτω συνδυασμοί παραμέτρων:

- * $\text{Power} \cdot \text{Time}$
- * $\% \text{DES} \cdot \text{Time}$
- * $\text{S/L} \cdot \text{Time}$
- * $\% \text{DES} \cdot \text{Power}$
- * $\text{S/L} \cdot \text{Power}$
- * $\text{S/L} \cdot \% \text{DES}$
- * $\text{Power} \cdot \text{S/L}$



Σχήμα 25: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του Πειραματικού Σχεδιασμού κατά την εκχύλιση: Α. φαινολικών ενώσεων και Β. φλαβονοειδών.

Συσχετίσεις των σημαντικότερων για την εκχύλιση μεταβλητών ως προς την απόκριση TPC (Σχήμα 25 A)

Αρχικά, απο το διάγραμμα συσχέτισης των όρων «**Power·Time**» παρατηρείται πως από τα 16 έως τα 25 min εκχύλισης, η παράμετρος της ισχύος των υπερήχων δεν επιδρά σημαντικά στις τιμές της απόκρισης TPC. Ομοίως, κάτι αντίστοιχο παρατηρείται στους χρόνος μεταξύ 8 και 12min. Από το διάγραμμα αυτό συμπεραίνεται πως η ισχύς δεν επιδρά τόσο σημαντικά όσο η παράμετρος του χρόνου, κάτι που είχε υποδειχθεί και από τα Rank που προέκυψαν κατά τη μελέτη του πειραματικού σχεδιασμού (Ισχύς: Rank 4, χρόνος: Rank=3, βλ. Πίνακα 12) Παρόμοια τάση ακολουθείται και στη μελέτη συσχετίσεων «**%DES · Power**», όπου φαίνεται πως η ισχύς δεν επιδρά σημαντικά ως παράμετρος της διεργασίας για τα πειράματα εκχύλισης με ποσοστά DES από περίπου 55 έως 65% NaDES και στα ποσοστά από 65% έως 90% NaDES αντιστοίχως.

Στις συσχετίσεις «**%DES · Time**» και «**%DES · Power**», όπως συμβαίνει και στην προαναφερθείσα συσχέτιση «**Power·Time**», παρατηρείται ότι η διαβάθμισης των τιμών TPC δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις επιμέρους μεταβολές των μεμονωμένων παραμέτρων **Power, Time, %DES**, γεγονός που επαληθεύει και τα πορίσματα της ανάλυσης των λόγων S/N των μεμονωμένων παραμέτρων «Power» (Ισχύς) και «Time» (Χρόνος εκχύλισης) (βλ. Πίνακα 12). Αντιθέτως, οι συσχετίσεις «**S/L · Power**», «**S/L · %DES**» και «**S/L·Time**» μπορούν να λάβουν τιμές από όλα τα πιθανά εύρη και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην κοινή παρουσία του όρου «S/L» (S/L: Rank 2).

Αναλυτικότερα, για τον συνδυασμό, «**%DES · Time**», επισημαίνεται ότι: i) ικανοποιητικότερα αποτελέσματα TPC (έως 30 mg_{GAE}/g_{BSC}) είναι εφικτό να επιτευχθούν επιλέγοντας τιμές μεσαίου επιπέδου (Level 2) για τις 2 παραμέτρους (π.χ. %DES = 70% & Time=15 min) ii) ίδια αποτελέσματα μπορούν να επέλθουν επιλέγοντας μια σχετικά υψηλή τιμή για τη μία παράμετρο, διατηρώντας σε σχετικά χαμηλά επίπεδα την άλλη (π.χ. %DES=80% & Time = 10 min ή Time=22 min & %DES=58%). Οι διαπιστώσεις αυτές έχουν λογική συνάφεια με τα πορίσματα της μεθόδου Taguchi, αφού σύμφωνα με τον Πίνακα 12 πρόκειται για 2 παραμέτρους που μπορούν να επηρεάσουν ξεχωριστά την απόδοση της διεργασίας (%DES: Rank 1 – Time: Rank 3). ο συνδυασμός «**%DES · Power**» χαρακτηρίζεται από μεγάλη βαρύτητα

στην παράμετρο «%DES», αφού μεταβολές της ισχύς (Power) για συγκεκριμένη αναλογία DES:H₂O αφήνουν τα αποτελέσματα πρακτικά ανεπηρέαστα.

Παρατηρώντας τις ισοϋψείς καμπύλες του διαγράμματος του όρου «**S/L · Power**», η επίδρασή του εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από την παρουσία του «S/L», αφού μόνο σε υψηλές τιμές «S/L» η μεταβολή της ισχύος μπορεί να διαφοροποιήσει κάπως το αποτέλεσμα. Παρομοίως, η επίδραση του συνδυασμού «**S/L · %DES**» στις τιμές TPC οφείλεται κατά βάση στον όρο «S/L», μόνο που εδώ η παράμετρος «%DES» παίζει ελαφρώς σημαντικότερο ρόλο συγκριτικά με την παράμετρος της Ισχύος (Power) του προηγούμενου συνδυασμού, κυρίως στην επίτευξη αποτελεσμάτων της τάξης των 20-30 mg_{GAE}/g_{BSG}. Επιπλέον, σημειώνεται ότι πολύ χαμηλές τιμές «%DES» (50-55%) περιορίζουν σημαντικά τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης, ενώ πολύ υψηλές τιμές που προσεγγίζουν το άνω επίπεδο (Level 3: 90%) δεν επιτρέπουν τη λήψη των μέγιστων δυνατών αποτελεσμάτων.

Τέλος, μέσω του Διαγράμματος συσχέτισεως των όρων «**S/L**» και «**Time**» παρατηρείται πως υψηλότερες τιμές περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα (TPC > 40 mg_{GAE}/g_{BSG}) παρατηρούνται πειραματικά σε πολύ χαμηλές τιμές S/L – κοντά στο κατώτατο όριο – και μάλιστα σε συνδυασμό με μεγάλους χρόνους εκχύλισης (Time > 19 min).

Συσχετίσεις των σημαντικότερων για την εκχύλιση μεταβλητών ως προς την απόκριση TFC (Σχήμα 25 B)

Τα Διαγράμματα B του Σχήματος 22 μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: i) σε συνδυασμούς παραμέτρων που η επίδρασή τους στη διεργασία την εκχύλισης είναι ικανή να επιφέρει πολύ υψηλές αποκρίσεις TFC (TFC > 20 mg_{CAT}/g_{BSG}) και ii) σε συνδυασμούς που η επίδρασή τους στη διεργασία της εκχύλισης δεν μπορεί να πετύχει αυτόν τον στόχο (TFC < 20 mg_{CAT}/g_{BSG}).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι συνδυασμοί «**S/L · Time**», «**S/L · Power**» και «**S/L · %DES**». Όπως και στην παραπάνω ανάλυση, διακρίνεται ότι και τα τρία ζεύγη έχουν ως κοινό παρονομαστή την παράμετρο S/L (Rank 2), γεγονός που υποδηλώνει και τη βαρύτητα της. Μελετώντας αρχικά το Διάγραμμα του όρου «S/L·Time» παρατηρείται ότι για να προκύψουν υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών στο εκχύλισμα (TFC > 20 mg_{CAT}/g_{BSG}) είναι πολύ σημαντική η επιλογή

του λόγου «S/L», ο οποίος πρέπει μάλιστα να είναι και μικρός (πρακτικά κάτω από 200mg_{B_{SG}}/4 mL διαλύτη). Ωστόσο, για τη μετάβαση στις υψηλότερες δυνατές συγκεντρώσεις, καθοριστική είναι η επιλογή του κατάλληλου χρόνου εκχύλισης (Time), με τον βέλτιστο να φαίνεται να είναι στα 20 λεπτά. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και η επίδραση του συνδυασμού «S/L · Power», καθώς ως γενική τάση παρατηρείται ότι υψηλές τιμές TFC (TFC > 20 mg_{CAT}/g_{B_{SG}}) επιτυγχάνονται όταν η τιμή του λόγου «S/L» κυμαίνεται σε τιμές κάτω των 240 mg_{B_{SG}} ανά 4 mL διαλύτη. Άξιο σχολιασμού όμως είναι ότι με την αύξηση της ισχύος, για να διατηρηθεί η απόκριση TFC σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών (π.χ. 20-25 mg_{CAT}/g_{B_{SG}}), ο λόγος «S/L» πρέπει να αυξηθεί κι αυτός (αντίστοιχα τιμές κοντά στα 100 mg_{B_{SG}}). Η συσχέτιση αυτή πιθανώς να συνεπάγεται ότι η τοπική αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διεξαγωγή των υπερήχων μπορεί να επιφέρει αποτελέσματα αντίθετα από τα επιθυμητά από ένα σημείο και έπειτα. Ολοκληρώνοντας την πρώτη κατηγορία συνδυασμών, οι παράμετροι «S/L» και «%DES», οι οποίοι διαθέτουν και τις υψηλότερες τιμές Delta από του λόγους S/N (βλ. Πίνακα 12), αλληλεξαρτώνται με γραμμικώς ανάλογο τρόπο κατά τον συνδυασμό «S/L · %DES», όταν πρόκειται για εκχυλίσεις υψηλών αποδόσεων (TFC > 25 mg_{CAT}/g_{B_{SG}}).

Ωστόσο για μικρότερες συγκεντρώσεις ισοδύναμων κατεχίνης στο εκχύλισμα, παρουσιάζεται το εξής ενδιαφέρον παράδοξο: ενώ η αύξηση του «S/L» απαιτεί ανάλογη αύξηση «%DES» προκειμένου να διατηρηθεί η απόδοση της διεργασίας ως προς το TFC σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, περαιτέρω αύξηση του «S/L» επιτρέπει την εξοικονόμηση ποσότητας DES. Πιο αναλυτικά, έστω ότι ο στόχος είναι η ανάκτηση φλαβονοειδών, η οποία επιθυμείται να ισοδυναμεί με 20-25 mg_{CAT}/g_{B_{SG}}. Ο στόχος αυτό μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, με χρήση 330 mg_{B_{SG}} ανά 4 mL διαλύτη, που θα περιέχει περίπου 82% DES. Αν τώρα επιθυμείται να επιλεχθεί μεγαλύτερη αναλογία S/L (π.χ. 400 mg_{B_{SG}}/4 mL διαλύτη), ο πειραματιστής δε χρειάζεται να παρασκευάσει διαλύτη με %DES μεγαλύτερο του 82% (που πιθανώς να ξεπερνάει και το ανώτατο όριο της συγκεκριμένης παραμέτρου, το 90%), αλλά μπορεί να καταφέρει το ίδιο αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας διαλύτη ακόμα μικρότερης περιεκτικότητας σε DES (%DES ≈ 76%).

Όσον αφορά τη δεύτερη κατηγορία συνδυασμών («**Power · Time**», «**%DES · Time**», «**%DES · Power**»), σημειώνεται ότι ο όρος «Power · Time», ο οποίος χαρακτηρίζεται από ένα πολύ περιορισμένο εύρος συνδυασμών που μπορούν να

αποφέρουν την κατά δύναμιν υψηλότερη τιμή TFC (20 mg_{CAT}/g_{BSG}). Άλλωστε πρόκειται για τους 2 όρους με τη χαμηλότερη επίδραση στην απόδοση του συστήματος (Power: Rank 4, Time: Rank 3). Σχετικά με τον όρο «%DES·Time», το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι για σχετικά υψηλά ποσοστά DES στον διαλύτη (%DES > 75%) δίνεται η δυνατότητα επιλογής χρόνου μέσα από ένα μεγάλο εύρος τιμών (Time = 10-25 min), διάστημα στο οποίο μπορούν να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά για τη συγκεκριμένη επίδραση αποτελέσματα, αν επιλεχθούν οι κατάλληλοι συνδυασμοί (π.χ. %DES = 90% και Time = 10 min ή %DES = 75% και Time = 20 min). Τέλος, για τον όρο «%DES·Power» φαίνεται ότι η αναλογία DES:H₂O αποτελεί τον κυρίαρχο παράγοντα επίδρασης στο παρόν ζεύγος, η οποία όσο αυξάνεται τόσο βελτιώνεται και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Επισημαίνεται όμως ότι αν επιθυμείται η ανάκτηση φλαβονοειδών σε ένα συγκεκριμένο εύρος ισοδύναμων συγκεντρώσεων κατεχίνης (mg_{CAT}/g_{BSG}) με ελάττωση του %DES, τότε απαραίτητη είναι η ανάλογη αύξηση της ισχύος των υπερήχων.

3.2.3 Βελτιστοποίηση διεργασίας & Επιβεβαίωση Μοντέλου

Από την επεξεργασία των δεδομένων στο *Minitab*, η σχέση των υπό εξέταση παραγόντων (Factors: A,B,C,D) και των συνεχών αποκρίσεων (Continuous Responses: TPC, TFC) μπορεί να περιγραφεί με την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, προβλέποντας ουσιαστικά την επίδραση των παραμέτρων (predictors) στις αποκρίσεις, καθώς και τη βαρύτητα αυτής μέσω πολλαπλής παλινδρόμησης, εφαρμόζοντας την επιλογή «Fit Regression Model» του λογισμικού. Έτσι, το θεωρητικό μοντέλο της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης των BSG με χρήση NaDES Bet-Gly 1:3 και εφαρμογή Πειραματικού Σχεδιασμού L₉(3⁴) κατά τη μέθοδο Taguchi με τελικό στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της ανάκτησης φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, μπορεί να περιγραφεί από τις παρακάτω εξισώσεις (R² = 1):

- Θεωρητικό Μοντέλο πρόβλεψης ολικού περιεχομένου φαινολικών συστατικών:

$$\begin{aligned}
 TPC = & -84.63 + 2.295 \cdot \mathbf{Time} + 0.8638 \mathbf{Power} + 2.422 \cdot \%DES - 0.1799 \cdot S/L \\
 & - 0.04960 \cdot \mathbf{Time} \cdot \mathbf{Time} - 0.01062 \mathbf{Power} \cdot \mathbf{Power} \\
 & - 0.01471 \%DES \cdot \%DES + 0.000228 S/L \cdot S/L
 \end{aligned} \tag{1}$$

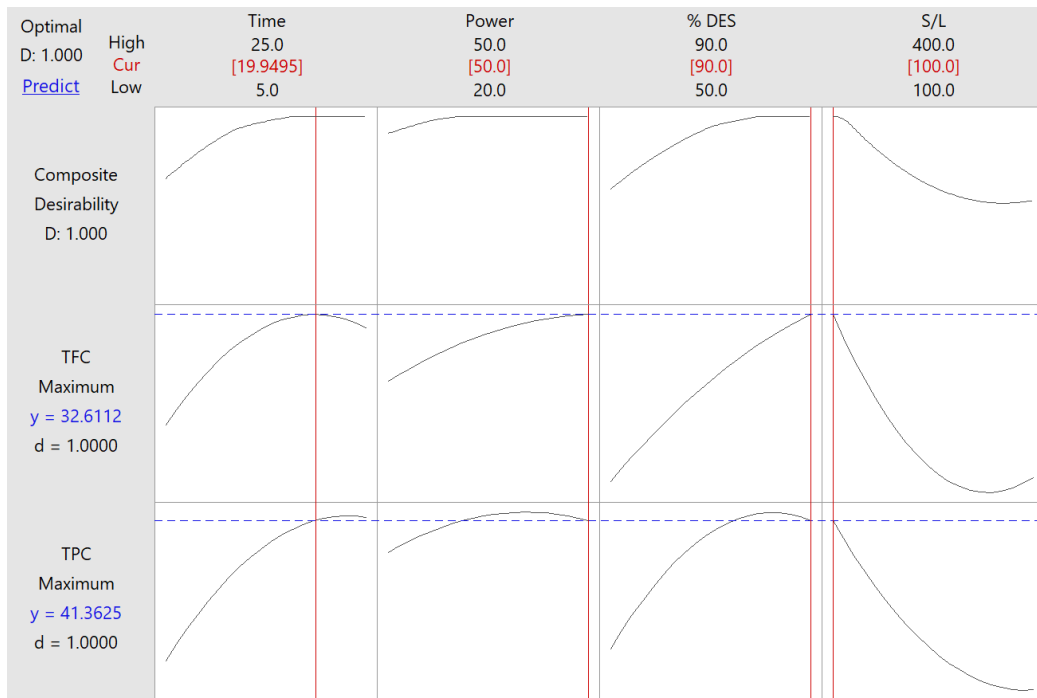
- Θεωρητικό Μοντέλο πρόβλεψης ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών συστατικών:

$$\begin{aligned}
 TFC = & -25.92 + 1.523 \cdot \mathbf{Time} + 0.5277 \cdot \mathbf{Power} + 0.7930 \%DES - 0.1685 \mathbf{S/L} \\
 & - 0.03830 \mathbf{Time} \cdot \mathbf{Time} - 0.005089 \cdot \mathbf{Power} \cdot \mathbf{Power} \\
 & - 0.003375 \%DES \cdot \%DES + 0.000254 \mathbf{S/L} \cdot \mathbf{S/L}
 \end{aligned} \tag{2}$$

Όπου:

- * TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών, εκφρασμένο σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος / g ξηρών BSG.
- * TFC: Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών, εκφρασμένο σε ισοδύναμα mg κατεχίνης / g ξηρών BSG.
- * Time: Η διάρκεια εκχύλισης, σε λεπτά (min).
- * Power: Η ισχύς των υπερήχων εκφρασμένη ως ποσοστό της συνολικής ισχύος του οργάνου (%).
- * %DES: Η περιεκτικότητα του διαλύτη Bet-Gly 1:3 – H₂O σε DES, εκφρασμένη σε ποσοστό (%)
- * S/L: Η αναλογία μάζας στερεής πρώτης ύλης / όγκο χρησιμοποιούμενου διαλύτη (w/v), εκφρασμένη ως προς mg ξηρών BSG για σταθερή ποσότητα διαλύτη, ίση με 4 mL.

Επιδιώκοντας την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο παραπάνω αποκρίσεων (the larger the better), επιλέγεται στο λογισμικό *Minitab* η εντολή «Response Optimizer», μέσω της οποίας προκύπτει το παρακάτω Σχήμα «Βέλτιστων Διαγραμμάτων» (Optimization Plots):



Σχήμα 26: Διαγράμματα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την αριστοποίηση της απόδοσης της διεργασίας ως προς τις μεταβλητές TPC και TFC.

Από τα διαγράμματα βελτιστοποίησης που αφορούν τη χρονική διάρκεια της εκχύλισης, ως γενικότερη παρατήρηση, προκύπτει ότι η αύξηση του χρόνου βελτιώνει τις τιμές των TFC και TPC. Ειδικότερα, για την πρώτη μεταβλητή (TFC) διακρίνεται μια κρίσιμη χρονική στιγμή (Time = 19.9 min) από την οποία και έπειτα η τιμή της φθίνει. Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή δε φαίνεται να επηρεάζει την τιμή TPC του εκχυλίσματος, αφού φαίνεται να πιάνει μέγιστο πλατό λίγο μετά από αυτήν (Time = 22 min). Βέβαια, λαμβάνοντας υπόψιν και τα αποτελέσματα της πρώτης σειράς πειραμάτων, είναι πιθανό να μην υφίσταται πλατό και η τιμή του TPC να μειώνεται σε ακόμα μεγαλύτερους χρόνους (π.χ. 30 λεπτά). Σύμφωνα με τα παραπάνω η υπολογιζόμενη βέλτιστη τιμή χρόνου εκχύλισης προκύπτει ίση με **19.9 λεπτά**.

Σχετικά με την παράμετρο της ισχύος των υπερήχων, η βέλτιστη τιμή ταυτίζεται με το ανώτατο όριο (Maximum Level). Στο αντίστοιχο διάγραμμα για το TFC, εντοπίζεται μια πιθανή περίπτωση επίτευξης ακόμα καλύτερων αποτελεσμάτων με περαιτέρω αύξηση της ισχύος. Από την άλλη, στο διάγραμμα του TPC υπάρχει μια περιοχή που μπορεί να δώσει βελτιωμένα αποτελέσματα για τιμές ισχύος μικρότερες της οριακής τιμής. Από εδώ συμπεραίνεται ότι αν επιθυμείται μόνο η βελτιστοποίηση

της παραμέτρου TPC, η εφαρμογή 160 W (40%) ισχύος κρίνεται ιδανικότερη. Ωστόσο, η βέλτιστη τιμή ισχύος στην παρούσα μελέτη λαμβάνεται ίση με **50%**, καθώς επιθυμείται ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο μεταβλητών-στόχων.

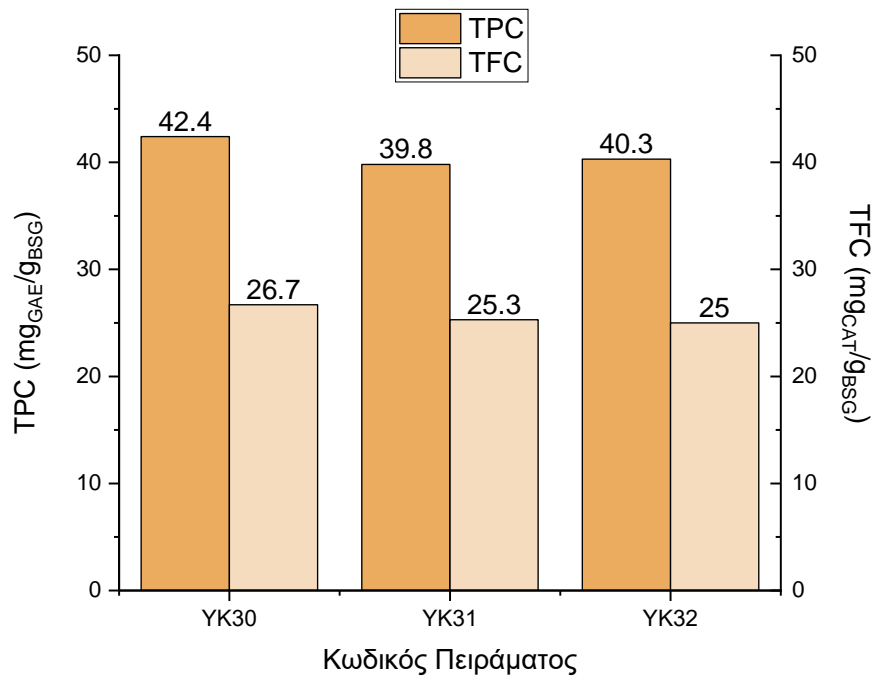
Η λήψη ακραίας τιμής από το εύρος του Πειραματικού Σχεδιασμού ως βέλτιστη συνθήκη προκύπτει και κατά την ανάλυση των υπόλοιπων δύο παραμέτρων: %DES και S/L. Αντίστοιχα με τον παραπάνω σχολιασμό, σε περίπτωση που στόχος ήταν η μεγιστοποίηση της τιμής του TPC, διακρίνεται διάστημα τιμών στο Σχήμα 26 (κοντά στο 80%), το οποίο τη μέγιστη δυνατή για το σύστημα τιμή TPC. Όμως, επειδή χρήση διαλύτη με αυτήν την περιεκτικότητα σε DES επιδρά αρνητικά στην εκχύλιση φλαβονοειδών συστατικών, η **αναλογία 90% Bet-Gly - 10% H₂O** στο διαλυτικό μέσο, επιλέγεται ως βέλτιστη. Τέλος, αναφορικά με τον λόγο S/L, είναι ξεκάθαρο ότι και για τις δύο μεταβλητές-στόχους βέλτιστα αποτελέσματα επέρχονται με χρήση της ελάχιστης δυνατής ποσότητας πρώτης ύλης ανά συγκεκριμένο όγκο διαλύτη, Συνεπώς, για τον τρέχοντα Πειραματικό Σχεδιασμό η ελάχιστη τιμή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι **100 mg_{BSG}**.

Οι βέλτιστες τιμές που προέκυψαν από την ανάλυση παλινδρόμησης και για τις 4 παραμέτρους παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 13 . Επιπρόσθετα, για εφαρμογή αυτού του βέλτιστου συνδυασμού συνθηκών, το λογισμικό προβλέπει τις αντίστοιχες βέλτιστες τιμές των αποκρίσεων TPC, TFC, οι οποίες παρατίθενται στις δυο τελευταίες στήλες του Πίνακα 13:

Πίνακας 13: Εξαγόμενες από το θεωρητικό μοντέλο βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης BSG με χρήση υπερήχων και διαλύτη NaDES-H₂O, για μέγιστη ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.

	Χρόνος (min)	Ισχύς (%)	%DES (%)	S/L (mg _{BSG})	TPC (θεωρητικό) (mg _{GAE} /g _{BSG})	TFC (θεωρητικό) (mg _{CAT} /g _{BSG})
Βέλτιστες Συνθήκες	19.9	50	90	100	41.4	32.6

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρόβλεψη του θεωρητικού/στατιστικού μοντέλου, διεξήχθη τριπλό πείραμα (ΥΚ30, ΥΚ31, ΥΚ32) με τις συνθήκες που υποδεικνύει ο Πίνακας 13. Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν εξετάστηκαν ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά, με τα αποτελέσματα να αποτυπώνονται στο Διάγραμμα:



Διάγραμμα 5: Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) ενώσεων στα 3 εκχυλίσματα «βέλτιστων συνθηκών» και οι κωδικοί αυτών.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα πειραματικά αποτελέσματα για την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών που υπέδειξε ο Πειραματικός Σχεδιασμός:

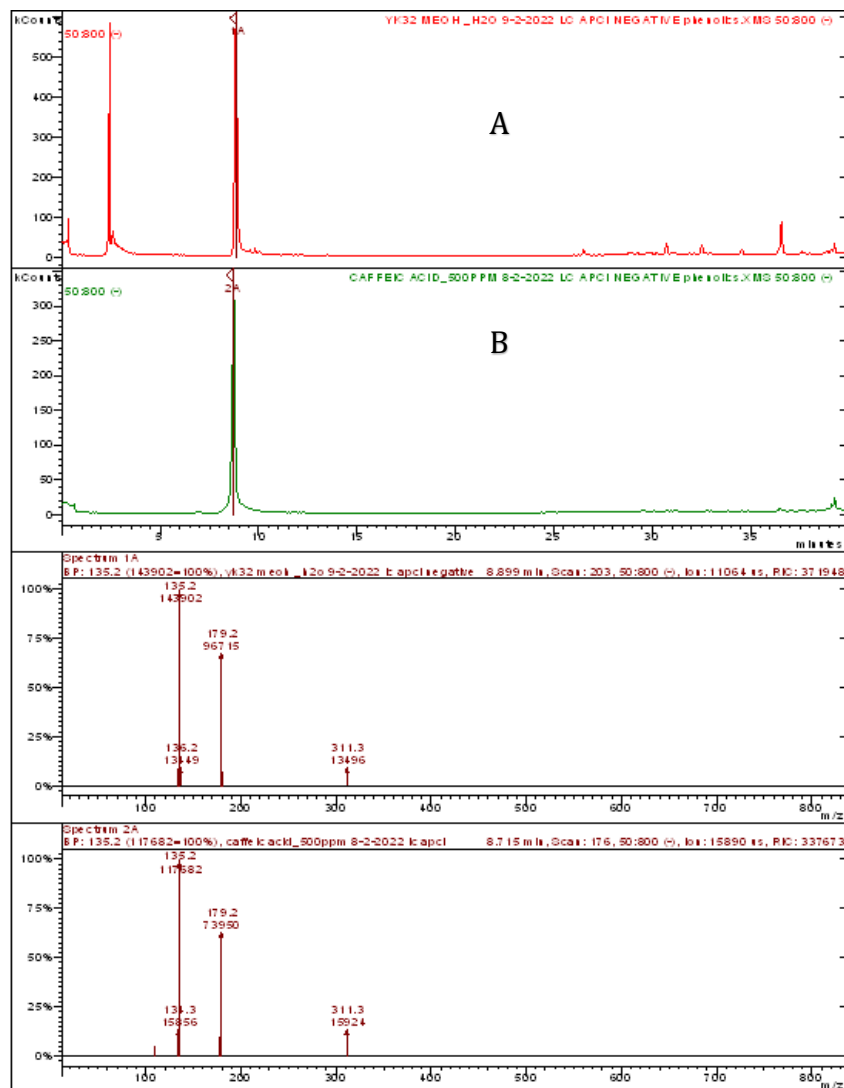
	Χρόνος (min)	Ισχύς (%)	%DES (%)	S/L (mg _{BSG})	TPC (πειραματικό) (mg _{GAE} /g _{BSG})	TFC (πειραματικό) (mg _{CAT} /g _{BSG})
Βέλτιστος Συνδυασμός	19.9	50	90	100	40.8 ±1.1	25.7 ±0.7

Σχολιασμός

- Η υπολογιζόμενη πειραματικά τιμή του TPC παρουσιάζει πολύ καλή προσαρμογή με το θεωρητικό μοντέλο παλινδρόμησης που προέκυψε από τον Πειραματικό Σχεδιασμό
- Η υπολογιζόμενη πειραματικά τιμή του TFC έχει ικανοποιητική προσαρμογή στην προβλεπόμενη θεωρητική τιμή. Η μικρή απόκλιση που παρατηρείται μπορεί να αποδίδεται στη δυσκολία ελέγχου της θερμοκρασίας στο σύστημα υπερήχων με probe.

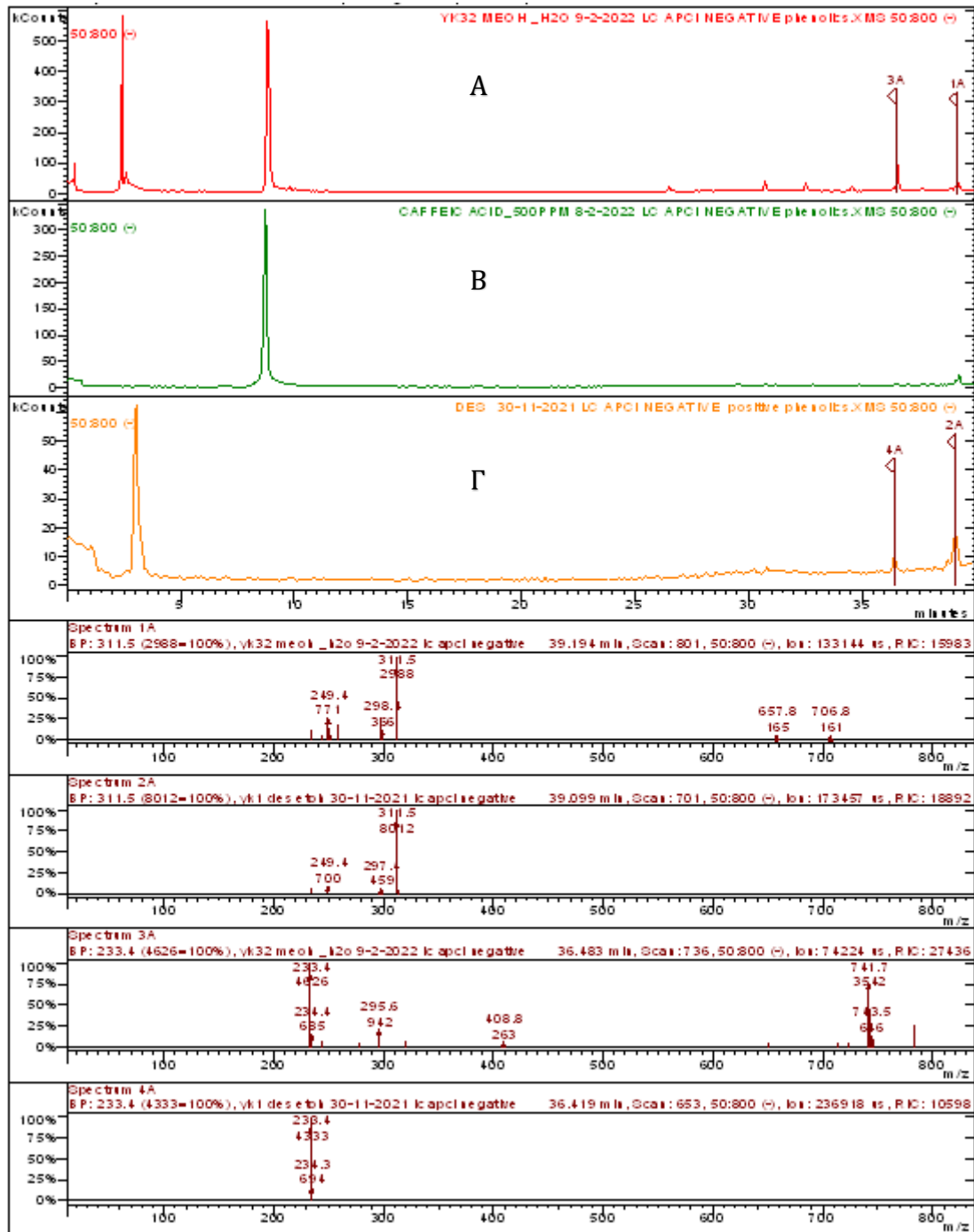
3.2.4 Χαρακτηρισμού βέλτιστου εκχυλίσματος με τη μέθοδο LC-MS

Από την ανάλυση του βέλτιστου εκχυλίσματος με χρήση της συζευγμένης μεθόδου LC-MS, φαίνεται ότι το κύριο φαινολικό συστατικό που εμπεριέχεται στα BSG και εκχυλίζεται από αυτά είναι το καφεϊκό οξύ, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση του φάσματος με το αντίστοιχο της πρότυπης ένωσης.



Σχήμα 27: Σύγκριση φασμάτων LC-MS: A. εκχυλίσματος και B: καφεϊκού οξέος,

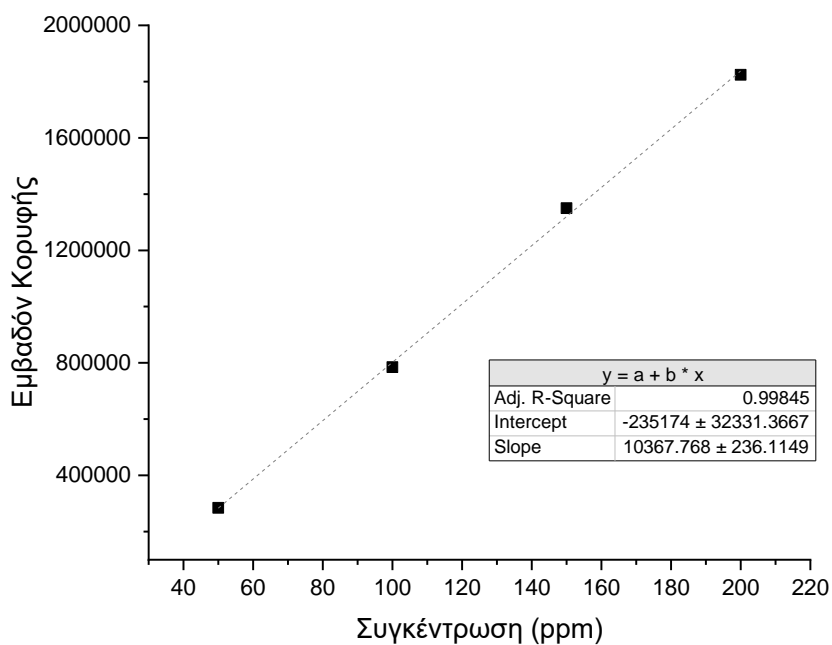
Στο παρακάτω Σχήμα παρουσιάζονται συγκριτικά τα φάσματα του εκχυλίσματος, του καφεϊκού οξέος και του NaDES Bet-Gly.



Σχήμα 28: Σύγκριση φασμάτων LC-MS: A. Εκχυλίσματος, B: καφεϊκού οξέος, και Γ: NaDES Bet-Gly

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση του κύριου συστατικού του εκχυλίσματος, απαραίτητη είναι η δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Αναλυτικότερα, παρασκευάστηκαν διαλύματα καφεϊκού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων με διαλύτη μεθανόλη, τα οποία αναλύθηκαν μέσω LC-MS, ώστε να

προκύψει μια συσχέτιση Εμβαδού Κορυφής – Συγκέντρωσης. Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε παρατίθεται στο Διάγραμμα 6:



Διάγραμμα 6: Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος σύμφωνα με τη μέθοδο των εξωτερικών προτύπων

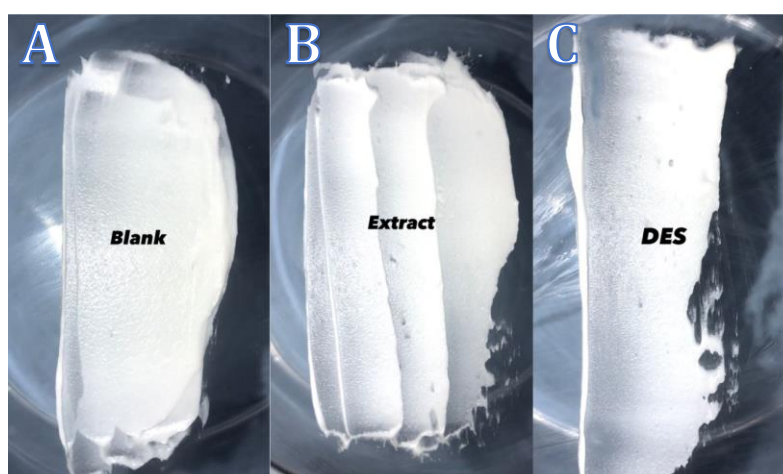
3.3 Παρασκευή και Χαρακτηρισμός καλλυντικής κρέμας



Εικόνα 9: Καλλυντική κρέμα με ενσωματωμένο το βέλτιστο εκχύλισμα.

3.3.1 Μελέτη σταθερότητας και αξιολόγηση

Αρχικά η καλλυντική κρέμα που παρασκευάστηκε χωρίστηκε σε 3 ισόποσα μέρη: i) κρέμα χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος (Blank), ii) κρέμα με προσθήκη εκχυλίσματος (Extract) και iii) κρέμα με προσθήκη μόνο NaDES Bet-Gly 1:3 (DES). Και οι 3 εκδοχές υποβλήθηκαν σε ελέγχους, όπως η φυγοκέντριση και ο κύκλος ψύξης θέρμανσης, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητά τους και να συγκριθούν μεταξύ τους μέσω οπτικής παρατήρησης. Παρακάτω παρατίθενται Εικόνες της κάθε εκδοχής ύστερα από τους ελέγχους σταθερότητας, καθώς και ένας συγκεντρωτικός Πίνακας πορισμάτων.



Εικόνα 10: Αξιολόγηση της υφής των κρεμών: A. Blank, B. Extract, C. DES.

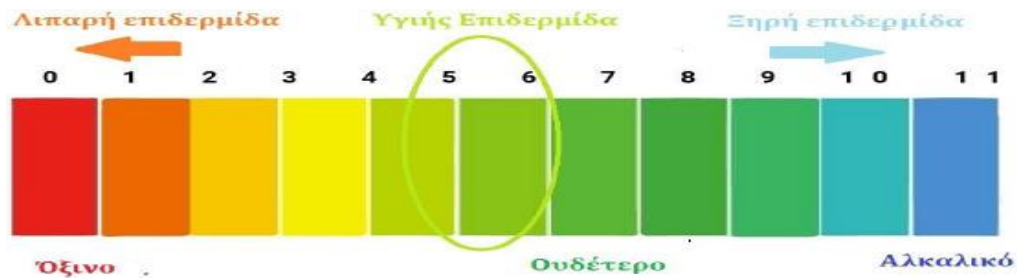
Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποιοτικών χαρακτηριστικών και των ελέγχων σταθερότητας,

Ποιοτικά Χαρακτηριστικά				Έλεγχοι Σταθερότητας	
Κρέμα	Χρώμα	Υφή	Ομοιογένεια	Φυγοκέντριση	Freeze - thaw
Blank	Λευκό	Λιπαρή	Εξαιρετική	Καμία μεταβολή Ελαφρύς διαχωρισμός φάσεων	Καμία αλλοίωση
Extract	Λευκό	Λιπαρή	Εξαιρετική	Καμία μεταβολή	Καμία αλλοίωση
DES	Λευκό	Λιπαρή	Εξαιρετική	Καμία μεταβολή	Καμία αλλοίωση

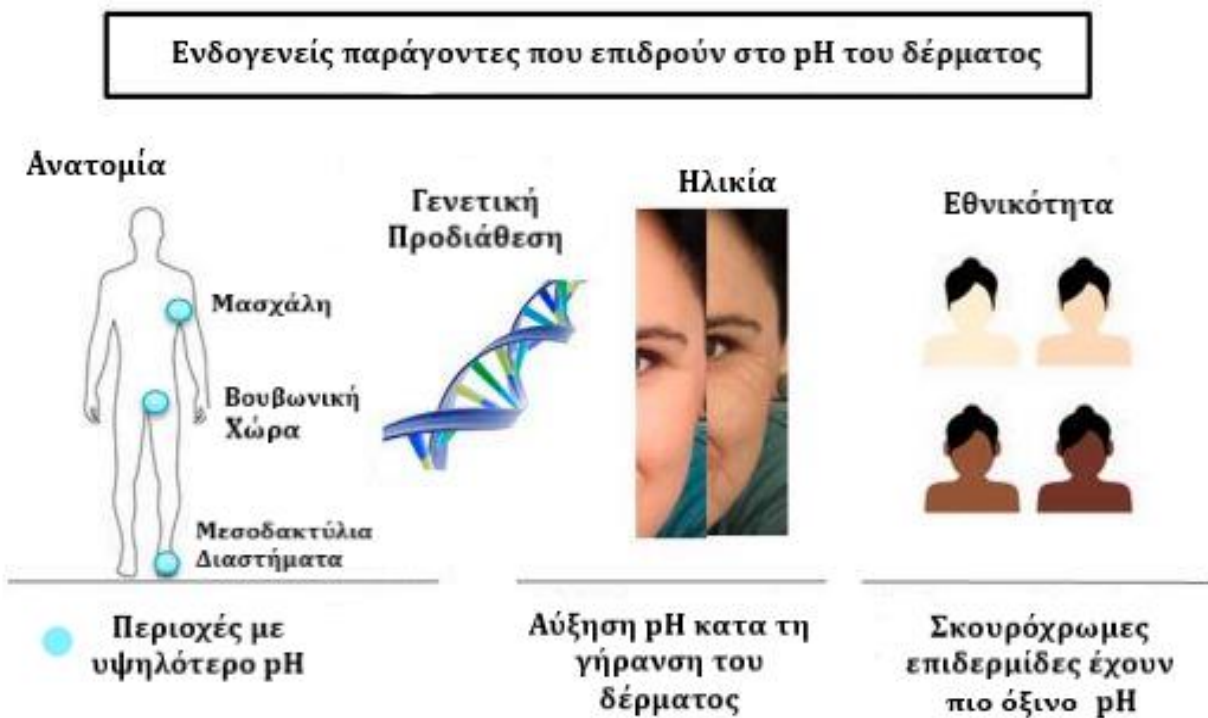
Σχόλιο: Κατά τη σύγκριση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της **Blank**, της **Extract** και της **DES** κρέμας παρατηρήθηκε σε όλες εξαιρετική ομοιογένεια πριν και μετά τους ελέγχους σταθερότητας, ενώ το χρώμα παρέμεινε λευκό. Η κρέμα **Extract** παρά τον ελαφρύ διαχωρισμό φάσεων που παρατηρήθηκε θεωρήθηκε ότι ανταποκρίθηκε καλά σε μια τόσο έντονη καταπόνηση, όπως η άσκηση υψηλών βαρυτικών δυνάμεων κατά τη φυγοκέντριση. Άλλωστε, όπως έχει αναφερθεί ο διαχωρισμός δεν αποτελεί αναγκαία συνθήκη απόρριψης του, αφού ένα εμπορικό σκεύασμα δεν προβλέπεται να έρθει αντιμέτωπο με τέτοιες ακραίες συνθήκες. Τέλος, η αίσθηση – υφή και των 3 κρεμών χαρακτηρίζεται κρεμώδης και λιπαρή, καθώς πρόκειται για γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (w/o). Η βάση της κρέμας επηρεάζει την αποτελεσματικότητά της. Κρέμες με βάσεις γαλακτώματα w/o, διατηρούν ενυδατωμένη την επιφάνεια του δέρματος και έτσι διευκολύνουν την διείσδυση των δραστικών ουσιών.

3.3.2 Αξιολόγηση pH

Όσον αφορά τη μέτρηση του pH, η κρέμα αξιολογήθηκε ως προς την παράμετρο αυτή πριν και μετά την προσθήκη εκχυλίσματος. Πριν το εκχύλισμα το pH της κρέμας κυμαινόταν στο εύρος **6.95-7.10**. Με την προσθήκη εκχυλίσματος το εύρος αυτό διαφοροποιήθηκε ελαφρώς: **6.78-6.94**. Οι τιμές αυτές θεωρούνται εντός των ενδεδειγμένων ορίων του pH για ποικίλες τοπικές εφαρμογές στο δέρμα, από τη στιγμή που προσεγγίζουν την ουδετερότητα και δε λαμβάνουν ακραίες τιμές (Σχήμα 28). Άλλωστε, το ιδανικό pH δεν αποτελεί σταθερό και προκαθορισμένο χαρακτηριστικό ενός καλλυντικού σκευάσματος, καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος του δέρματος εφαρμογής (Σχήμα 29) και ο γενικότερος σκοπός χρήσης της. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές μεγάλες εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο χώρο της κοσμητολογίας διαθέτουν στο πορτφόλιο τους προϊόντα ουδέτερου pH, όπως κρέμες μασάζ, κατευναστικές λοσιόν κατά των ερεθισμών (soothing lotions), κρέμες χεριών, σώματος και άλλων γενικών χρήσεων.



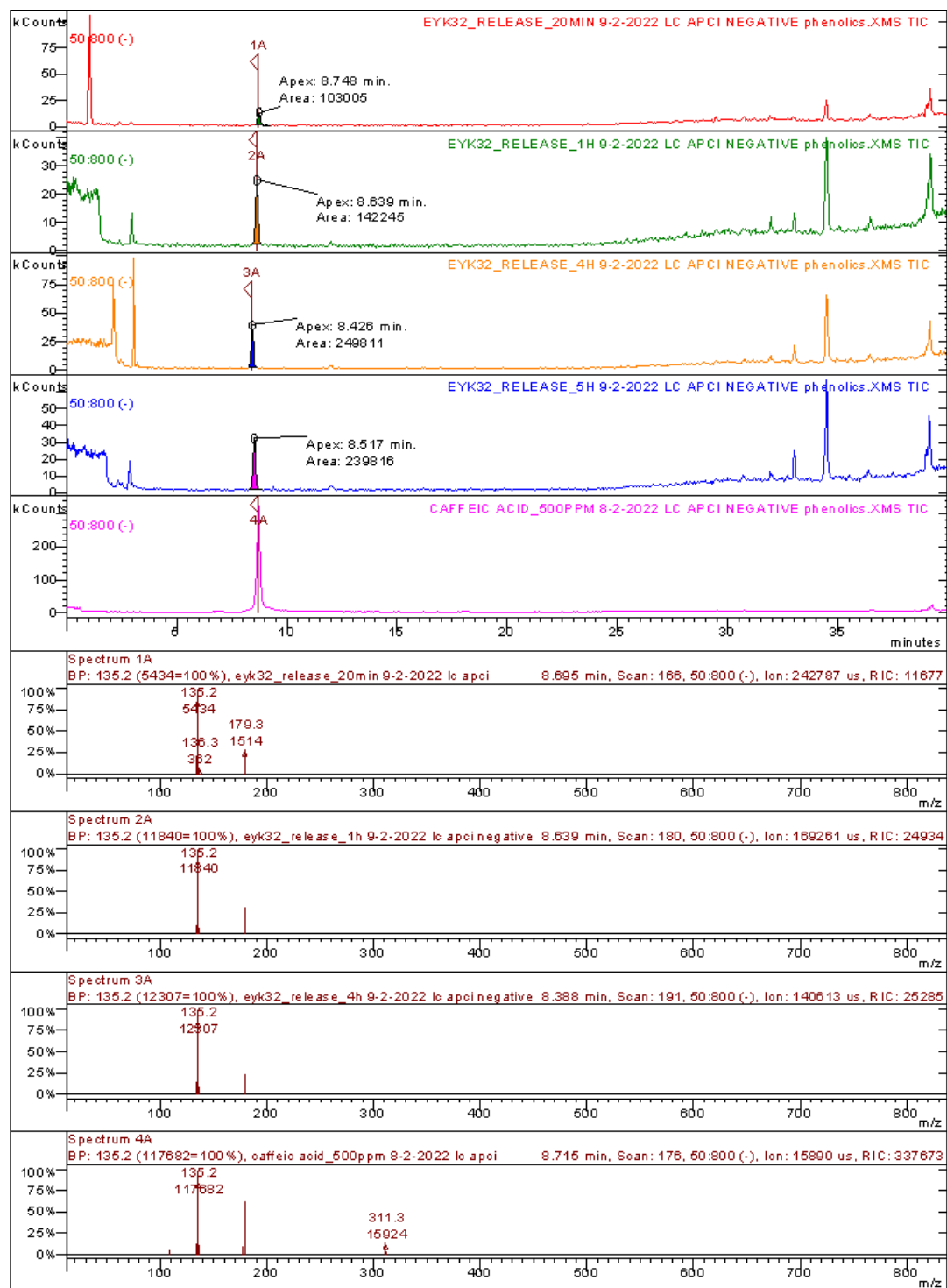
Σχήμα 29: Τιμές pH για τους διάφορους τύπους δέρματος



Σχήμα 30: Ενδογενείς παράγοντες που επιδρούν στο pH του δέρματος.⁹²

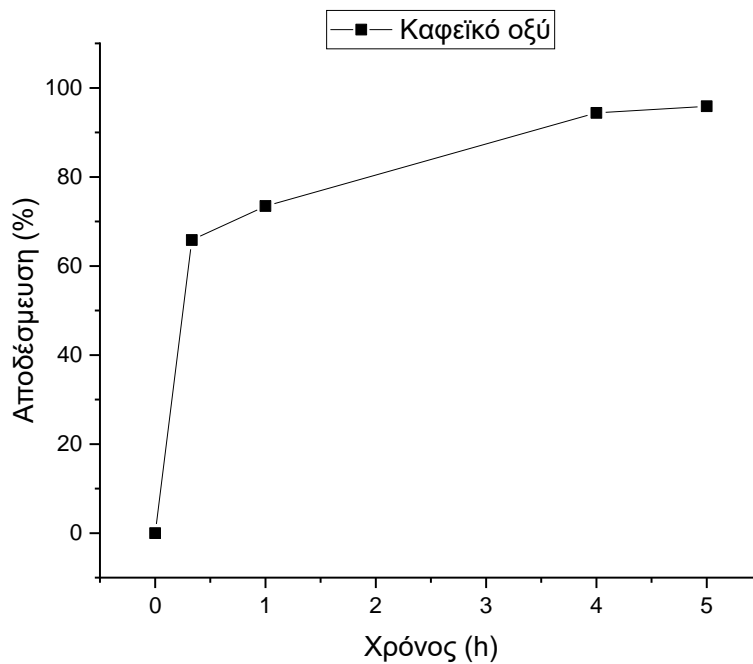
3.3.3 Μελέτη αποδέσμευσης εκχυλίσματος από την καλλυντική κρέμα με χρήση της συζευγμένης τεχνικής LC-MS.

Με χρήση της τεχνικής LC – MS προσδιορίστηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης του κύριου συστατικού (καφεϊκό οξύ) του εκχυλίσματος από την κρέμα. Στο Σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη αποδέσμευσης (pH 5.5 , 32°C) για τα χρονικά διαστήματα: i) 20 min, ii) 1h iii) 4h, iv) 5h



Σχήμα 31: Φάσματα LC-MS για μελέτη αποδέσμευσης (pH 5.5 , 32°C) χρονικής διάρκειας 5h.

Από την ανάλυση των δειγμάτων που φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα, εξαγεται ο ποσοστιαίος ρυθμός αποδέσμευσης του κύριου συστατικού του εκχυλίσματος από την καλλυντική κρέμα (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Ποσοστιαίος ρυθμός αποδέσμευσης του κύριου συστατικού του εκχύλισματος από την καλλυντική κρέμα

Το προφίλ που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7 χαρακτηρίζεται από μια ταχεία αποδέσμευση, η οποία εντοπίζεται στα 20 min (“burst effect”), όπου αποδεσμεύεται το 66% του καφεϊκού οξέος που περιέχεται στο ενσωματωμένο στην κρέμα εκχύλισμα. Η ταχεία αποδέσμευση σταδιακά περιορίζεται έως τις 5 h όπου αρχίζει και σταθεροποιείται (“plateau”).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοντελοποίηση των δεδομένων αποδέσμευσης ώστε να διαπιστωθεί η κινητική της αποδέσμευσης. Τα κινητικά μοντέλα με την μεγαλύτερη εφαρμογή και την καλύτερη περιγραφή των φαινομένων κατά την αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας είναι:

- **Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)**
- **Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (first order)**
- **Μοντέλο Higuchi**
- **Μοντέλο Korsmeyer - Peppas**

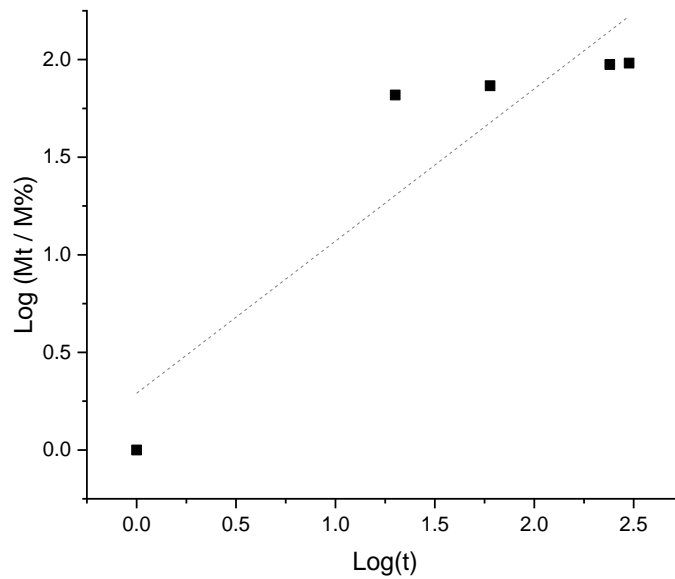
Η επιλογή του βέλτιστου κινητικού μοντέλου για την περιγραφή του προφίλ αποδέσμευσης του καφεϊκού οξέος έγινε με βάση τον συντελεστή R^2 .

Πίνακας 15: Κυριότερα κινητικά μοντέλα και οι εξισώσεις τους.

	R^2	Εξίσωση
Zero Order	0.5803	$y = 13.07x + 38.897$
First Order	0.3303	$y = 0.0351x + 1.8196$
Higuchi	0.7914	$y = 36.783x + 23.142$
Korsmeyer-Peppas	0.8398	$y = \mathbf{0.146}x + 1.6206$

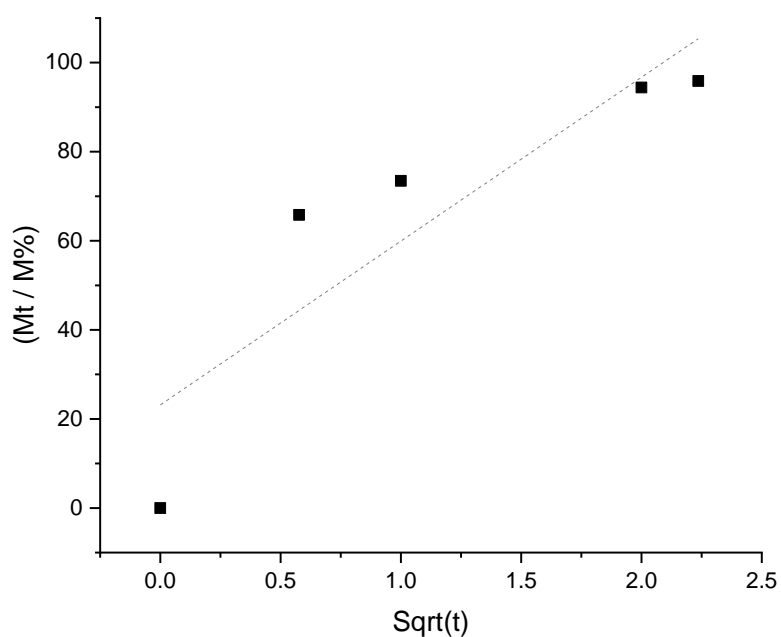
↑
n

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, την καλύτερη γραμμικότητα (τον υψηλότερο συντελεστή R^2) παρουσιάζει το κινητικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas. Μάλιστα, η κλίση της εξίσωσης (**n**) του μοντέλου Korsmeyer-Peppas, η οποία ισοδυναμεί με τον συντελεστής διάχυσης, υποδηλώνει ότι ο κύριος μηχανισμός αποδέσμευσης είναι η διάχυση (**n<0,5**).



Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas

Ωστόσο, το μοντέλο Korsmeyer–Peppas είναι ημιεμπειρικό και θεωρητικά χρησιμοποιείται για την ανάλυση μόνο του πρώτου 60% των δεδομένων αποδέσμευσης της δραστικής ένωσης. Ως εκ τούτου, λαμβάνεται το κινητικό μοντέλο που εμφανίζει την αμέσως επόμενη καλύτερη γραμμικότητα, δηλαδή το μοντέλο Higuchi, το οποίο απεικονίζεται γραφικά στο Διάγραμμα 9:



Διάγραμμα 9: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης και ανάδειξης ενός κύριου βιομηχανικού παραπροϊόντος, των υπολειμμάτων βύνης (BSG), το οποίο μέχρι σήμερα δε χρησιμοποιείται σε περαιτέρω διεργασίες προσθήκης αξίας. Η χημική τους σύσταση, το χαμηλό τους κόστος και η αφθονία της συγκεκριμένης πρώτης ύλης καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, την καθιστούν πολύ ελπιδοφόρα για καινοτόμες εφαρμογές. Έτσι, και δεδομένου ότι βιβλιογραφικές αναφορές χαρακτηρίζουν τα BSG ως μια πολύτιμη πηγή βιοδραστικών ενώσεων, η εκχύλιση αποτελεί αντικείμενο υψηλού επιστημονικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Ωστόσο, αυτό που προσδίδει ιδιαίτερη αξία, καινοτομία και πράσινο χαρακτήρα στη διεργασία είναι η χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών. Παράλληλα, η εφαρμογή Υπερήχων κατά την εκχύλιση, ως τεχνική υψηλής ενέργειας, βελτιώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητά της.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, παρασκευάστηκε NaDES Βεταΐνης – Γλυκερόλης σε αναλογία 1:3 ως μέσο εκχύλισης. Η πρώτη ύλη, για να γίνει πιο λειτουργική και να αποφευχθούν προβλήματα που σχετίζονται με την αποθήκευση και τη συντήρηση της (λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε νερό) οδηγήθηκε προς λυοφιλοποίηση (freeze drying). Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε καθώς διατηρεί εξαιρετικά τα βιοδραστικά συστατικά των BSG, ωστόσο είναι αμφιλεγόμενη ως προς τη βιωσιμότητα της σε βιομηχανικό επίπεδο, λόγω του υψηλού της κόστους.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά του συστήματος εκχύλισης οργανώθηκε μια πρώτη σειρά πειραμάτων αποτελούμενη από 9 πειράματα, στην οποία εξετάστηκαν παράμετροι εκχύλισης, όπως η κοκκομετρία, ο χρόνος (A: Time), η ισχύς (B: Power) των υπερήχων, η περιεκτικότητα του διαλύτη σε NaDES (C: %DES) και η αναλογία στερεής πρώτης ύλης προς διαλύτη (D: S/L). Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή διαφόρων συνδυασμών των παραπάνω συνθηκών, αξιολογήθηκαν ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή (TPC, TFC). Παρατηρήθηκε ότι στα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκε μικρή αναλογία S/L (200 mg_{BSG}/4 mL δ/τη) και μεγάλη αναλογία DES:H₂O (75:25), για μεγάλα ποσοστά ισχύος (40%) και ενδιάμεσους για τη διεργασία χρόνους εκχύλισης (15 λεπτά), οι τιμές TPC, TFC ήταν της τάξης των 20mg_{GAE} και 12 mg_{CAT} ανά g_{BSG} αντίστοιχα, γεγονός που καθιστά τις συγκεκριμένες συνθήκες

βέλτιστες για τα προκαταρκτικά πειράματα. Συνάμα από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η μικρή κοκκομετρία είναι καταλληλότερη για τη διεργασία και γι' αυτό διατηρείται σταθερή ως παράμετρος.

Με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, καταστρώθηκε Πειραματικός Σχεδιασμός, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Taguchi. Ο τύπος σχεδιασμού που εφαρμόστηκε είναι 9 επιπέδων : $L_9(3^4)$. Ο ρόλος της Taguchi είναι καθοριστικός για την εξοικονόμηση τόσο χρόνου όσο και πόρων. Για να αντληθούν πληροφορίες χωρίς τη μέθοδο αυτή, θα απαιτούνταν $3^4 = 81$ πειράματα, αριθμός αποτρεπτικός για τη διερεύνηση του συστήματος. Εκτελώντας πλέον 9 φορές λιγότερα πειράματα, μπορούν να εξαχθούν άμεσα συμπεράσματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης και των συσχετίσεων των παραμέτρων που επιδρούν στις εξαρτημένες μεταβλητές (TPC, TFC).

Από την ανάλυση Taguchi προέκυψε ότι ο σημαντικότερος παράγοντας από τους εξεταζόμενους είναι ο «%DES» (**Rank 1**), ενώ αντίθετα η ισχύς (Power) φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στις αποκρίσεις (**Rank 4**). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συσχετίσεις μεταξύ 2 παραμέτρων. Παρατηρείται ότι η παρουσία του όρου S/L (**Rank 2**) σε ένα ζεύγος συσχετίσεων, καθορίζει σημαντικά τη βαρύτητα του στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Από την άλλη συσχετίσεις που περιέχουν τον όρο του χρόνου (Time: **Rank 3**) συνήθως επηρεάζουν τις τιμές των TPC, TFC σε ένα μικρό εύρος διαβαθμίσεων. Ακόμα, αναφορικά με τις συσχετίσεις, αξίζει να αναφερθεί η συμπεριφορά του συστήματος κατά την αλληλεπίδραση των όρων «S/L» και «%DES» ως προς την απόκριση TFC. Το αξιοσημείωτο είναι ότι, ενώ με την επιθυμητή αύξηση του λόγου S/L η κατανάλωση περισσότερης ποσότητας DES είναι αναγκαία, υπάρχει περιοχή στο διάγραμμα συσχετίσεων «S/L · %DES», όπου μπορεί να ανακτηθεί ικανοποιητική ποσότητα φλαβονοειδών (10-15 mg_{CAT} /g_{BSG}), χρησιμοποιώντας πολύ λιγότερη ποσότητα DES στο σύστημα DES:H₂O, συγκριτικά με την αναμενόμενη.

Στη συνέχεια, η εφαρμογή μοντέλου παλινδρόμησης στο λογισμικό *Minitab*, δίνει τις αντίστοιχες εξισώσεις παλινδρόμησης για τις αποκρίσεις TPC, TFC, μέσα από τις οποίες προκύπτει ο βέλτιστος συνδυασμός παραμέτρων για ταυτόχρονη μεγιστοποίηση τους: (A): 19.9 , (B): 50%, (C): 90%, (D): 100 mg_{BSG}/4 mL διαλύτη, σύμφωνα με τον οποίο προκύπτουν: **TPC = 41.4 mg_{GAE}/g_{BSG} & TFC = 32.6 mg_{CAT}/g_{BSG}.**

Παρατηρείται ότι 3 από τις 4 παραμέτρους (B,C,D) λαμβάνουν τιμές που ταυτίζονται με τις αντίστοιχες ακραίες των Επιπέδων του Πειραματικού Σχεδιασμού. Οι βέλτιστες συνθήκες που υποδεικνύονται από το θεωρητικό μοντέλο εφαρμόζονται πειραματικά, με το πείραμα να διεξάγεται 3 φορές για λόγους επαναληψιμότητας, δίνοντας: **TPC = 40.8 ± 1.1 & TFC = 25.7 ± 0.7**, επικυρώνοντας την ικανοποιητική έως πολύ καλή προσαρμογή στις προβλέψεις του μοντέλου.

Το βέλτιστο πειραματικά εκχύλισμα, αναλύθηκε μέσω της συζευγμένης τεχνικής LC-MS, προκειμένου να μελετηθεί η χημική του σύσταση. Ειδικότερα, προέκυψε ότι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος είναι το καφεϊκό οξύ, κάτι το οποίο συμφωνεί και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για εκχυλίσματα BSG που έχουν ληφθεί με συμβατικούς διαλύτες εκχύλισης.

Με στόχο την περαιτέρω αξιοποίηση του υψηλής προστιθέμενης αξίας «βέλτιστου» εκχυλίσματος NaDES-BSG, παρασκευάστηκε καλλυντική κρέμα νερού σε έλαιο. Από την αξιολόγηση παραμέτρων όπως η σταθερότητα και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της κρέμας, προέκυψε ότι η κρέμα με το ενσωματωμένο εκχύλισμα BSG-NaDES παρουσιάζει βελτιωμένα ή αντίστοιχα χαρακτηριστικά, συγκριτικά με την κρέμα βάσης (blank).

Πραγματοποιήθηκε επίσης, μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης του κύριου συστατικού του εκχυλίσματος (καφεϊκό οξύ) από το σκεύασμα της κρέμας. Παρατηρήθηκε ότι το προφίλ χαρακτηρίζεται από μια ταχεία αποδέσμευση, η οποία πραγματοποιείται στα 20 min (“burst effect”), όπου και αποδεσμεύεται το 66% του καφεϊκού οξέος που περιέχεται στο ενσωματωμένο στην κρέμα εκχύλισμα. Η ταχεία αποδέσμευση σταδιακά περιορίζεται έως τις 5 h όπου αρχίζει και σταθεροποιείται (“plateau”).

5. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και συμπεράσματα που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη μπορούν να λειτουργήσουν ως βάση για την ανάπτυξη και υλοποίηση νέων ιδεών και καινοτόμων διεργασιών. Μερικές προτάσεις για μελλοντική έρευνα παρατίθενται παρακάτω:

- Μελέτη βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων που προέρχονται από BSG διαφορετικού βαθμού καβουρδίσματος βύνης. Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν ότι ο βαθμός και ο τρόπος καβουρδίσματος της βύνης στα στάδια προεπεξεργασίας της επηρεάζουν το προφίλ της χημικής σύστασης των BSG και άρα την περιεκτικότητα τους σε φαινολικές ενώσεις.⁹¹
- Μελέτη εκχύλισης BSG διαφορετικού τύπου προέλευσης, προκειμένου να εξετασθεί και η γεωγραφική περιοχή ως παράμετρος της ποιότητας του εκχυλίσματος.
- Εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας με NaDES διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (π.χ. πολικότητα, ιξώδες) ή και συνδυασμούς αυτών, διατηρώντας τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.
- Εφαρμογή εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκυματική ακτινοβολία, ως εναλλακτική τεχνική υψηλής ενέργειας ή και συνδυασμό τεχνικών υψηλής ενέργειας, όπως υπέρηχοι και μικροκύματα.
- Προσδιορισμός της *in vitro* αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (π.χ. δυνατότητα δέσμευσης ρίζας DPPH).
- Εγκλωβισμός εκχυλισμάτων σε νανοσυστήματα για την επίτευξη τροποποιημένης αποδέσμευσης των δραστικών συστατικών τους.
- Μελέτη κυτταροτοξικότητας του NaDES, του εκχυλίσματος και του τελικού προϊόντος (καλλυντική κρέμα).
- Διερεύνηση αξιοποίησης του υπολείμματος BSG που προκύπτει από την εκχύλιση σε διεργασίες βιοδιύλιση με στόχο την πιθανή απόκτηση δευτερευόντων προϊόντων, όπως βιοκαύσιμα και άλλα χημικά.

- Μελέτη εφικτότητας (σκοπιμότητας) ανακλιμάκωσης της διεργασίας και σχεδιασμός μονάδας πιλοτικής κλίμακας με παράλληλη ανάλυση της οικονομικής βιωσιμότητας της.

Βιβλιογραφία

- (1) The 17 Goals - History <https://sdgs.un.org/goals> (accessed Dec 20, 2021).
- (2) Fillaudeau, L.; Blanpain-avet, P.; Daufin, G. Water , Wastewater and Waste Management in Brewing Industries. **2006**, *14*, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2005.01.002>.
- (3) Chris Boulton. *Encyclopaedia of Brewing*; John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, UK, 2013.
- (4) Joh. Barth & Sohn GmbH & Co KG. *The Barth Report, Hops 2016/2017*; Nuremberg, Germany, 2017.
- (5) Stewart, G. G.; Priest, F. G. *Handbook of Brewing*, 2nd editio.; CRC Press, 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420015171>.
- (6) Mussatto, S. I.; Dragone, G.; Roberto, I. C. Brewers' Spent Grain: Generation, Characteristics and Potential Applications. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.
- (7) López-Linares, J. C.; Campillo, V.; Coca, M.; Lucas, S.; García-Cubero, M. T. Microwave-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2021**, *96* (2), 481–490. <https://doi.org/10.1002/jctb.6565>.
- (8) Statista. Beer production worldwide from 1998 to 2020(in billion hectoliters) <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/> (accessed Dec 22, 2021).
- (9) Chetrariu, A.; Dabija, A. Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (16), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app10165619>.
- (10) Buffington, J. The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Adv. Chem. Eng. Sci.* **2014**, *04* (03), 308–318. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>.
- (11) Materials and Wort: Barley; 2008; pp 1–24.
- (12) Goldammer, T. *The Brewer's Handbook*, Second Edi.; Apex Publishers, 2008.
- (13) Athanasios, M.; Georgios, L.; Michael, K. A Rapid Microwave-Assisted

- Derivatization Process for the Determination of Phenolic Acids in Brewer's Spent Grains. *Food Chem.* **2007**, *102* (3), 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.040>.
- (14) Szwajgier, D.; Waśko, A.; Targoński, Z.; Niedźwiadek, M.; Bancarzewska, M. The Use of a Novel Ferulic Acid Esterase from *Lactobacillus Acidophilus* K1 for the Release of Phenolic Acids from Brewer's Spent Grain. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116* (3), 293–303. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00434.x>.
- (15) Lynch, K. M.; Steffen, E. J.; Arendt, E. K. Brewers' Spent Grain: A Review with an Emphasis on Food and Health. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122* (4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>.
- (16) Ikram, S.; Huang, L. Y.; Zhang, H.; Wang, J.; Yin, M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *J. Food Sci.* **2017**, *82* (10), 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>.
- (17) Kunze, W. *Technology Brewing and Malting*, 6th revise.; Hendel, O., Ed.; VLB, Berlin, 2019.
- (18) Al-Hadithi, A. N.; Muhsen, A. A.; Yaser, A. A. Study of the Possibility of Using Some Organic Acids as Preservatives for Brewery By-Products. *J. Agric. Water Resour. Res.* **1985**, *4*, 229–242.
- (19) Kuntzel, U.; Sonnenberg, H. Preservation of Pressed Brewers' Spent Grains with Potassium Sorbate. *Monatsschrift fuer Brauwiss.* **1997**, *50*, 175–181.
- (20) Tang, Z.; Cenkowski, S.; Muir, W. E. Modelling the Superheated-Steam Drying of a Fixed Bed of Brewers' Spent Grain. *Biosyst. Eng.* **2004**, *87* (1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2003.09.008>.
- (21) Tang, Z.; Cenkowski, S.; Izydorczyk, M. Thin-Layer Drying of Spent Grains in Superheated Steam. *J. Food Eng.* **2005**, *67* (4), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.040>.
- (22) Robertson, J. A.; P'Anson, K. J. A.; Brocklehurst, T. F.; Faulds, C. B.; Waldron, K. W. Effect of Storage Conditions on the Microbial Ecology and Biochemical Stability of Cell Wall Components in Brewers' Spent Grain. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (12), 7266–7272. <https://doi.org/10.1021/jf1001099>.
- (23) El-Shafey, E. I.; Gameiro, M. L. F.; Correia, P. F. M.; Carvalho, J. M. R. de.

Dewatering of Brewer's Spent Grain Using a Membrane Filter Press: A Pilot Plant Study. *Sep. Sci. Technol.* **2004**, *39* (14), 3237–3261. <https://doi.org/10.1081/SS-200028775>.

- (24) Lu, W.; Liu, S. Choline Chloride–Based Deep Eutectic Solvents (Ch-DESs) as Promising Green Solvents for Phenolic Compounds Extraction from Bioresources: State-of-the-Art, Prospects, and Challenges. *Biomass Convers. Biorefinery* **2020**. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00753-7>.
- (25) Zhao, H.; Chen, W.; Lu, J.; Zhao, M. Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Commercial Beers. *Food Chem.* **2010**, *119* (3), 1150–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>.
- (26) Piazzon, A.; Forte, M.; Nardini, M. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (19), 10677–10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>.
- (27) Gomes, C. A.; Girão da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. M. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure–Activity Study. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5395–5401. <https://doi.org/10.1021/jm030956v>.
- (28) Chang, W.-C.; Hsieh, C.-H.; Hsiao, M.-W.; Lin, W.-C.; Hung, Y.-C.; Ye, J.-C. Caffeic Acid Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer Cells Through the Mitochondrial Pathway. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **2010**, *49* (4), 419–424. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(10\)60092-7](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(10)60092-7).
- (29) Sakai, S.; Kawamata, H.; Kogure, T.; Mantani, N.; Terasawa, K.; Umatake, M.; Ochiai, H. Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on the Production of Macrophage Inflammatory Protein-2 in Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in RAW264.7 Cells. *Mediators Inflamm.* **1999**, *8* (3), 173–175. <https://doi.org/10.1080/09629359990513>.
- (30) Murakami, A.; Nakamura, Y.; Koshimizu, K.; Takahashi, D.; Matsumoto, K.; Hagihara, K.; Taniguchi, H.; Nomura, E.; Hosoda, A.; Tsuno, T.; et al. FA15, a Hydrophobic Derivative of Ferulic Acid, Suppresses Inflammatory Responses and Skin Tumor Promotion: Comparison with Ferulic Acid. *Cancer Lett.* **2002**, *180* (2), 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00858-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00858-8).

- (31) Nardini, M.; D'Aquino, M.; Tomassi, G.; Gentili, V.; Di Felice, M.; Scaccini, C. Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation by Caffeic Acid and Other Hydroxycinnamic Acid Derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19* (5), 541–552. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00052-Y](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00052-Y).
- (32) Meyer, A. S.; Donovan, J. L.; Pearson, D. A.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N. Fruit Hydroxycinnamic Acids Inhibit Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (5), 1783–1787. <https://doi.org/10.1021/jf9708960>.
- (33) Guido, L. F.; Moreira, M. M. Techniques for Extraction of Brewer ' s Spent Grain Polyphenols : A Review. **2017**, 1192–1209. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1913-4>.
- (34) Ilahy, R.; Tlili, I.; Siddiqui, M. W.; Hdider, C.; Lenucci, M. S. Inside and beyond Color: Comparative Overview of Functional Quality of Tomato and Watermelon Fruits. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10* (June), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00769>.
- (35) Dv, M.; Guido, L. F.; Dostálek, P.; Skulilová, Z.; Moreira, M. M.; Barros, A. A.; Brew, J. I. Antioxidant Properties of Free , Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. **2008**, *114* (1), 27–33.
- (36) McCarthy, A. L.; O'Callaghan, Y. C.; Neugart, S.; Piggott, C. O.; Connolly, A.; Jansen, M. A. K.; Krumbein, A.; Schreiner, M.; FitzGerald, R. J.; O'Brien, N. M. The Hydroxycinnamic Acid Content of Barley and Brewers' Spent Grain (BSG) and the Potential to Incorporate Phenolic Extracts of BSG as Antioxidants into Fruit Beverages. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 2567–2574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.048>.
- (37) Skarpalezos, D.; Detsi, A. Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (19). <https://doi.org/10.3390/app9194169>.
- (38) Houlihan, T.; Advisor, F. Adding Value to Farm and Forestry Produce. **2016**, No. December, 55–56.
- (39) Mussatto, S. I. Brewer ' s Spent Grain : A Valuable Feedstock for Industrial

Applications. **2014**, No. January. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>.

- (40) Sodhi, H.S.; Garcha, H. S.; Kiran, U. Screening of Mycoflora of Spent up Brewer's Grains for Aflatoxin Production. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* **1985**, *22*, 331–336.
- (41) Ribau Teixeira, M.; Guarda, E. C.; Freitas, E. B.; Galinha, C. F.; Duque, A. F.; Reis, M. A. M. Valorization of Raw Brewers' Spent Grain through the Production of Volatile Fatty Acids. *N. Biotechnol.* **2020**, *57*, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.01.007>.
- (42) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Ombra, M. N.; D'Acerno, A.; Coppola, R. Recovery of Biomolecules of High Benefit from Food Waste. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *22*, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.012>.
- (43) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ: ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΑΞΗ*; Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007.
- (44) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- (45) Ζουμπούλης, Α. Ι.; Πελέκα, Ε. Ν.; Τριανταφυλλίδης, Κ. Σ. *Πράσινη Χημεία Και Τεχνολογία Στη Βιώσιμη Ανάπτυξη*; ΣΕΑΒ, 2015.
- (46) Jablonský, M.; Šima, J. Phytomass Valorization by Deep Eutectic Solvents—Achievements, Perspectives, and Limitations. *Crystals* **2020**, *10* (9), 1–37. <https://doi.org/10.3390/cryst10090800>.
- (47) Lei, Z.; Chen, B.; Koo, Y.-M.; MacFarlane, D. R. Introduction: Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (10), 6633–6635. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00246>.
- (48) Greer, A. J.; Jacquemin, J.; Hardacre, C. Industrial Applications of Ionic Liquids. *Molecules* **2020**, *25* (21), 5207. <https://doi.org/10.3390/molecules25215207>.
- (49) Chen, Y.; Mu, T. Application of Deep Eutectic Solvents in Biomass Pretreatment and Conversion. *Green Energy Environ.* **2019**, *4* (2), 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.01.012>.
- (50) Yang, Z. Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. In *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*; Itoh, T., Koo, Y.-M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 168, pp 31–60. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-70536-9>.

- (51) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *979*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- (52) Laguerre, M.; Lavaud, A. The Rise of Deep Eutectics from Nature to Cosmetics. *Pers. Care* **2016**, 45–47.
- (53) Zhang, Q.; De Oliveira Vigier, K.; Royer, S.; Jérôme, F. Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.
- (54) Škulcová, A.; Jablonský, M. Properties and Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents Based Lactic Acid. *J. Hyg. Eng. Des.* **2018**, *25*, 75–80.
- (55) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- (56) Zhao, B.-Y.; Xu, P.; Yang, F.-X.; Wu, H.; Zong, M.-H.; Lou, W.-Y. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from Sophora Japonica. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2015**, *3* (11), 2746–2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>.
- (57) Shishov, A.; Bulatov, A.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Andruch, V. Application of Deep Eutectic Solvents in Analytical Chemistry. A Review. *Microchem. J.* **2017**, *135*, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>.
- (58) Emami, S.; Shayanfar, A. Deep Eutectic Solvents for Pharmaceutical Formulation and Drug Delivery Applications. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25* (7), 779–796. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1735414>.
- (59) Koutsoukos, S.; Tsiaka, T.; Tzani, A.; Zoumpoulakis, P.; Detsi, A. Choline Chloride and Tartaric Acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the Efficient Extraction of Phenolic and Carotenoid Compounds. *J. Clean. Prod.* **2019**, *241*, 118384. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>.
- (60) Tzani, A.; Kalafateli, S.; Tatsis, G.; Bairaktari, M.; Kostopoulou, I.; Pontillo, A. R. N.; Detsi, A. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe). *Sustain. Chem.* **2021**, *2* (4), 576–599. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>.

- (61) Mišan, A.; Nađpal, J.; Stupar, A.; Pojić, M.; Mandić, A.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. The Perspectives of Natural Deep Eutectic Solvents in Agri-Food Sector. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60* (15), 2564–2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>.
- (62) Jeong, K. M.; Ko, J.; Zhao, J.; Jin, Y.; Yoo, D. E.; Han, S. Y.; Lee, J. Multi-Functioning Deep Eutectic Solvents as Extraction and Storage Media for Bioactive Natural Products That Are Readily Applicable to Cosmetic Products. *J. Clean. Prod.* **2017**, *151*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>.
- (63) Panić, M.; Gunjević, V.; Cravotto, G.; Radojčić Redovniković, I. Enabling Technologies for the Extraction of Grape-Pomace Anthocyanins Using Natural Deep Eutectic Solvents in up-to-Half-Litre Batches Extraction of Grape-Pomace Anthocyanins Using NADES. *Food Chem.* **2019**, *300*, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>.
- (64) Bosiljkov, T.; Dujmić, F.; Cvjetko Bubalo, M.; Hribar, J.; Vidrih, R.; Brnčić, M.; Zlatic, E.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-Assisted Extraction: Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* **2017**, *102*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005>.
- (65) Huang, Y.; Guo, J.; Zhang, J. Physicochemical and Antioxidant Properties of *Potentilla Anserina* L. Polysaccharides Affected by Ultrasonication. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (13). <https://doi.org/10.3390/app10134510>.
- (66) Vinatoru, M. An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, *8* (3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2).
- (67) Panda, D.; Manickam, S. Cavitation Technology-the Future of Greener Extraction Method: A Review on the Extraction of Natural Products and Process Intensification Mechanism and Perspectives. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (4). <https://doi.org/10.3390/app9040766>.
- (68) Wang, X.; Wu, Y.; Li, J.; Wang, A.; Li, G.; Ren, X.; Yin, W. Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Echinacoside and Oleuropein from *Syringa Pubescens* Turcz. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *151*, 112442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112442>.

- (69) Martins Strieder, M.; Keven Silva, E.; Angela A. Meireles, M. Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Colorants. *Food Public Heal.* **2019**, *9* (2), 45–52. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20190902.02>.
- (70) Aguilar-Hernández, G.; Zepeda-Vallejo, L. G.; García-Magaña, M. D. L.; Vivar-Vera, M. D. L. Á.; Pérez-Larios, A.; Girón-Pérez, M. I.; Coria-Tellez, A. V.; Rodríguez-Aguayo, C.; Montalvo-González, E. Extraction of Alkaloids Using Ultrasound from Pulp and By-Products of Soursop Fruit (*Annona Muricata* L.). *Appl. Sci.* **2020**, *10* (14), 1–15. <https://doi.org/10.3390/app10144869>.
- (71) Senrayan, J.; Venkatachalam, S. Ultrasonic Acoustic-Cavitation as a Novel and Emerging Energy Efficient Technique for Oil Extraction from Kapok Seeds. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *62*, 102347. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102347>.
- (72) Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sánchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **2017**, *7* (3). <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>.
- (73) Woodall, W. H.; Montgomery, D. C. Research Issues and Ideas in Statistical Process Control. *J. Qual. Technol.* **1999**, *31* (4), 376–386. <https://doi.org/10.1080/00224065.1999.11979944>.
- (74) Regulation (EC) No 1223/2009. n.d. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products.
- (75) United States Code. n.d. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, <https://tile.loc.gov/storage-services/service/ll/uscode/uscode1934-00602/uscode1934-006021009/uscode1934-006021009.pdf> (accessed Jan 13, 2022).
- (76) Mohammad, I. S.; Naveed, M.; Ijaz, S.; Shumzaid, M.; Hassan, S.; Muhammad, K. S.; Rasool, F.; Akhtar, N.; Ishaq, H. M.; Khan, H. M. S. Phytocosmeceutical Formulation Development, Characterization and Its in-Vivo Investigations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107* (May), 806–817. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.024>.
- (77) Akbari, S.; Abdurahman, N. H.; Yunus, R. M.; Fayaz, F.; Alara, O. R. Biosurfactants—a New Frontier for Social and Environmental Safety: A Mini

- Review. *Biotechnol. Res. Innov.* **2018**, 2 (1), 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>.
- (78) Shah, R.; Eldridge, D.; Palombo, E.; Harding, I. *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability*; SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development; Springer International Publishing: Cham, 2015.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-10711-0>.
- (79) Macedo, J. P. F.; Fernandes, L. L.; Formiga, F. R.; Reis, M. F.; Nagashima, T.; Soares, L. A. L.; Egito, E. S. T. Micro-Emultocrit Technique : A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. **2006**, 7 (1), 1–7.
- (80) Soto, M. L.; Parada, M.; Falqué, E.; Domínguez, H. Personal-Care Products Formulated with Natural Antioxidant Extracts. *Cosmetics* **2018**, 5 (1), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics5010013>.
- (81) Mishra, A. P.; Saklani, S.; Milella, L.; Tiwari, P. Formulation and Evaluation of Herbal Antioxidant Face Cream of Nardostachys Jatamansi Collected from Indian Himalayan Region. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4 (Suppl 2), S679–S682.
<https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0223>.
- (82) Chan, G. K. L.; Guo, M. S.; Dai, D. K.; Lai, Q. W. S.; Fung, K. W. C.; Zheng, B. Z.; Wu, K. Q.; Man, B. K. K.; Dong, T. T.; Tsim, K. W. K. An Optimized Extract, Named Self-Growth Colony, from Platelet-Rich Plasma Shows Robust Skin Rejuvenation and Anti-Ageing Properties: A Novel Technology in Development of Cosmetics. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2021**, 34 (2), 74–85. <https://doi.org/10.1159/000513052>.
- (83) Benoit, C.; Virginie, C.; Boris, V. *The Use of NADES to Support Innovation in the Cosmetic Industry*, 1st ed.; Elsevier Ltd., 2021; Vol. 97.
<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.009>.
- (84) Ramtekek., H.; Dighep, A.; Patil, S. .; Kharat, A. . Mathematical Models of Drug Dissolution : A Review. *Sch. Acad. J. Pharm.* **2014**, 388–396.
- (85) Quifer-Rada, P.; Vallverdú-Queralt, A.; Martínez-Huélamo, M.; Chiva-Blanch, G.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. A Comprehensive Characterisation of Beer Polyphenols by High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* **2015**, 169, 336–343.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>.

- (86) Tzani, A.; Kalafateli, S.; Tatsis, G.; Bairaktari, M.; Kostopoulou, I.; Pontillo, A. R. N.; Detsi, A. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe). *Sustain. Chem.* **2021**, *2* (4), 576–599. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>.
- (87) Bonifácio-Lopes, T.; Vilas Boas, A. A.; Coscueta, E. R.; Costa, E. M.; Silva, S.; Campos, D.; Teixeira, J. A.; Pintado, M. Bioactive Extracts from Brewer's Spent Grain. *Food Funct.* **2020**, *11* (10), 8963–8977. <https://doi.org/10.1039/d0fo01426e>.
- (88) Koutsoukos, S.; Tsiaka, T.; Tzani, A.; Zoumpoulakis, P.; Detsi, A. Choline Chloride and Tartaric Acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the Efficient Extraction of Phenolic and Carotenoid Compounds. *J. Clean. Prod.* **2019**, *241*, 118384. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>.
- (89) Watson, G. D.; Edrada-Ebel, R. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 3rd Editio.; Churchill Livingstone - Elsevier, 2012.
- (90) SHIMADZU. Interfaces for LC-MS https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/interfaces_for_lcms.html?fbclid=IwAR1XVFXHEL4dgNldd-aultHZvywm7IXq3mKAwyej3XtG-tEYvcBWP47KvZs#section2 (accessed Oct 2, 2022).
- (91) Almendinger, M.; Rohn, S.; Pleissner, D. Malt and Beer-Related by-Products as Potential Antioxidant Skin-Lightening Agents for Cosmetics. *Sustain. Chem. Pharm.* **2020**, *17* (June), 100282. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100282>.
- (92) Luki, M. Towards Optimal PH of the Skin and Topical Formulations : From the Current State of the Art to Tailored Products. **2021**.