



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Ακαδημαϊκό Έτος: 2021-2022
Τομέας: Χημικών Επιστημών
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση διεργασίας αξιοποίησης υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας (Brewer's Spent Grains, BSG) με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών

Σκαλτσάς Φώτιος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Δέτση Αναστασία, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, 2022

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση διεργασίας αξιοποίησης υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας (Brewer's Spent Grains, BSG) με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών», εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άτομα τα οποία συνέβαλλαν για την επιτυχή πραγματοποίηση της προσπάθειάς μου.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου προς την επιβλέπουσα καθηγήτρια Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα και γενικότερα την καθοδήγηση, ελευθερία και υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη για την αμέριστη βοήθειά της. Με την συνεχή παροχή πληροφοριών και στήριξη σε οποιαδήποτε δυσκολία παρουσιαζόταν, έγινε εφικτή η υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλα μου τα κοντινά άτομα για την αγάπη και υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια όλων των ακαδημαϊκών ετών που φοιτούσα στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας αξιοποίησης υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας (Brewer's Spent Grains) με την χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES), οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των πράσινων διαλυτών. Η μέθοδος με την οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα είναι η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση, μια πράσινη τεχνική παροχής υψηλής ενέργειας, με σκοπό την επίτευξη μεγάλων αποδόσεων στην παραλαβή των επιθυμητών βιοδραστικών ενώσεων από την πρώτη ύλη.

Η επιλογή των υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας έγινε με αφορμή την σημασία που εμφανίζουν ως παραπροϊόν πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις. Στην παρούσα εργασία η αξιοποίησή τους γίνεται μέσω της παραλαβής εκχυλισμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας με χρήση πράσινων μεθόδων και διαλυτών.

Για την μέθοδο των εκχυλίσεων απαιτήθηκε αρχικά ο σχεδιασμός και η σύνθεση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES). Η παρασκευή τους προέρχεται από φιλικά προς το περιβάλλον επιμέρους συστατικά (υδροξυ-οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανία και στην ανάπτυξη προϊόντων με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο) προσδίδοντας πράσινο χαρακτήρα στην συνολική διεργασία. Η χρήση των NaDES ως διαλύτες εκχύλισης σε συνδυασμό με την εφαρμογή τεχνικών υψηλής ενέργειας, όπως οι υπέρηχοι, οδηγούν σε μειωμένο χρόνο εκχύλισης παρέχοντας ταυτόχρονα υψηλούς βαθμούς απόδοσης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η παραγωγή πέντε φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών NaDES για τη διεργασία εκχύλισης και προσδιορίστηκε, ύστερα από μια σειρά πειραμάτων, ο καταλληλότερος εξ' αυτών όσον αφορά σε παραμέτρους όπως το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων. Ως καταλληλότερος διαλύτης επιλέχθηκε ο NaDES βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3) και ακολούθησε μια σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων. Συγκεκριμένα, μεταξύ των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικής επεξεργασίας υπολείμματα βύνης, ως προς το καβούρδισμα τους από την ζυθοποιία, την μέθοδο ξήρανσης και την κοκκομετρία.

Η διαδικασία επεξεργασίας της πρώτης ύλης BSG που επιλέχθηκε ήταν η ξήρανση των υπολειμμάτων βύνης με την μέθοδο της λυοφίλοποίησης (freeze drying), η χρήση του αποξηραμένου BSG μικρότερης κοκκομετρίας και διατήρησή του σε ψυχρό περιβάλλον.

Επιπλέον από τα πειράματα αυτά, έγινε προσέγγιση τα εύρη τιμών της εκάστοτε μεταβλητής που ορίστηκαν στην συνέχεια για τον πειραματικό σχεδιασμό.

Η διεργασία εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε μέσω του πειραματικού σχεδιασμού Taguchi λαμβάνοντας ως παραμέτρους μελέτης τον χρόνο εκχύλισης (Time), την ισχύ των υπερήχων (Power) και την περιεκτικότητα NaDES στο σύστημα διαλύτη NaDES-Νερό (%NaDES) και ως μεταβλητές απόκρισης το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Η χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων BSG εκφρασμένο σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος προς g πρώτης ύλης BSG. Ενώ με την μέθοδο χλωριούχου αργιλίου με ένωση αναφοράς την κατεχίνη προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις.

Τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από υπερήχους παρουσίασαν διακύμανση των τιμών τους, αναλόγως με τις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης. Με την χρήση του εργαλείου Minitab και την εντολή βελτιστοποίησης μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού προέκυψαν ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για ταυτόχρονη μεγιστοποίηση TPC και TFC οι εξής: Χρόνος εκχύλισης $Time_{opt} = 24.39 \text{ min}$, Ισχύς υπερήχων $Power_{opt} = 46,97\% (187.94\text{Watt})$ και περιεκτικότητα του διαλύτη σε NaDES, $\%NaDES_{opt} = 73.03\%NaDES (26.97\% H_2O)$.

Τέλος, με την πραγματοποίηση πειραμάτων επιβεβαίωσης λήφθηκαν αποτελέσματα που υπέδειξαν καλή προσαρμογή του μοντέλου καθιστώντας το στατιστικά σημαντικό (ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων $TPC = 25.891 \text{ mg}_{GAE}/g_{BSG}$ και φλαβονοειδών $TFC = 14.652 \text{ mg}_{Cat}/g_{BSG}$).

Λέξεις- Κλειδιά: Μπίρα, ζυθοβιομηχανία, υπολείμματα βύνης (BSG), Πράσινη Χημεία, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES), Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE), πειραματικός σχεδιασμός Taguchi, ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), ολικών περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC).

Abstract

The purpose of this study is the development and optimization of the Brewer's Spent Grains utilization process using natural deep eutectic solvents (NaDES), which belong to the category of green solvents. The method by which the experiments were carried out is ultrasonically assisted extraction, a green technique of high energy delivery, with the aim of applying high yields in obtaining the desired bioactive compounds from the raw material.

The selection of malt residues from the brewing industry was made due to the importance they display as a by-product rich in bioactive compounds. In the present work, their utilization is done through the receipt of extracts of high added value using green methods and solvents.

The extraction method initially required the design and synthesis of natural deep eutectic solvents (NaDES). Their preparation comes from environmentally friendly individual components (hydroxy-acids, amino acids, sugars which are already used to a large extent by industry and in the development of products with a final recipient in humans) giving a green character to the overall process. The use of NaDES as extraction solvents combined with the application of high energy techniques, such as ultrasound, lead to reduced extraction time while providing high yields.

Initially, the design and production of five naturally deep eutectic NaDES solvents for the extraction process was carried out and, after a series of experiments, the most suitable of them was determined in terms of parameters such as the total content of phenolic and flavonoid compounds of the extracts. NaDES betaine-glycerol (1:3) was chosen as the most suitable solvent and a series of preliminary experiments followed. Specifically, among the experiments, malt residues were used with different processing, in terms of their roasting by the brewery, the drying method and the granulometry.

The process of processing the BSG raw material that was chosen was the drying of the malt residues with the freeze drying method, the use of the dried BSG of smaller grain size and its preservation in a cold environment.

In addition to these experiments, the limits of each variable were approximated, which were then defined for the experimental design.

The extraction process was optimized through the Taguchi experimental design taking as study parameters the extraction time (Time), the power of ultrasound (Power) and the NaDES content in the NaDES-Water solvent system (%NaDES) and as response variables the total content of phenolic compounds (TPC) and flavonoid compounds (TFC).

The use of the Folin-Ciocalteu method was used to quantify the total phenolic content of the BSG extracts expressed as mg of gallic acid equivalent per gram of raw BSG. While with the aluminum

chloride method with the reference compound catechin, the total content of flavonoid compounds was determined.

The results of ultrasound-assisted extractions showed variation in their values, depending on the different extraction conditions. Using the Minitab tool and the model optimization command of the experimental design, the following data emerged as optimal extraction conditions for simultaneous TPC and TFC maximization: Extraction time: 24.39 min, Ultrasound power: 46.97% (187.94Watt) and NaDES content of the solvent: 73.03 %NaDES-26. 97% H₂O.

Finally, by carrying out confirmation experiments, results were obtained that indicated a good fit of the model making it statistically significant (total phenolic compounds content TPC = 25,89 mgGAE/gBSG and flavonoids TFC = 14,65 mgCat/gBSG).

Keywords: Beer, brewing industry, malt residues (BSG), Green Chemistry, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES), Ultrasonic Assisted Extraction (UAE), Taguchi experimental design, total content of flavonoid compounds (TFC), total content of phenolic compounds (TPC).

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----|
| Ευχαριστίες | II |
| Περίληψη | III |
| Abstract | V |
| Περιεχόμενα | VII |
| Ευρετήριο Πινάκων | IX |
| Ευρετήριο Εικόνων | XI |
| Ευρετήριο Διαγραμμάτων | XII |
| 1. Θεωρητικό Μέρος | 1 |
| 1.1 Εισαγωγή | 1 |
| 1.2 Διαδικασία παραγωγής μπίρας | 3 |
| 1.2.1 Βυνοποίηση | 3 |
| 1.2.2 Ξήρανση | 3 |
| 1.2.3 Στίλβωση | 4 |
| 1.2.4 Ζυθοποίηση | 5 |
| 1.2.5 Φιλτράρισμα | 5 |
| 1.2.6 Εμφιάλωση και αποθήκευση | 5 |
| 1.3 Υπολείμματα Ζυθοβιομηχανίας BSG | 6 |
| 1.3.1 Σύσταση Υπολειμμάτων Βύνης | 8 |
| 1.3.2 Πιθανοί τρόποι αξιοποίησης Υπολειμμάτων BSG | 10 |
| 1.4 Εκχύλιση | 13 |
| 1.4.1 Μέθοδοι εκχύλισης | 14 |
| 1.4.2 Παράμετροι επίδρασης στην εκχύλιση με υπερήχους | 15 |
| 1.5 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες | 15 |
| 1.5.1 Βασικά πλεονεκτήματα βαθέως ευτηκτικών διαλυτών | 18 |
| 1.5.2 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) | 19 |
| 1.5.3 Ιδιότητες Φυσικά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών: | 19 |
| 1.5.4 Μέθοδοι Παρασκευής NaDES | 20 |
| 1.5.5 Συνεισφορά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών σε διεργασίες εκχύλισης: | 21 |

| | |
|---|----|
| 1.6 Διαδικασία εκχύλισης φαινολικών ενώσεων | 21 |
| 1.7 Πράσινη Χημεία | 22 |
| 1.7.1 Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας..... | 23 |
| 1.8 Πειραματικός Σχεδιασμός | 24 |
| 1.8.1 Οκτώ βήματα της Μεθοδολογίας Taguchi | 25 |
| 2. Πειραματικό μέρος: | 27 |
| 2.1 Σκοπός..... | 27 |
| 2.2 Πειραματική διαδικασία..... | 27 |
| 2.2.1 Επεξεργασία πρώτης ύλης..... | 28 |
| 2.2.2 Ξήρανση με Θέρμανση | 29 |
| 2.2.3 Ξήρανση με Λυοφιλοποίηση | 29 |
| 2.2.4 Κοκκομετρία..... | 29 |
| 2.2.4 Διαδικασία παρασκευής φυσικά Βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES | 30 |
| 2.2.5 Εκχύλιση υπολειμμάτων βύνης με παρουσία NaDES και υπερήχων: | 33 |
| 2.2.6 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis..... | 35 |
| 2.2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός (Taguchi) | 39 |
| 3. Αποτελέσματα και Συζήτηση | 42 |
| 3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων εκχύλισης | 42 |
| 3.1.1. Σχεδιασμός Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών | 42 |
| 3.1.2. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων | 42 |
| 3.2 Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού | 45 |
| 3.3 Επιβεβαίωση Μοντέλου και Βελτιστοποίηση διεργασίας..... | 51 |
| 3.3.1 Ανάλυση Μοντέλου ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών | 52 |
| 3.3.2 Ανάλυση Μοντέλου ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών συστατικών | 54 |
| 3.3.3 Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση..... | 57 |
| 3.3.4 Επιβεβαίωση και σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων | 59 |
| 4. Συμπεράσματα..... | 62 |
| 5. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα | 64 |
| 6. Βιβλιογραφία | 65 |

Ευρετήριο Πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1 Κυριότερα συστατικά των BSG ¹³ | 10 |
| Πίνακας 2:Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. | 27 |
| Πίνακας 3: Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων | 28 |
| Πίνακας 4: Αναλογίες και συνθήκες παρασκευής διαλυτών | 30 |
| Πίνακας 5: Επιμέρους ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τω διαλυτών..... | 31 |
| Πίνακας 6: Επιμέρους ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή τω διαλυτών..... | 31 |
| Πίνακας 7: Συνθήκες εκτέλεσης προκαταρκτικών πειραμάτων | 40 |
| Πίνακας 8: Διαφορετικές ποικιλίες πρώτης ύλης BSG που μελετήθηκαν | 40 |
| Πίνακας 9: Τιμές μεταβλητών (3 επίπεδα) του Πειραματικού Σχεδιασμού Taguchi | 41 |
| Πίνακας 10: Αναλυτικός πίνακας δεδομένων Πειραματικού Σχεδιασμού Taguchi (9 επιπέδων) | 41 |
| Πίνακας 11: Συνθήκες εκχύλισης προκαταρκτικών πειραμάτων..... | 42 |
| Πίνακας 12: Συνθήκες εκχύλισης πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού Taguchi | 45 |
| Πίνακας 13: Βαθμοί επίδρασης και σημαντικότητας των ορισμένων μεταβλητών στην εκχύλιση | 47 |
| Πίνακας 14: Ανάλυση παλινδρόμησης για ολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε Φαινολικές ενώσεις..... | 52 |
| Πίνακας 15: Σύνοψη μοντέλου | 52 |
| Πίνακας 16: Συντελεστές μεταβλητών εξίσωσης παλινδρόμησης | 52 |
| Πίνακας 17: Ανάλυση παλινδρόμησης για Φλαβονοειδή ενώσεις | 54 |
| Πίνακας 18: Σύνοψη μοντέλου | 55 |
| Πίνακας 19: Συντελεστές μεταβλητών εξίσωσης παλινδρόμησης | 55 |
| Πίνακας 20: Τιμές μεταβλητών και αποτελέσματα βέλτιστων συθνηκών πειραματικού σχεδιασμού | 58 |
| Πίνακας 21: Εύρος επιτρεπτών ορίων αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού | 58 |

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μελετών δέσμευσης φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της εκχύλισης 60

Ευρετήριο Εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1: Διάγραμμα ροής διαδικασίας Ζυθοποίησης..... | 4 |
| Εικόνα 2: Αποθήκευση μπίρας σε μπουκάλι..... | 6 |
| Εικόνα 3: Υπολείμματα Βύνης (BSG) | 7 |
| Εικόνα 4: Εγκάρσια τομή κόκκου κριθαριού ¹¹ | 8 |
| Εικόνα 5: Ιδιότητες DES: Χαμηλό σημείο ζέσεως, βιοαποδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα, ιξώδες και αγωγιμότητα, πολικότητα, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Εφαρμογές DES: Φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα, βιοκατάλυση, σύνθεση ναουϋλικών, διαχωρισμός μορίων, μέσο εκχύλισης. ³⁴ | 18 |
| Εικόνα 6: Μοριακή δομή χλωριούχου χολίνης | 19 |
| Εικόνα 7: Μερικοί από τους συνηθέστερους δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου ³⁶ | 20 |
| Εικόνα 8: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας ⁴⁵ | 23 |
| Εικόνα 9: Ανοιχτόχρωμη βύνη, μικρής κοκκομετρίας (<1mm) | 29 |
| Εικόνα 10: Ανοιχτόχρωμη βύνη, μεγάλης κοκκομετρίας (>1mm) | 29 |
| Εικόνα 11: Σκουρόχρωμη (κόκκινη) βύνη, μικρής κοκκομετρίας (<1mm)..... | 30 |
| Εικόνα 12: Οι διαλύτες NaDES που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο οργανικής χημείας για την πραγματοποίηση της διερεύνησης του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από BSG..... | 32 |
| Εικόνα 13: : Αντίδραση παραγωγής NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη (1:3)..... | 32 |
| Εικόνα 14: Διαλύτης βεταΐνη-γλυκερόλη (1:3)..... | 33 |
| Εικόνα 15: Συσκευή υπερήχων με probe | 34 |
| Εικόνα 16: Εκχυλίσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις | 35 |

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

| | |
|---|----|
| Διάγραμμα 1: Διάγραμμα φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών δύο φάσεων ³¹ | 16 |
| Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος..... | 36 |
| Διάγραμμα 3:Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κατεχίνης..... | 38 |
| Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων | 43 |
| Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού Taguchi | 46 |
| Διάγραμμα 6: Λόγοι S/N που προέκυψαν κατά την μελέτη της επίδρασης των μεταβλητών ελέγχου στην ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων | 47 |
| Διάγραμμα 7: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του πειραματικού σχεδιασμού κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων | 50 |
| Διάγραμμα 8: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του πειραματικού σχεδιασμού κατά την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων | 51 |
| Διάγραμμα 9: Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την βελτιστοποίηση των τιμών TPC | 54 |
| Διάγραμμα 10: : Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την βελτιστοποίηση των τιμών TFC | 56 |
| Διάγραμμα 11: Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με ταυτόχρονη βελτιστοποίηση της διεργασίας ως προς τις τιμές TPC και TFC. | 57 |
| Διάγραμμα 12: Ολικό περιεχόμενο TPC και TFC για το εκχύλισμα βέλτιστων συνθηκών (Time _{opt} = 24.39min, Power _{opt} = 46.97%,%NaDES _{opt} = 73%) | 59 |
| Διάγραμμα 13: Αποτελέσματα TPC και TFC για ανοιχτόχρωμη βύνη στις βέλτιστες συνθήκες (Time _{opt} = 24.39min, Power _{opt} = 46.97%,%NaDES _{opt} = 73%) | 61 |

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Στις μέρες μας, υπάρχει μεγάλη πολιτική και κοινωνική πίεση για μείωση της ρύπανσης που προκύπτει από βιομηχανικές δραστηριότητες. Σχεδόν όλες οι ανεπτυγμένες και υπανάπτυκτες χώρες προσπαθούν να προσαρμοστούν σε αυτή την πραγματικότητα τροποποιώντας τις διαδικασίες τους έτσι ότι τα υπολείμματά τους να είναι ανακυκλώσιμα. Κατά συνέπεια, οι περισσότερες μεγάλες εταιρείες δεν θεωρούν πλέον τα υπολείμματα ως απόβλητα, αλλά ως πρώτη ύλη για άλλες διεργασίες. Η βιομηχανία της ζυθοποιίας παράγει σχετικά μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων και αποβλήτων όπως χρησιμοποιημένα σιτηρά, λυκίσκο και μαγιά η οποία είναι η πιο κοινή. Ωστόσο, όπως και τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα, μπορούν εύκολα να ανακυκλωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν. Έτσι, σε σύγκριση με άλλες βιομηχανίες, η ζυθοποιία και η βιομηχανία της τείνει να είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον. Το χρησιμοποιημένο κριθάρι είναι το πιο άφθονο υποπροϊόν της ζυθοποιίας, που αντιστοιχεί περίπου στο 85% των συνολικών παραγόμενων παραπροϊόντων. Σύμφωνα με τον Townsley (1979), τα χρησιμοποιημένα σιτηρά αντιπροσωπεύουν, κατά μέσο όρο, το 31% του αρχικού βάρους βύνης, η οποία αναλογεί σε περίπου 20 kg ανά 100 λίτρα παραγόμενης μπίρας. Τα χρησιμοποιημένα πλέον σιτηρά της ζυθοποιίας (BSG) διατίθεται με χαμηλό ή χωρίς κόστος καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και παράγονται σε μεγάλες ποσότητες όχι μόνο από μεγάλες, αλλά και μικρές ζυθοποιίες.

Μερικοί ανθρωπολόγοι πιστεύουν ότι ο άνθρωπος απομακρύνθηκε από την ύπαρξη κυνηγού-συλλεκτών σε μια εγκατεστημένη ύπαρξη βασισμένη στη γεωργία, κυρίως για να καλλιεργήσει αρκετά σιτηρά για να παρασκευάσει μεγάλες ποσότητες μπίρας. Αυτό φαίνεται να μην έχει αποδειχθεί, αλλά η σκέψη ότι η μπίρα θα ήταν ένα ισχυρό κίνητρο για τους νεολιθικούς ανθρώπους δεν θα ήταν έκπληξη. Ουσιαστικά ολόκληρο το ζωικό βασίλειο, από έντομα μέχρι ελέφαντες, έως μαϊμούδες, δείχνει μια σαφή προτίμηση στην κατανάλωση αιθανόλης.^{1,2}

Η ιστορία της μπίρας ξεκινάει πριν μερικές χιλιάδες χρόνια. Συγκεκριμένα πριν από το 6000 π.Χ. γινόταν η παρασκευή της από κριθάρι σε περιοχές όπως η Βαβυλώνα και στο Σουμέρ (το σημερινό Ιράκ), το οποίο συνθλιβόταν και σε συνδυασμό με νερό και ξήρανση έπαιρνε την μορφή κέικ, το οποίο στη συνέχεια όταν διαλυόταν σε νερό έδινε ένα εκχύλισμα, το οποίο δημιουργούνταν μέσω ζύμωσης από μικροοργανισμούς που συσσωρευόντουσαν στις επιφάνειες των δοχείων ζύμωσης. Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι Βαβυλώνιοι ήξεραν να φτιάχνουν 20 διαφορετικούς τύπους μπίρας, αλλά σε σύγκριση με τις τωρινές μπίρες διέφεραν αρκετά ως προς την διαύγεια και γεύση καθώς ήταν αφιλτράριστες μιας και δεν είχαν την δυνατότητα να απομακρύνουν τα υπολείμματα μετά το πέρας της ζύμωσης.

Η ιστορία της μπίρας εκτείνεται με τα χρόνια και σε άλλες περιοχές του κόσμου. Η αρχαία Ελλάδα και η Ρώμη, με άφθονα αποθέματα κρασιού, ποτέ δεν ενασχολήθηκαν με την παραγωγή μπίρας σε μεγάλο βαθμό. Όμως, καθώς η Ρώμη απείχε από τα εδάφη της και προσπαθούσε να χτίσει μια αυτοκρατορία, πέρασαν τα βουνά και βρήκαν στην άλλη πλευρά αγριεμένους ανθρώπους, συχνά έτοιμους για μάχη με τεράστια αποθέματα μπίρας. Ο Πλίνιος, στη Φυσική Ιστορία του, σημείωσε ότι «ο πληθυσμός της δυτικής Ευρώπης έχει ένα υγρό με το οποίο μεθάει τον εαυτό του, φτιαγμένο από σιτηρά και νερό. Ο τρόπος παρασκευής του είναι κάπως διαφορετικός στη Γαλατία, την Ισπανία και άλλες χώρες, και ονομάζεται με διαφορετικά ονόματα, αλλά η φύση και οι ιδιότητές του είναι παντού ίδιες. Ειδικά οι άνθρωποι στην Ισπανία παρασκευάζουν αυτό το υγρό τόσο καλά που θα διατηρηθεί για πολύ καιρό.

Στο νότο της σημερινής Γερμανίας, οι Ρωμαίοι συνάντησαν τους Κέλτες και στο βορρά βρήκαν τους Γερμανούς, οι οποίοι είχαν ακολουθήσει τους Κέλτες στη Δυτική Ευρώπη από την Ασία. Αυτές οι φυλές, σε αντίθεση με τους Ρωμαίους, ήταν σε μεγάλο βαθμό αναλφάβητες, αλλά ήταν αρκετά ικανές στην παρασκευή μπίρας.

Κατά τη διάρκεια των 500 ετών του Σκοτεινού Αιώνα, από το 500 έως το 1000 μ.Χ., η ζυθοποιία συνεχίστηκε, αλλά σε μεγάλο βαθμό χωρίς πρόοδο. Οι ρυθμοί εξέλιξης μέσα στα μοναστήρια ήταν πιο γρήγοροι, αλλά οι μοναχοί κρατούσαν την τέχνη της μπίρας για τον εαυτό τους. Η τήξη χαλκού είχε χρησιμοποιηθεί από την εποχή του Χαλκού, αλλά μέχρι τώρα, οι βραστήρες ζυθοποιίας στην Ευρώπη ήταν σε μεγάλο βαθμό μικρές σκάφες, κατάλληλες για νοικοκυριά. Τώρα εγκατεστημένοι σε μεγαλύτερες κοινότητες, οι Ευρωπαίοι άρχισαν να χτίζουν ζυθοποιεία σε κλίμακα που δεν είχε δει η ανθρωπότητα ξανά από τις ημέρες της αρχαίας Αιγύπτου. Τα ζυθοποιεία μετακόμισαν από τις κουζίνες σε ειδικά κατασκευασμένες εγκαταστάσεις, με μηχανήματα βυνοποίησης, δοχεία πολτοποίησης, περιοχές ζύμωσης και επιτελεία εκπαιδευμένων εργατών. Το άρωμα για την μπίρα ήταν συνήθως ένα μείγμα βοτάνων που ονομαζόταν καρπός, αλλά σε ορισμένες περιοχές χρησιμοποιήθηκε και ο λυκίσκος. Στις αρχές του 800 μ.Χ., οι μοναχοί του μοναστηριού του St. Gallen στην Ελβετία είχαν κατασκευάσει την πρώτη επιχείρηση ζυθοποιίας πλήρους κλίμακας στην Ευρώπη, εκατοντάδες χρόνια νωρίτερα από την εποχή της. Η κάτοψη του ζυθοποιείου, που αποκτήθηκε το 820 μ.Χ., θα ήταν ουσιαστικά γνώριμη σε κάθε σύγχρονο ζυθοποιό.

Στη συνέχεια η βιομηχανική επανάσταση έφερε και την μηχανοποίηση της μπίρας. Αναλυτικότερα, γινόταν καλύτερος έλεγχος των διαδικασιών, με χρήση οργάνων όπως θερμόμετρο, σακχαρόμετρο (το οποίο αναπτύχθηκε στην Βρετανία) καθώς και με την ανάπτυξη εξοπλισμού παρασκευής πάγου έγινε εφικτή η παραγωγή μπίρας Lager και το καλοκαίρι.³

1.2 Διαδικασία παραγωγής μπίρας

Για την παραγωγή ενός από τα πιο διαδεδομένα σε κατανάλωση ποτά έχει δημιουργηθεί μια συγκεκριμένη σειρά βημάτων έτσι ώστε να παραχθεί η μπίρα που όλοι γνωρίζουν. Παρακάτω παρουσιάζονται τα κυριότερα βήματα που πραγματοποιούνται κατά την παραγωγή της μπίρας.

1.2.1 Βυνοποίηση

Η ζυθοποίηση ξεκινά με ωμό κριθάρι, σιτάρι, βρόμη ή σίκαλη. Στη συνέχεια, οι κόκκοι ξηραίνονται σε κλίβανο και μερικές φορές ψήνονται, μια διαδικασία που συνήθως λαμβάνει χώρα σε ξεχωριστή τοποθεσία από το ζυθοποιείο.

Στο ζυθοποιείο, η βύνη αποστέλλεται μέσω ενός μύλου αλεσμάτων, ανοίγοντας το φλοιό των πυρήνων, γεγονός που βοηθά στην έκθεση των αμύλων κατά τη διαδικασία πολτοποίησης. Η διαδικασία της απότομης άλεσης ή του εμποτισμού των κόκκων πριν από το άλεσμα, είναι επίσης μια επιλογή για ζυθοποιούς μεγάλης κλίμακας. Ο συνδυασμός διαφορετικών τύπων σιτηρών που χρησιμοποιούνται από έναν ζυθοποιό για την παρασκευή μιας μπίρας ονομάζεται συχνά grist bill.

Αρχικά παίρνει την μορφή που χρειάζεται η πρώτη ύλη το κριθάρι για να ακολουθήσουν τα επόμενα βήματα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται βυνοποίηση κατά την οποία οι κόκκοι κριθαριού καθαρίζονται από σκόνες και ξένους μικροοργανισμούς έτσι ώστε να μετατραπούν σε επεξεργάσιμη για την μετέπειτα διαδικασία ζύμωσης βύνη.

Η επεξεργασία εγκαινιάζεται στις δεξαμενές διαβροχής, που περιέχουν όπως μαρτυρά και το όνομα τους μεγάλη περιεκτικότητα νερού. Σε αυτές το κριθάρι αφήνεται να μουλιάσει για 2 με 3 μέρες περίπου. Μόλις περάσουν γίνεται ένας ποιοτικός διαχωρισμός, στον οποίο αφαιρούνται οι κόκκοι που επιπλέουν και συγκεντρώνονται οι μουλιασμένοι κόκκοι με το ζητούμενο ποσοστό υγρασίας, ώστε να μεταφερθούν στα δοχεία βλάστησης. Εκεί, δημιουργείται η πράσινη βύνη μέσω σταθερών και ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασιών και υγρασίας, καταλήγοντας να έχει το διπλάσιο μήκος από την αρχική μορφή του σπόρου. Η προαναφερθείσα διαδικασία διαρκεί περίπου 7-10 ημέρες για την ολοκλήρωσή της.

1.2.2 Ξήρανση

Έπειτα ακολουθεί η ξήρανση της πράσινης βύνης, ή αλλιώς φρύξη. Η θερμοκρασία στη φάση φρύξης, που κρατάει μία μέρα, κυμαίνεται από 85-105 βαθμούς κελσίου και στο τέλος της το ποσοστό νερού στη ξηρή βύνη είναι 2-3% σε σύγκριση με την αρχική πράσινη βύνη που έφτανε το 45%. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί και ένα ακόμη βήμα το οποίο πραγματοποιείται ανάλογα με το είδος βύνης που είναι επιθυμητό να παραχθεί και είναι η κατεργασία καβουρντίσματος. Μέσω αυτής της κατεργασίας, γίνεται η παραλαβή καστανής και σκούρας βύνης και την παρασκευή κόκκινων και μαύρων μπυρών. Μάλιστα όσο πιο έντονο είναι αυτό το καβουρντίσμα τόσο πιο βαθιά και σκούρα είναι τα χρώματα της παραγόμενης μπίρας. Όπως η

βύνη που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές μελέτες αυτής της διπλωματικής εργασίας, είχε δεχθεί την επεξεργασία καβουρντίσματος και ήταν χρώματος «κόκκινου».

1.2.3 Στίλβωση

Μετά το στάδιο της φρύξης με ή χωρίς επιπλέον επεξεργασία έρχεται η στίλβωση της βύνης, που δεν είναι τίποτα άλλο από μια φάση καθαρισμού για να γίνει η άλεση και στη συνέχεια ο βρασμός της θρυμματισμένης βύνης με κατεργασμένο νερό.

Σειρά έχει η παραγωγή του ζυθογλεύκος το οποίο κατά την συνεύρεση του νερού και της βύνης δρουν διάφορα ένζυμα και διασπούν τα συστατικά της βύνης σε σάκχαρα και πρωτεΐνες. Αυτό το μείγμα μεταφέρεται σε λέβητες ψησίματος στους 78 βαθμούς κελσίου και σχηματίζει το ζυθογλεύκος. Σε αυτό το στάδιο είναι και η στιγμή κατά την οποία θα γίνει η προσθήκη του λυκίσκου, ο οποίος χαρακτηρίζεται και ως η "Ψυχή" της μπίρας καθώς αυτός καθορίζει το πόσο πικρή και έντονη είναι η γεύση της μπίρας ή οποία είναι επιθυμητή να κατασκευαστεί. Επιστρέφοντας στο ζυθογλεύκος, αφού τελειώσει ο επιθυμητός χρόνος βρασμού βάσει της πυκνότητας της εκάστοτε μπίρας, πραγματοποιείται μεταφορά μέσω αντλιών σε αναδευτήρες για την απομάκρυνση στερεών υπολειμμάτων καθώς και ρυθμίζεται η θερμοκρασία μέσω εναλλακτών θερμότητας, διότι είναι αναγκαία η πτώση θερμοκρασίας καθώς από τις υψηλές θερμοκρασίες βρασμού δεν είναι εφικτή η προσθήκη της μαγιάς έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ζυθοποίηση μέσω της ζύμωσης.



Εικόνα 1: Διάγραμμα ροής διαδικασίας Ζυθοποίησης

1.2.4 Ζυθοποίηση

Κατά το βρασμό και την παραλαβή του ζυθογλεύκου μετατράπηκαν τα σάκχαρα της βύνης σε ζυμώσιμα, επομένως το παραπάνω ζυθογλεύκος μεταφέρεται στις δεξαμενές ζύμωσης όπου προστίθεται η μαγιά για να ξεκινήσει η ζύμωση, ενώ τα στερεά υπολείμματα βύνης συλλέγονται και διατίθενται για ζωοτροφή.

Ανεξάρτητα από το είδος μαγιάς που θα επιλέξουμε (όπως αναφέραμε υπάρχουν δυο κατηγορίες οι μαγιές που δρουν στην επιφάνια και αντίθετα αυτές που λειτουργούν στο πάτο της δεξαμενής) , η δουλειά τους είναι να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα για να παραλάβουμε την μπίρα.

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως ανοξείδωτες με κωνικό πάτο και κυλινδρική κορυφή. Ο κωνικός πάτος που έχει άνοιγμα περίπου 60 μοιρών επιτρέπει την συλλογή των στερεών υπολειμμάτων και της ζύμωσης (στην περίπτωση των βυθοζυμών) στην κορυφή του και από εκεί την εύκολη απομάκρυνση τους. Παλιότερα χρησιμοποιούσαν ξύλινες δεξαμενές ή ανοιχτές. Μπορούμε και σήμερα να συναντήσουμε κάποιες ανοιχτές δεξαμενές κυρίως σε ζυθεσιατόρια της Ευρώπης αλλά σε αυτή τη περίπτωση χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στην διατήρηση της μύρας που έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο.

Σε γενικές γραμμές η ζύμωση με τη βοήθεια βυθοζυμών κρατάει 8-12 ημέρες , ενώ στη περίπτωση που συμμετέχουν αφροζύμες οι μέρες μειώνονται σε 2-5 . Μετά το τέλος της ζυθοποίησης λαμβάνει χώρα η περίοδος ωρίμανσης που γίνεται μέσα στις δεξαμενές σε χαμηλές θερμοκρασίες περίπου 0 – 2 βαθμούς κελσίου για 4 έως 8 βδομάδες (ανάλογα με το τύπο της μύρας ξανθιές ή σκούρες , γενικά οι ξανθιές θέλουν λιγότερο χρόνο από τις σκουρόχρωμες) . Την περίοδο αυτή οι μύρες εξελίσσονται , μαλακώνουν και καθαρίζουν.

1.2.5 Φιλτράρισμα

Μόλις περάσει ο χρόνος ξεκούρασης στις δεξαμενές τη σκυτάλη παίρνει η διαύγαση της μύρας ή αλλιώς το φιλτράρισμα. Είναι πολύ σημαντικό στάδιο και χρειάζεται προσοχή, γιατί από τη μια, από αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η σταθεροποίηση και η λαμπερή εικόνα της μύρας στο ποτήρι και από την άλλη θα πρέπει να έχει την σωστή ισορροπία για να μην χάνονται πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας που την κάνουν να ξεχωρίζει. Υπάρχουν λοιπόν πολλά είδη φίλτρων όπως και τρόποι φιλτραρίσματος. Τα πιο συνηθισμένα είναι αυτά που γίνονται με μια ειδική σκόνη που ονομάζεται γη διατόμου ή με εκείνα που χρησιμοποιούν κάποιες πλάκες με συγκεκριμένους πόρους που απομακρύνουν τα ανεπιθύμητα σωματίδια.

1.2.6 Εμφιάλωση και αποθήκευση

Η τεχνολογία σήμερα έχει προχωρήσει πολύ και υπάρχουν σε πολλές ζυθοποιίες αυτόματες μηχανές εμφιάλωσης που ξεπλένουν και στη συνέχεια, γεμίζουν μπουκάλια, προσθέτουν τις ετικέτες και τα πώματα. Σε μικροζυθοποιίες αυτό γίνεται πολλές φορές χειρωνακτικά και αν όχι όλο σίγουρα κάποια στάδια.

Πριν την εμφιάλωση συνήθως γίνεται παστερίωση (θέρμανση για την θανάτωση των διάφορων μικροοργανισμών) ο βαθμός της οποίας προσδιορίζεται ανάλογα με τον τρόπο αποθήκευσης της μπίρας και το χρονικό επιτρεπόμενο διάστημα κατανάλωσης της. Μην ξεχνάμε ότι οι μπίρες εμφιαλώνονται είτε σε βαρέλια, είτε σε μπουκάλια διαφορετικών λίτρων , είτε τέλος σε κουτάκια. Στα κουτάκια που κατά κύριο λόγο η παραμονή είναι μεγαλύτερη γίνεται και πιο έντονη παστερίωση.^{4,5}

Όσο αφορά στην τελική αποθήκευση η μπίρα, σαν ποτό με χαμηλό αλκοόλ είναι ευαίσθητη, θέλει λοιπόν προσοχή και δροσερό περιβάλλον μακριά από τον ήλιο και τις υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 2: Αποθήκευση μπίρας σε μπουκάλι

1.3 Υπολείμματα Ζυθοβιομηχανίας BSG

Η χρήση του BSG θεωρήθηκε σημαντική τόσο σε τρόφιμα, όσο και σε μη εδώδιμα προϊόντα, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, κατασκευές ή συσκευασίες τροφίμων. Το BSG είναι μια πολύτιμη πηγή μεμονωμένων συστατικών λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας και του χαμηλού κόστους του, που αξίζει να αξιοποιηθεί περισσότερο για τη μείωση της σπατάλης τροφίμων, αλλά και για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος. Από την άποψη της βιοοικονομίας, οι βιολογικοί πόροι μετατρέπονται σε βιοενεργειακά βιώσιμα και οικονομικά πολύτιμα προϊόντα. Το στάδιο προεπεξεργασίας της βιομάζας BSG διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης και στην απόδοση που επιτυγχάνεται κατά τη διεργασία αυτή.

Τα υπολείμματα βύνης (BSG) είναι το κύριο υποπροϊόν της βιομηχανίας ζυθοποιίας, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 85% των συνολικών παραγόμενων παραπροϊόντων.

Αναλυτικότερα BSG είναι ένα λιγνοκυτταρινικό υλικό που περιέχει περίπου 17% κυτταρίνη, 28% μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες, κυρίως αραβινοξυλάνες και 28% λιγνίνη. Διατίθεται σε μεγάλες ποσότητες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, αλλά η κύρια εφαρμογή του έχει περιοριστεί στη διατροφή των ζώων. Ωστόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες και φυτικές ίνες (περίπου 20% και 70% ξηρά βάση, αντίστοιχα), μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως θρεπτικό συμπλήρωμα στην ανθρώπινη διατροφή καθώς και κοσμητολογία.

Πρόσφατα, έχουν γίνει προσπάθειες να χρησιμοποιηθεί το BSG σε βιοτεχνολογικές διεργασίες, όπως στην καλλιέργεια μανιταριών και ακτινοβακτηρίων, ως πηγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ, ξυλόζη, αραβινόζη ή ως πρώτη ύλη για ξυλιτόλη, γαλακτικού οξέως, αιθανόλης, παραγωγή αραβιτόλης καθώς και ως πηγή πολυφαινολικών ενώσεων. Τα κύρια χαρακτηριστικά και οι πιθανές εφαρμογές του BSG επανεξετάζονται εστιάζοντας σε αυτές τις εναλλακτικές χρήσεις αυτού του αγροβιομηχανικού υποπροϊόντος ως πρώτη ύλη στα τρόφιμα, στην παραγωγή ενέργειας και σε βιοτεχνολογικές διεργασίες.^{6,7,8}

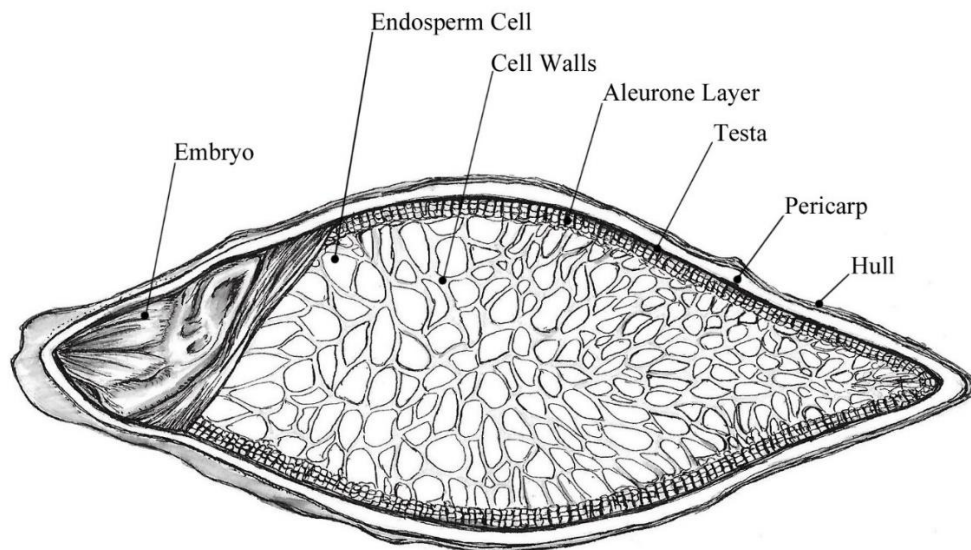


Εικόνα 3: Υπολείμματα Βύνης (BSG)

1.3.1 Σύσταση Υπολειμμάτων Βύνης

Το BSG αποτελείται από το στρώμα σπόρων-περικαρπίου-φλοιού που κάλυπταν τον αρχικό κόκκο κριθαριού. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της πολτοποίησης, μπορεί να παραμείνουν περισσότερο ή λιγότερο αμυλώδες ενδοσπέρμιο και τοιχώματα κενών κυττάρων αλευρώνης. Η περιεκτικότητα του σε άμυλο θα είναι χαμηλή και ενδέχεται να υπάρχουν ορισμένα υπολείμματα λυκίσκου που εισάγονται κατά την πολτοποίηση, ανάλογα με το καθεστώς παρασκευής που χρησιμοποιείται. Το BSG είναι μια ετερογενής ουσία, ιδιαίτερα όσον αφορά την παραλλαγή μεταξύ των ζυθοποιιών. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία των δημητριακών, ο χρόνος συγκομιδής, ο τύπος του λυκίσκου που προστέθηκε, το είδος βύνης και πολτοποίησης και κατά πόσον χρησιμοποιήθηκαν πρόσθετα κατά την παρασκευή.⁹

Το BSG είναι το κριθάρι το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στη παραγωγική διαδικασία έχει συμβάλει στην μονάδα παραγωγής μπίρας έχοντας προσδώσει μέρος από το περιεχόμενό του στο νερό κατά τη διάρκεια της ενζυματικής υδρόλυσης η οποία πραγματοποιείται κατά την παραγωγή ζυθογλεύκου και θεωρείται πλέον απόβλητο. Παρόλα αυτά, συνεχίζει να περιέχει σημαντικά στοιχεία όπως πρωτεΐνες, υπολείμματα κυτταρικών τοιχωμάτων και επικαλύμματα των σπόρων του κριθαριού.¹⁰



Εικόνα 4: Εγκάρσια τομή κόκκου κριθαριού¹¹

Τα κυριότερα μέρη που παρατηρούνται σε έναν κόκκο κριθαριού παρατίθενται στην συνέχεια:

1.2.1.1 Έμβρυο

Ένα κάλυμμα που οι βοτανολόγοι ονόμασαν περίβλημα καλύπτει το θηλυκό ωάριο σε ένα φυτό κριθαριού. Όταν ένα ωάριο κριθαριού ενώνεται με ένα σπερματοζωάριο, σχηματίζει έναν ζυγώτη, που περιέχει γονίδια και από τα δύο μητρικά φυτά. Οι ζυγώτες μεγαλώνουν σε έμβρυο σπόρων. Το περίβλημα που καλύπτει το ωάριο γίνεται το κάλυμμα του σπόρου του κριθαριού. Πολλοί σπόροι παραμένουν αδρανείς ή έχουν άλλες συνθήκες κάτω από τις οποίες οι σπόροι βλασταίνουν, τη διαδικασία με την οποία ένα φυτό αναδύεται από ένα έμβρυο. Οι σπόροι κριθαριού δεν έχουν ιδιαίτερη περίοδο λήθαργου. Όταν έχουν νερό και ζεστή θερμοκρασία αρκούν για να φυτρώσουν.

1.3.1.2 Ενδοσπέρμιο

Το προστατευτικό στρώμα του ενδοσπερμιακού ιστού περιβάλλει το έμβρυο, το οποίο βρίσκεται σε έναν ειδικό σάκο. Το ενδοσπέρμιο συλλέγει κυρίως λίπη, πρωτεΐνες και άμυλο για το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

1.3.1.3 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.

1.3.1.4 Στρώση αλευρώνης (Aleurone layer)

Είναι το 10% του συνολικού βάρους του κόκκου και βρίσκεται κάτω από το περίβλημα του. Η στρώση αλευρώνης συμβάλει στη σύνθεση και απελευθέρωση υδρολυτικών και αναγωγικών ενζύμων στο αμυλούχο ενδόσπερμα. Επιπλέον, τα κύτταρά της έχουν περιεκτικότητα σε: πρωτεΐνες (20%), λιπίδια (30%), πεντοσάνες, σουκρόζη, βιταμίνες B, β-γλυκάνες, φυτικό οξύ (IP6: ρυθμιστής pH) και ιχνοστοιχεία.

1.3.1.5 Περίβλημα – Κέλυφος (Testa)

Περίβλημα ονομάζεται η λεπτότερη στρώση του κόκκου με κύρια δομή του δύο λιπιδικές στοιβάδες. Εξασφαλίζει την διατήρηση αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους αποτρέποντας την διάχυσή τους από μέσα προς τα έξω.

1.3.1.6 Φλοιός (Hull)

Ο φλοιός 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 καθώς και σε αυτό περιέχονται οι περισσότερες από τις φαινολικές ενώσεις.¹²

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του BSG ποικίλλει επίσης αρκετά σημαντικά, αλλά συνήθως υπάρχει σε επίπεδα ~20% ανά βάση ξηρού βάρους. Οι πιο άφθονες είναι ορδεΐνες, γλουτελίνες, σφαιρίνες και λευκωματίνες. Τα απαραίτητα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν το ~30% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, με τη λυσίνη να είναι η πιο άφθονη (14,3%). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό επειδή η περιεκτικότητα της λυσίνης είναι συχνά χαμηλή σε τρόφιμα με δημητριακά. Επιπλέον, το BSG περιέχει μια ποικιλία ορυκτών, μεταξύ των οποίων το πυρίτιο, ο φώσφορος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο είναι τα πιο άφθονα.¹³

Πίνακας 1 Κυριότερα συστατικά των BSG¹³

| Συστατικό | gkg ⁻¹ | SD | % (μ.ό. κ.β.) |
|----------------|-------------------|------|---------------|
| Κυτταρίνη | 228.5 | 35.0 | 22 |
| Ημικυτταρίνη | 271.8 | 82.6 | 26 |
| Ξυλάνη | 180.3 | 38.6 | |
| Αραβινάνη | 77.0 | 18.4 | |
| Λιγνίνη | 195.4 | 58.8 | 19 |
| Ακέτυλο ομάδες | 12.5 | 2.1 | 1 |
| Πρωτεΐνες | 221.4 | 39.6 | 21 |
| Τέφρα | 30.2 | 16.6 | 3 |
| Εκχυλίσματα | 86.7 | 25.5 | 8 |

1.3.2 Πιθανοί τρόποι αξιοποίησης Υπολειμμάτων BSG

Λόγω της πολύπλοκης σύνθεσης του BSG, θα μπορούσαν να υπάρχουν ποικίλες χρήσεις, μερικές από τις οποίες είναι πολύ γνωστές ενώ άλλες βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη. Μερικές από τις πιο διαδεδομένες και ωφέλιμες για τις ανάγκες του ανθρώπου αναφέρονται παρακάτω:

- **BSG ως Ζωοτροφή:** Το BSG χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή. Όταν χρησιμοποιείται μαζί με πηγές αζώτου (π.χ. ουρία), παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τα μηρυκαστικά. Το BSG είναι κατάλληλο ως ζωοτροφή για βοοειδή, πουλερικά, χοίρους και ψάρια. Χρησιμοποιείται για τη διατροφή των βοοειδών, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής γάλακτος. Το BSG μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή πρωτεΐνης για τη διατροφή των ψαριών και η αντικατάσταση 50% του αλεύρου σόγιας έχει αποδειχθεί η πιο συμφέρουσα, με τα ψάρια να παίρνουν βάρος στο τέλος των πειραμάτων.
- **BSG για τη παραγωγή ξυλιτόλης:** Η ξυλιτόλη είναι μια πολυόλη με γλυκαντική ισχύ παρόμοια με τη σακχαρόζη αλλά με χαμηλότερη θερμιδική αξία (2,4 έναντι 4,0 θερμίδες/g), επομένως μπορεί να καταναλωθεί και από άτομα με έλλειψη ινσουλίνης. Η ξυλιτόλη μπορεί να παραχθεί με μικροβιακή ζύμωση, τα BSG αποδεικνύεται ότι είναι μια πιο οικονομική εναλλακτική από άλλα λιγνοκυτταρινικά υλικά. Το πρώτο βήμα για τη λήψη ξυλιτόλης είναι η ζύμωση του υποστρώματος BSG με τη βοήθεια της ζύμης *Candida guilliermondii*. Από τη διαδικασία της ζύμωσης προκύπτει CO₂, το οποίο διαχωρίζεται από τον βιοαντιδραστήρα. Ο ζυμός ακολουθεί τις διεργασίες εξάτμισης σε θερμοκρασία 40 °C και κρυστάλλωσης αιθανόλης για να αυξηθεί η αδιαλυτότητα της ξυλιτόλης στους 5°C. Για να διαχωριστεί η κρυσταλλωμένη ξυλιτόλη από τη μελάσα, χρησιμοποιείται φυγοκέντρηση, με αποτέλεσμα την απόδοση μεταξύ 87-92%.
- **Παραγωγή Γαλακτικού Οξέος:** Το BSG έχει αξιολογηθεί ως η πρώτη ύλη για την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) έχει βιοπλαστικές εφαρμογές και το BSG είναι πρόδρομος στην απόκτησή του. Υπάρχουν μερικοί τρόποι παραγωγής γαλακτικού οξέος, σε έναν από αυτούς η διαδικασία ξεκινά με την ενζυματική σακχαροποίηση της κυτταρίνης. Στη συνέχεια, το κυτταρινικό υλικό πλένεται με νερό μέχρι να εξουδετερωθεί και να στεγνώσει μέχρι και 10%. Τα μη μετατραπέντα συστατικά διαχωρίζονται με διήθηση κενού και η εξαιρετικά υδρολυμένη γλυκόζη ζυμώνεται, με αποτέλεσμα την απόδοση 0,96 g γαλακτικού οξέος ανά γραμμάριο γλυκόζης.
- **Παραγωγή αιθανόλης:** Τα λιγνινοκυτταρινικά υδρολύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο ζύμωσης για τη λήψη αιθανόλης. Οι κυτταρίνες διασπώνται σε γλυκόζη και οι ημικυτταρίνες διασπώνται σε ξυλόζη, αραβίνωση, μάνωση, γλυκόζη, οξικό οξύ και γαλακτόζη, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν με μικροοργανισμούς σε αιθανόλη. Χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι: χωριστή υδρόλυση ζύμωσης (SHF) και υδρόλυση και ταυτόχρονη ζύμωση (SSF). Οι Mussatto και Roberto (2006) χρησιμοποίησαν μια διαδικασία όξινης υδρόλυσης που είχε ως αποτέλεσμα μέγιστη συγκέντρωση 13,21 g/dm³ ξυλόζης, 8,21 g/dm³ αραβίνωση και 0,31 g/dm³ γλυκόζη υπό τις συνθήκες μέγιστης απόδοσης σακχάρου 19,6 g ξυλόζης/100 g. ξηρά ουσία και 8,3 g αραβίνωσης/100 g ξηρής ουσίας. Σύμφωνα με μελέτες που αναφέρθηκαν από τον

Mussatto (2014), η παραγωγή εύφλεκτης αιθανόλης πραγματοποιείται σε πέντε στάδια: προεπεξεργασία BSG (με όξινα θερμικά διαλύματα), υδρόλυση BSG με ένζυμα για τη μετατροπή αμύλου και κυτταρίνης σε απλά σάκχαρα, ζύμωση σακχάρων με αποτέλεσμα αιθανόλης, ακολουθούμενη από απόσταξη αιθανόλης και αφυδάτωση για την απομάκρυνση του νερού της.

- **Πηγή Φαινολικών Ενώσεων:** Οι φαινολικές ενώσεις στα φυτά αποτελούνται από διάφορα συστατικά: φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή, τανίνες, στυλβένιο και λιγνάνες. Τα BSG είναι μια γενναϊόδωρη πηγή υδροξυκινναμωμικών οξέων (HCA), τα οποία συσσωρεύονται στα κυτταρικά τοιχώματα και θεωρούνται η πιο σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών στα δημητριακά, τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή. Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται φυσικά αντιοξειδωτικά που σχετίζονται με ορισμένες χρόνιες ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο νευροεκφυλιστικός διαβήτης και ο καρκίνος. Τα φαινολικά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του καφεϊκού οξέος, του βανιλικού οξέος, της κερκετίνης και της επιγαλλοκατεχίνης, αναστέλλουν τον ισόμορφο της κυκλοοξυγενάσης, μειώνοντας τον κίνδυνο καρκίνου. Τα φαινολικά οξέα ομαδοποιούνται σε υδροξυκινναμωμικά οξέα (HCA) και υδροξυβενζοϊκά οξέα (HBA), τα τελευταία σε χαμηλές ποσότητες στο BSG. Το φερουλικό οξύ (FA) και το p-κουμαρικό οξύ (p-CA) είναι τα πιο άφθονα HCA στο BSG, με τιμές μεταξύ 35–490 mg/100 g ξηρής ουσίας. Το φερουλικό οξύ είναι το προϊόν-στόχος της BSG. Είναι ένα αντιοξειδωτικό που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα με βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και την προστασία του φυτού. Το φερουλικό οξύ έχει παρόμοιες ιδιότητες στον ανθρώπινο οργανισμό, προστατεύοντας το δέρμα και διατηρώντας το νέο, με αποτελέσματα παρόμοια με τη βιταμίνη C, καθιστώντας τα BSG πολύ καλή πρώτη ύλη και για τον τομέα της κοσμητολογίας. Είναι μια σταθερή και απαλή ένωση με το δέρμα που μειώνει τις αρνητικές επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών, επιβραδύνοντας σημαντικά τη γήρανση του δέρματος. Έχει επίσης εγκριθεί ως συντηρητικό σε πολλές χώρες για την πρόληψη της οξείδωσης των τροφίμων. Για αυτούς τους λόγους, η εκχύλιση και η ανάκτηση αυτών των ενώσεων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για έρευνα τόσο για τη βιομηχανία τροφίμων όσο και για τη βιομηχανία φαρμακευτικών/καλλυντικών.¹⁴
- **Άλλες εφαρμογές:** Το BSG μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή άνθρακα, την παραγωγή ρητινών, την παραγωγή ενός αντιαφριστικού παράγοντα στην μπίρα και την παραγωγή βακτηριοκίνης χρησιμοποιώντας *Lactococcus lactis* και *Enterococcus mundtii* με αντιμικροβιακή δράση κατά της *Lysteria monocytogenes* ως βιοδείκτη. Η αυξανόμενη ζήτηση για προϊόντα που λαμβάνονται με σταθερά συστατικά που λαμβάνονται από υποπροϊόντα τροφίμων διεγείρει την εύρεση καινοτόμων εναλλακτικών λύσεων για την απόκτησή τους. Η έννοια του βιοδιωλιστηρίου λέει ότι όλα

τα συστατικά της πρώτης ύλης μετατρέπονται σε προϊόντα εμπορικής σημασίας (π.χ. βιοκαύσιμα, ένζυμα, έλαια, θρεπτικά προϊόντα) και υιοθετείται σε πολλούς τομείς για ολοκληρωμένη παραγωγή τροφίμων. Ο Mussatto και οι συνεργάτες του (2013) ανέπτυξαν ένα ολοκληρωμένο σύστημα για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ξυλιτόλης, ενεργού άνθρακα και φαινολικών οξέων.

- ο Βιοβασισμένη οικονομία είναι μια οικονομία που βασίζεται στη χρήση βιομάζας πρώτης ύλης για τρόφιμα, ενέργεια, χημικά και άλλα υλικά. Η χρήση της βιομάζας ως πρώτης ύλης για την παραγωγή των προαναφερθέντων αποφέρει κοινωνικά οφέλη και οικονομικές δυνατότητες και εξασφαλίζει μείωση των εκπομπών άνθρακα.¹⁵

1.4 Εκχύλιση

Η εκχύλιση στη χημεία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού που αποτελείται από το διαχωρισμό μιας ουσίας από μια μήτρα. Τα κοινά παραδείγματα περιλαμβάνουν την εκχύλιση υγρού-υγρού και την εκχύλιση στερεάς φάσης. Η κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο φάσεων είναι μια κατάσταση ισορροπίας που περιγράφεται από τη θεωρία κατανομής. Αυτό βασίζεται ακριβώς στον τρόπο με τον οποίο η αναλυόμενη ουσία μετακινείται από τον αρχικό διαλύτη στον διαλύτη εκχύλισης. Ο όρος πλύση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να αναφέρεται σε μια εκχύλιση στην οποία οι ακαθαρσίες εκχυλίζονται από τον διαλύτη που περιέχει την επιθυμητή ένωση.¹⁶

Η εκχύλιση είναι το πρώτο βήμα για τον διαχωρισμό των επιθυμητών φυσικών προϊόντων από τις πρώτες ύλες. Οι μέθοδοι εκχύλισης περιλαμβάνουν εκχύλιση με διαλύτη, μέθοδο απόσταξης, συμπίεση και εξάχνωση σύμφωνα με την αρχή της εκχύλισης. Η εκχύλιση με διαλύτη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Η εκχύλιση των φυσικών προϊόντων προχωρά στα ακόλουθα στάδια: (1) ο διαλύτης διεισδύει στη στερεά μήτρα. (2) η διαλυμένη ουσία διαλύεται στους διαλύτες. (3) η διαλυμένη ουσία διαχέεται έξω από τη στερεά μήτρα. (4) συλλέγονται οι εκχυλισμένες διαλυμένες ουσίες.

Οποιοσδήποτε παράγοντας που ενισχύει τη διάχυση και τη διαλυτότητα στα παραπάνω βήματα θα διευκολύνει την εκχύλιση. Οι ιδιότητες του διαλύτη εκχύλισης, το μέγεθος των σωματιδίων των πρώτων υλών, η αναλογία διαλύτη της στερεό, η θερμοκρασία εκχύλισης και η διάρκεια εκχύλισης θα επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης.

Η επιλογή του διαλύτη είναι κρίσιμη για τις διεργασίες εκχύλισης. Η εκλεκτικότητα, η διαλυτότητα, το κόστος και η ασφάλεια πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των διαλυτών. Με βάση το νόμο της ομοιότητας και της αλληλεπίδρασης, οι διαλύτες με τιμή πολικότητας κοντά στην πολικότητα της διαλυμένης ουσίας είναι πιθανό να έχουν καλύτερη απόδοση και το αντίστροφο. Οι αλκοόλες (EtOH και MeOH) είναι καθολικοί διαλύτες στην εκχύλιση με διαλύτες για φυτοχημική έρευνα.

Γενικά, όσο πιο λεπτό είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο καλύτερο αποτέλεσμα επιτυγχάνει η εκχύλιση. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης θα ενισχυθεί από το μικρό μέγεθος σωματιδίων λόγω της ενισχυμένης διείσδυσης των διαλυτών και της διάχυσης των διαλυμένων ουσιών. Το πολύ λεπτό μέγεθος σωματιδίων, ωστόσο, θα κοστίσει την υπερβολική απορρόφηση της διαλυμένης ουσίας σε στερεό και τη δυσκολία στην επακόλουθη διήθηση.

Οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη διάχυση. Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ωστόσο, μπορεί να προκαλέσουν απώλεια διαλυτών, οδηγώντας σε εκχυλίσματα ανεπιθύμητων ακαθαρσιών και στην αποσύνθεση θερμοευαίσθητων συστατικών.

Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση της διάρκειας εκχύλισης σε ένα συγκεκριμένο χρονικό εύρος. Η αύξηση του χρόνου δεν θα επηρεάσει την εκχύλιση αφού επιτευχθεί η ισορροπία της διαλυμένης ουσίας εντός και εκτός του στερεού υλικού. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία διαλύτη προς στερεό, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόδοση εκχύλισης. Ωστόσο, μια πολύ υψηλή αναλογία διαλύτη προς στερεό θα προκαλέσει υπερβολική ποσότητα διαλύτη εκχύλισης και απαιτεί πολύ χρόνο για συμπύκνωση.^{17,18}

1.4.1 Μέθοδοι εκχύλισης

Οι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει διάφορες τεχνικές εκχύλισης. Οι εκχυλίσσεις με στερεά/υγρή βάση είναι οι πιο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, μαζί με την εκχύλιση Soxhlet, λόγω του χαμηλού κόστους και της ευκολίας λειτουργίας τους και ανήκουν στις συμβατικές εκχυλιστικές μεθόδους, με μεγάλα μειονεκτήματα την απαίτηση σε μεγάλο όγκο διαλυτών και το μεγάλο χρόνο εκχύλισης. Τα τελευταία χρόνια, έχει προταθεί η χρήση νέων τεχνικών ως εναλλακτική στις κοινές έως τώρα μεθόδους, οι οποίες θεωρούνται και «πράσινες» λόγω της συμμόρφωσής τους με τις απαιτήσεις των διεθνών ρυθμιστικών οργανισμών. Αυτές οι πράσινες τεχνικές προσφέρουν συγκρίσιμες ή υψηλότερες αποδόσεις εκχυλίσματος καθώς και βιώσιμες συνθήκες λειτουργίας, αυτές αποτελούν την κατηγορία των μη συμβατικών μεθόδων. Παραδείγματα των μη συμβατικών περιλαμβάνουν την εξαγωγή υπερκρίσιμου υγρού (SFE), την υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (MAE), την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση (HAE).^{19,20,21}

1.4.1.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

Συχνά αναφερόμενη και ως (UAE) είναι μια τεχνική εκχύλισης με μειωμένη χρήση διαλυτών και υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης. Η δόνηση των ηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας (>20 kHz) προκαλεί μικροκοιλότητες και φυσαλίδες στον διαλύτη που καταρρέουν και δημιουργούν δυνάμεις διάτμησης (σπηλαίωση). Η παραγόμενη μικροσπηλαίωση αυξάνει τη θερμοκρασία του μέσου, σπάζοντας τα τοιχώματα των κυττάρων και απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους.²²

1.4.1.2 Συσκευές Εκχύλισης με Υπερήχους

Για την πραγματοποίηση εκχύλισης με υπερήχους επικρατούν δύο είδη εξοπλισμού. Αυτά είναι το λουτρό και το probe υπερήχων. Το λουτρό υπερήχων είναι μια διαδεδομένη συσκευή κυρίως σε εργαστηριακό επίπεδο, παρόλα αυτά παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι δεν παρέχει καλή κατανομή της ισχύος καθ' όλη την έκταση του δείγματος προς εκχύλιση. Σε αντίθεση το probe, παρέχει την διάδοση των υπερήχων ομοιόμορφα σε όλο το μείγμα με αποτέλεσμα την καλύτερη απόδοση της συνολικής διεργασίας. Αναλυτικότερα κατά την εκχύλιση με probe το εμβαπτίζεται το εξάρτημα μέσα στο περιεχόμενο του δοχείου, με το μείγμα πρώτης ύλης- διαλύτη, ερχόμενο δηλαδή, σε άμεση επαφή. Τέλος, πρέπει να γίνεται ρύθμιση του όγκου του δείγματος βάσει το μέγεθος του εκάστοτε probe.^{23,24}

1.4.2 Παράμετροι επίδρασης στην εκχύλιση με υπερήχους

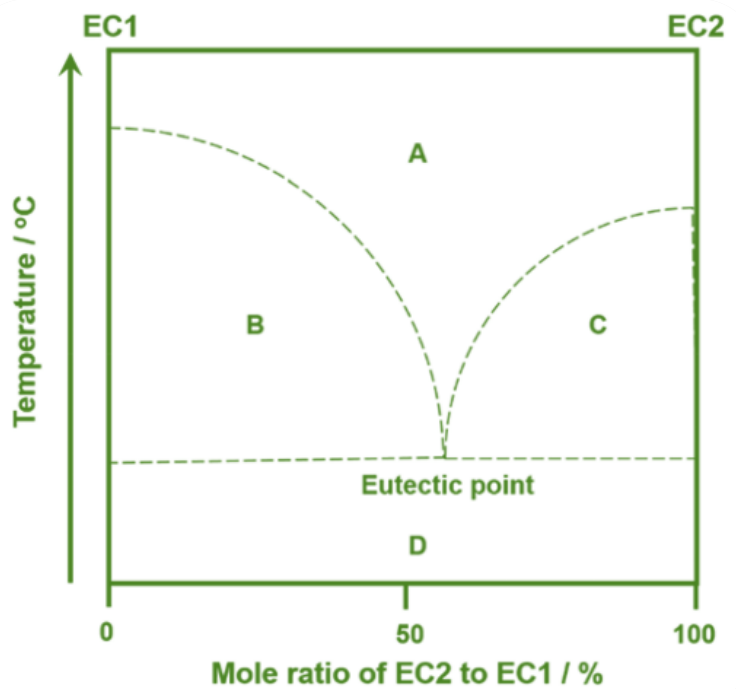
Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση της εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους είναι οι εξής:

- Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια της μεθόδου. Αναλυτικότερα, μερικά χαρακτηριστικά που καθιστούν ένα διαλύτη ιδανικό είναι: η δυνατότητα απομάκρυνσης του διαλύτη μετά το πέρας της εκχύλισης, η επιφανειακή τάση και το ιξώδες του, η ικανότητα διαβροχής του καθώς και τα άλλα χαρακτηριστικά του (όπως να μην είναι τοξικός, αντιδραστικός, εύφλεκτος και να είναι ασφαλής προς το περιβάλλον).
- Η πρώτη ύλη μπορεί να επηρεάσει την μέθοδο της εκχύλισης σημαντικά αναλόγως την μορφή με τη οποία θα λάβει μέρος στην διεργασία, το ποσοστό υγρασίας που περιέχει, την κοκκομετρία καθώς και την αναλογία της ως προς την ποσότητα διαλύτη στο δείγμα.
- Οι ρυθμίσεις και τα χαρακτηριστικά του οργάνου των υπερήχων, όπως το μήκος κύματος, συχνότητα, και παλμός ακτινοβολήσης δείγματος μπορούν να αποφέρουν μεγάλες μεταβολές στην αποδοτικότητα των εκχυλίσεων.
- Η θερμοκρασία διαδραματίζει έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες επίδρασης της μεθόδου. Με την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος επέρχεται μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα βελτιώνοντας τις συνθήκες διαλυτοποίησης της πρώτης ύλης.^{19,25,26}

1.5 Βαθώς Ευτηκτικοί Διαλύτες

Ο σημαντικότερος παράγοντας στην εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται. Ο όρος «ευτηκτικοί» προέρχεται από την ελληνική λέξη που σημαίνει χαμηλό σημείο τήξης και εφαρμόζεται είτε σε κράμα είτε σε υγρό μέσο, ενώ ο όρος «βαθώς» έχει προστεθεί για να τονίσει τη διαφορά του σημείου τήξης των βαθώς ευτηκτικών Διαλυτών (Deep eutectic Solvents DES) από τα επιμέρους συστατικά τους ($\Delta T=100-200^{\circ}\text{C}$) σε σχέση με τα απλά ευτηκτικά μίγματα. Με γενικούς όρους, ένα ευτηκτικό σύστημα αντιπροσωπεύει ένα μείγμα από συστατικά που λόγω συγκεκριμένων αναλογιών παρουσιάζει χαμηλότερο σημείο τήξης.²⁷

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα φάσεων που φαίνεται στο σχήμα παρακάτω, η θερμοκρασία και η αναλογία συστατικών είναι δύο κύριοι καθοριστικοί παράγοντες σε ένα δυαδικό ευτηκτικό σύστημα. Αυτά τα στοιχεία αλληλοεπιδρούν μέσω διαμοριακών δυνάμεων, αλλά όχι μέσω ομοιοπολικών ή ιοντικών δεσμών. Σε σύγκριση με τον ομοιοπολικό ή ιοντικό δεσμό σε μια χημική ένωση όπως τα ιοντικά υγρά, ένα ευτηκτικό μίγμα με χαμηλή θερμοδυναμική σταθερότητα τείνει να επηρεάζεται από τη γεωμετρία και το χημικό περιβάλλον με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται στις επιμέρους του ουσίες.²⁸ Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού τους, η ύπαρξη ευτηκτικής κατάστασης δεν παρατηρείται εύκολα σε φυσικά υλικά, κάτι που μπορεί να εξηγήσει γιατί είναι ένα σχετικά υποεκπροσωπούμενο θέμα στην έρευνα φυσικών προϊόντων. Όπως φαίνεται και από τα ακόλουθα παραδείγματα, μπορούμε να συναντήσουμε ευτηκτικά φαινόμενα στην καθημερινότητά μας. Κλασικά παραδείγματα είναι το μέλι και το σιρόπι, που αντιπροσωπεύει μείγματα σακχάρων που είναι πολύ παχύρρευστα μέσα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαιτητικά συμπληρώματα και ως συστατικά σε παρασκευάσματα της παραδοσιακής ιατρικής για εκατοντάδες χρόνια. Ένα άλλο εξέχων παράδειγμα είναι το μίγμα των δύο στερεών μενθόλη και καμφορά, το οποίο μπορεί να σχηματίσει ένα ευτηκτικό υγρό που χρησιμοποιείται ως οδηγός για τη διαλυτοποίηση φαρμάκων.^{29,30}



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών δύο φάσεων³¹

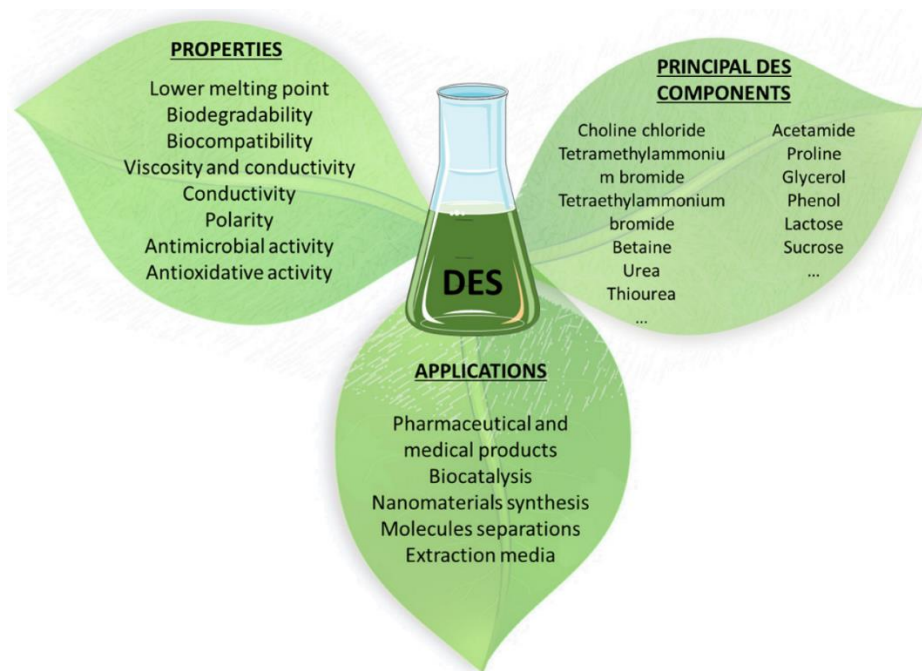
Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) είναι μια πράσινη και βιώσιμη εναλλακτική λύση σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες και έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή σε διαφορετικούς τομείς λόγω των ιδιοτήτων τους όπως η εύκολη παρασκευή, η χημική αδράνεια με το νερό, το χαμηλό κόστος καθώς και ότι είναι βιοδιασπώμενοι και μη τοξικοί). Τα DES μπορούν απλά να ληφθούν με ανάμειξη ενός δέκτη δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptors, HBA) και ενός ή δύο δότες δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donors, HBD). Η χλωριούχος χολίνη, το οποίο είναι ένα άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ως δέκτης υδρογόνου (HBA), το οποίο μπορεί να σχηματίσει DES σε μείγμα με άλλο δέκτη (HBD), συμπεριλαμβανομένων ουρίας, αιθυλενογλυκόλης και γλυκερόλης, αλκοόλες, αμινοξέα, καρβοξυλικά οξέα και σάκχαρα.³²

Για όλες αυτές τις εξαιρετικές ιδιότητες, τα DES εφαρμόζονται για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από φυτά όπως τα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, ανθρακινόνες και σαπωνίνες. Μεταξύ αυτών των αναλυτών, οι φαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν εύκολα να εξαχθούν λόγω μιας ισχυρής διαμοριακής αλληλεπίδρασης που εμφανίζεται μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και DES.

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) είναι πλέον ευρέως αναγνωρισμένοι ως μια νέα κατηγορία ιοντικών υγρών (Ionic Liquids, IL) επειδή μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά και ιδιότητες με αυτά. Τα DES είναι συστήματα που σχηματίζονται από ένα ευτηκτικό μείγμα οξέων και βάσεων Lewis ή Brønsted που μπορεί να περιέχουν μια ποικιλία ανιονικών και/ή κατιονικών ειδών. Αντίθετα, τα IL σχηματίζονται από συστήματα που αποτελούνται κυρίως από έναν τύπο διακριτού ανιόντος και κατιόντος.

Η έρευνα στα ιοντικά υγρά (IL) έχει κλιμακωθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες, από τότε που έγινε αντιληπτή η δυνατότητα για νέες χημικές τεχνολογίες. Κατά την περίοδο που καλύπτεται από μια ανασκόπηση, έχουν δημοσιευτεί περίπου 6000 άρθρα σε περιοδικά σχετικά με το θέμα. Σε σύγκριση με τα κλασικά IL η έρευνα για τα DES βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, με την πρώτη εργασία για το θέμα να δημοσιεύεται μόλις το 2001. Ωστόσο, με τις δημοσιεύσεις της περασμένης δεκαετίας να πλησιάζουν τώρα τις 200, μια αυξανόμενη ερευνητική προσπάθεια επικεντρώνεται σε αυτό το αναδυόμενο πεδίο. Αυτή είναι μια ανασκόπηση που περιλαμβάνει όλους τους ερευνητικούς τομείς και τις εφαρμογές που σχετίζονται με τις δημοσιεύσεις σχετικά με DES μεταξύ 2001 και αρχές του 2012, ενώ αξίζει να τονισθεί ότι μέχρι σήμερα οι μελέτες που διεξάγονται είναι ολοένα και περισσότερες, λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που επέρχονται από την χρήση τους.

Ένα μεγάλο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας έχει επικεντρωθεί στη χρήση των DES ως εναλλακτικών μέσων για μέταλλα που είναι δύσκολο να επιστρωθούν ή να επεξεργαστούν ή περιλαμβάνουν επικίνδυνες για το περιβάλλον διαδικασίες. Τα DES έχουν επίσης προταθεί ως φιλικές προς το περιβάλλον, εναλλακτικές λύσεις για σύνθεση.³³



Εικόνα 5: Ιδιότητες DES: Χαμηλό σημείο ζέσεως, βιοαποδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα, ιξώδες και αγωγιμότητα, πολικότητα, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Εφαρμογές DES: Φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα, βιοκατάλυση, σύνθεση νανοϋλικών, διαχωρισμός μορίων, μέσο εκχύλισης.³⁴

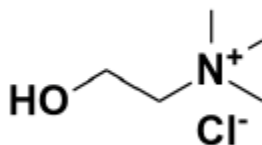
1.5.1 Βασικά πλεονεκτήματα βαθέως ευηλεκτικών διαλυτών

Μερικές ιδιότητες των DES για τις οποίες έχουν γίνει τόσο διαδεδομένοι τα τελευταία χρόνια παρουσιάζονται παρακάτω:

- Μη πτητικοί
- Χαμηλό κόστος πρώτων υλών
- Εύκολη παρασκευή
- Μη τοξικοί
- Εκλεκτικοί
- Διαλύτες εκχύλισης
- Χημικά και θερμικά σταθεροί
- Ρυθμιζόμενο ιξώδες
- Βιοαποικοδομήσιμοι

1.5.2 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES)

Λόγω της τοξικότητας και του υψηλού κόστους των ιοντικών υγρών IL, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια ιοντικοί διαλύτες γνωστοί ως βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) με παρόμοιες φυσικές ιδιότητες και συμπεριφορά με αυτές των IL. Η ανάμειξη δύο ή περισσότερων καθαρών στερεών σε συγκεκριμένη αναλογία παράγει ένα υγρό με χαμηλότερο σημείο τήξης από εκείνο των μεμονωμένων συστατικών DES. Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες βάσης (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) μπορούν να σχηματιστούν αναμειγνύοντας ένα μη τοξικό άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου όπως η χλωριούχος χολίνη (ChCl) και ενώσεις δότη δεσμού υδρογόνου χαμηλής τοξικότητας (HBD) όπως ουρία, πολυόλες, ζάχαρη και οργανικά οξέα. Το ευτηκτικό σημείο στο NaDES οφείλεται στην παρουσία δεσμού υδρογόνου μεταξύ του χλωριδίου της χλωριούχου χολίνης και των πρωτονίων στα HBD's. Τα NADES επιλέχθηκαν σε αυτή τη μελέτη επειδή αυτοί είναι πολλά υποσχόμενοι διαλύτες, όπως και τα IL, αλλά είναι άμεσα διαθέσιμοι με πολύ χαμηλό κόστος, εύκολο να παρασκευαστούν σε υψηλή καθαρότητα και έχουν χαμηλή τοξικότητα. Τέλος, τα NaDES μπορούν να σχηματιστούν από χημικές ουσίες με φυσική βάση.^{34,35}



Εικόνα 6: Μοριακή δομή χλωριούχου χολίνης

1.5.3 Ιδιότητες Φυσικά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών:

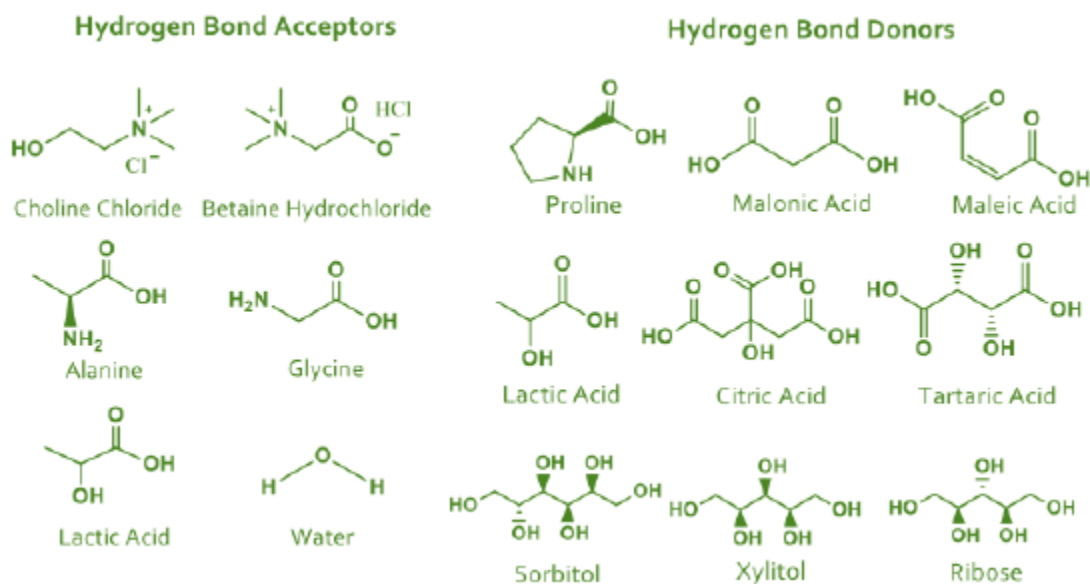
Οι NaDES είναι χρήσιμοι για την χαμηλή τάση ατμών που παρουσιάζουν, με αποτέλεσμα την αμελητέα πτητικότητά τους. Παρόλα αυτά, κοινό χαρακτηριστικό των NaDES είναι το υψηλό ιξώδες λόγω του ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου που έχουν, σε συνδυασμό με λοιπές διαμοριακές δυνάμεις. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει δυσκολίες στην χρήση τους κατά την διάρκεια ροών και διαχύσεων τους. Παρόλα αυτά, μπορεί να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο καθώς τα NaDES υπακούουν στο μοντέλο Arrhenius, που σημαίνει ότι μπορεί να επιτευχθεί πτώση του ιξώδους με προσθήκη νερού ή αύξηση της θερμοκρασίας. Όμως, με την προσθήκη νερού θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην αποδυνάμωση των δεσμών υδρογόνου καθώς και στην πτώση της πολικότητας τα οποία είναι ανεπιθύμητα για το διαλύτη. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι τα DES με συστατικά μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας (π.χ. χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη) παρουσιάζουν χαμηλότερο ιξώδες.

1.5.4 Μέθοδοι Παρασκευής NaDES

Οι κύριες μέθοδοι που περιγράφονται στη βιβλιογραφία για τη σύνθεση των NADES βασίζονται σε ανάδευση και θέρμανση, λυοφιλοποίηση, εξάτμιση. Συγκεκριμένα, η πρώτη μέθοδος γίνεται μέσω θέρμανσης και ανάδευσης, κατά την οποία τα συστατικά του μίγματος τοποθετούνται σε κλειστή φιάλη και θερμαίνονται σε ένα εύρος 50-70 °C με ταυτόχρονη μαγνητική ανάδευση, έως ότου να δημιουργηθεί ένα διαυγές ιξώδες υγρό, το οποίο διατηρεί σταθερές τις φυσικές ιδιότητές του μετά το πέρας της θέρμανσης. Το χρονικό διάστημα αυτής της μεθόδου κυμαίνεται από 30-100 min.

Η δεύτερη μέθοδος λέγεται μέθοδος λυοφιλοποίησης περιλαμβάνει κατάψυξη και ξήρανση του διαλύματος, λαμβάνοντας ένα διαυγές παχύρρευστο υγρό.

Τέλος, είναι η μέθοδος εξάτμισης, κατά την οποία τα επιμέρους συστατικά του NaDES διαλύονται αρχικά μέσα σε νερό και στην συνέχεια εξατμίζονται κοντά στους 50°C . Στην συνέχεια το υγρό τοποθετείται σε ξηραντήρα και αφήνεται έως ότου σταθεροποιηθεί η μάζα του.



Εικόνα 7: Μερικοί από τους συνηθέστερους δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου³⁶

1.5.5 Συνεισφορά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών σε διεργασίες εκχύλισης:

Για να βελτιωθεί η απόδοση της εκχύλισης, μια νέα τεχνική εκχύλισης όπως η υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (Ultrasonic Assisted Extraction UAE) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλές μελέτες. Ο συνδυασμός DES και UAE (DES-UAE) υπόσχεται πολλά λόγω της υψηλής απόδοσης εκχύλισης και της πράσινης χημείας τους. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με την εφαρμογή του DES-UAE για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υλικά. Η DES-UAE ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνική θα εφαρμοστεί στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών στο μέλλον.³¹

1.6 Διαδικασία εκχύλισης φαινολικών ενώσεων

Η ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από το BSG μπορεί να συνοψιστεί στα ακόλουθα βήματα: προεπεξεργασία, εκχύλιση, απομόνωση και καθαρισμός. Τα δύο πρώτα βήματα μπορούν να θεωρηθούν ιδιαίτερα σημαντικά καθώς καθορίζουν τη συνολική απόδοση της διαδικασίας. Η προεπεξεργασία των κόκκων BSG βοηθά στη διάσπαση του λιγνοκυτταρινικού υλικού και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης διευκολύνοντας την πρόσβαση του διαλύτη σε κενोटόπια και άλλες δομές αποθήκευσης. Τα βήματα προεπεξεργασίας μπορεί να περιλαμβάνουν μηχανικές διαδικασίες όπως διαβροχή, λείανση και ομογενοποίηση του υλικού έως ότου ένα επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων ενισχύει την προσβασιμότητα των διαλυτών στις δομές του κυτταρικού τοιχώματος. Χημικές προκατεργασίες όπως η αυτοϋδρόλυση, η αλκαλική υδρόλυση και οι ενζυμικές προεπεξεργασίες έχουν συνδυαστεί με την εκχύλιση φαινολικών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων από BSG για την ενίσχυση των αποδόσεων ανάκτησης.^{37,38}

Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για νέες οικολογικές και πράσινες αναλυτικές μεθόδους έχουν οδηγήσει στην προσπάθεια βελτίωσης των διαδικασιών εκχύλισης. Οι επιστήμες της πράσινης χημείας και μηχανικής αναζητούν ολοένα καινούριους διαλύτες ικανούς να αντικαταστήσουν τους υπάρχοντες οργανικούς.

Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για νέες οικολογικές και πράσινες αναλυτικές μεθόδους έχουν οδηγήσει στην προσπάθεια βελτίωσης των διαδικασιών εκχύλισης. Οι επιστήμες της πράσινης χημείας και μηχανικής αναζητούν ολοένα καινούριους διαλύτες ικανούς να αντικαταστήσουν τους υπάρχοντες οργανικούς. Υπάρχει μια ανοδική τάση της «πράσινης χημείας» ή της «πράσινης εκχύλισης» που συνεπάγεται τη χρήση διαλυτών και ουσιών που λαμβάνονται από ανανεώσιμα υλικά, αλλά που θα μπορούσαν να διατηρήσουν την αποδοτικότητά της ληφθείσας εκχύλισης.

1.7 Πράσινη Χημεία

Η πράσινη χημεία είναι ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διαδικασιών που μειώνουν ή εξαλείφουν τη χρήση ή την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Η πράσινη χημεία εφαρμόζεται σε όλο τον κύκλο ζωής ενός χημικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένου του σχεδιασμού, της κατασκευής, της χρήσης και της τελικής απόρριψής του.

Η πράσινη χημεία μειώνει τη ρύπανση ελαχιστοποιώντας ή εξαλείφοντας τους κινδύνους των χημικών πρώτων υλών, των αντιδραστηρίων, των διαλυτών και των προϊόντων. Αυτό είναι σε αντίθεση με τον καθαρισμό της ρύπανσης, που περιλαμβάνει την επεξεργασία ρευμάτων απορριμμάτων ή τον καθαρισμό περιβαλλοντικών διαρροών και άλλων εκλύσεων. Ο καθαρισμός της ρύπανσης μπορεί να περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των επικίνδυνων χημικών ουσιών από άλλα υλικά, στη συνέχεια την επεξεργασία τους ώστε να μην είναι πλέον επικίνδυνα ή τη συμπύκνωση τους για ασφαλή απόρριψη.^{39,40} Οι περισσότερες δραστηριότητες καθαρισμού δεν περιλαμβάνουν πράσινη χημεία, αλλά, απομακρύνει τα επικίνδυνα υλικά από το περιβάλλον. Από την άλλη πλευρά, η πράσινη χημεία κρατά τα επικίνδυνα υλικά μακριά από το περιβάλλον στην πρώτη θέση. Εάν μια τεχνολογία μειώνει ή εξαλείφει τις επικίνδυνες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό περιβαλλοντικών ρύπων, αυτή η τεχνολογία θα χαρακτηρίζεται ως τεχνολογία πράσινης χημείας.⁴¹ Ένα παράδειγμα είναι η αντικατάσταση ενός επικίνδυνου ροφητικού (χημικού) που χρησιμοποιείται για τη δέσμευση υδραργύρου από τον αέρα για ασφαλή απόρριψη με ένα αποτελεσματικό, αλλά μη επικίνδυνο ροφητικό. Η χρήση του μη επικίνδυνου ροφητικού σημαίνει ότι το επικίνδυνο χημικό δεν κατασκευάζεται ποτέ και έτσι η τεχνολογία αποκατάστασης πληροί τον ορισμό της πράσινης χημείας.^{42,43,44}



Εικόνα 8: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας⁴⁵

1.7.1 Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας

Οι παρακάτω αρχές είναι η γενική έννοια της Πράσινης Χημείας

1. Αποφυγή αποβλήτων. Σχεδιασμός Χημικών συνθέσεων για την αποφυγή αποβλήτων. Μην παράγονται απόβλητα για επεξεργασία ή καθαρισμό.
2. Μεγιστοποίηση οικονομίας ατόμων. Σχεδιασμός συνθέσεων έτσι ώστε το τελικό προϊόν να περιέχει τη μέγιστη αναλογία των πρώτων υλών. Μηδενική ή ελάχιστα απαιτούμενη δαπάνη ατόμων.
3. Ελαχιστοποίηση παραγωγής επικίνδυνων χημικών συνθέσεων. Σχεδιασμός συνθετικών μεθόδων ώστε να χρησιμοποιούν και να δημιουργούν ουσίες που έχουν την ελάχιστη ή καθόλου τοξικότητα στον άνθρωπο και το περιβάλλον.
4. Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων. Σχεδιασμός χημικών προϊόντων που είναι πλήρως αποτελεσματικά αλλά έχουν μικρή ή καθόλου τοξικότητα.

5. Χρήση ασφαλέστερων διαλυτών και συνθηκών αντίδρασης: Αποφυγή χρήσης διαλυτών, παραγόντων διαχωρισμού ή άλλων βοηθητικών χημικών ουσιών. Εάν πρέπει να χρησιμοποιηθούν αυτές οι χημικές ουσίες, χρήση των ασφαλέστερων.
6. Αύξηση της ενεργειακής απόδοσης. Εκτέλεση χημικών αντιδράσεων σε θερμοκρασία και πίεση δωματίου αν είναι εφικτό.
7. Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών και όχι εξαντλούμενων. Η πηγή των ανανεώσιμων πρώτων υλών είναι συχνά τα γεωργικά προϊόντα ή τα απόβλητα άλλων διεργασιών. Η πηγή εξάντλησης πρώτων υλών είναι συχνά τα ορυκτά καύσιμα (πετρέλαιο, φυσικό αέριο ή άνθρακας) ή οι εργασίες εξόρυξης.
8. Αποφυγή χημικών παράγωγων, τα οποία δημιουργούν απόβλητα λόγω χρήσης πρόσθετων αντιδραστηρίων.
9. Χρήση καταλυτών αντί για στοιχειομετρικά αντιδραστήρια. Με την χρήση καταλυτών ελαχιστοποιούνται τα απόβλητα. Οι καταλύτες είναι αποτελεσματικοί σε μικρές ποσότητες και μπορούν να πραγματοποιήσουν μία μόνο αντίδραση πολλές φορές. Είναι προτιμότερα από τα στοιχειομετρικά αντιδραστήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται σε περίσσεια και πραγματοποιούν μια αντίδραση μόνο μία φορά.
10. Σχεδιασμός χημικών προϊόντων για αποικοδόμηση μετά την χρήση τους, να διασπώνται δηλαδή σε αβλαβείς ουσίες ώστε να μην συσσωρεύονται στο περιβάλλον.
11. Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο για την πρόληψη της ρύπανσης. Συμπερίληψη παρακολούθησης και ελέγχου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια των συνθέσεων για την ελαχιστοποίηση των υποπροϊόντων.
12. Ελαχιστοποίηση της πιθανότητας ατυχημάτων. Σχεδιασμός χημικών ουσιών και των φυσικών μορφών τους για την ελαχιστοποίηση χημικών ατυχημάτων όπως, εκρήξεων, πυρκαγιών και εκλύσεων στο περιβάλλον.^{46,47,48,49}

Με αφορμή την 2^η αρχή της Πράσινης Χημείας, είναι σημαντικό να επισημανθεί η σπουδαιότητα χρήσης του πειραματικού Σχεδιασμού με την Μέθοδο Taguchi. Με την χρήση αυτής της μεθόδου ελαχιστοποιήθηκε ο αριθμός πειραμάτων που ήταν αναγκαίος για την μελέτη συλλογής φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων από εκχυλίσματα υπολειμμάτων βύνης. Ενώ η δαπάνη πρώτων υλών και παραγωγή αποβλήτων μειώθηκε δραστικά. Καθιστώντας την συνολική εκτέλεση των πειραμάτων αρμονική με τα κριτήρια της Πράσινης Χημείας.

1.8 Πειραματικός Σχεδιασμός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο τομέας στον οποίο πραγματοποιείται η ενασχόληση είναι ο πειραματικός σχεδιασμός. Μέσω του πειραματικού σχεδιασμού μπορεί να επιτευχθεί η

εκτίμηση της επίδρασης που έχουν όλες οι μεταβλητές στην δημιουργία του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, η μέθοδος Taguchi είναι αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της επίδρασης των ορισμένων μεταβλητών κατά την διαδικασία παραγωγής των εκχυλισμάτων.

Οι τεχνικές του Taguchi έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στον μηχανολογικό σχεδιασμό.

Η μέθοδος Taguchi περιλαμβάνει:

- τη σχεδίαση συστήματος,
- το σχεδιασμό παραμέτρων
- τις διαδικασίες σχεδιασμού ανοχής

τα οποία επιτυγχάνουν μια εκτενή επεξεργασία και αποτελέσματα για την καλύτερη ποιότητα τελικού προϊόντος.

Τα σχέδια Taguchi παρέχουν μια ισχυρή και αποτελεσματική μέθοδο για το σχεδιασμό διαδικασιών που λειτουργούν με συνέπεια και βέλτιστα σε ποικίλες συνθήκες. Για να καθοριστεί ο καλύτερος σχεδιασμός, απαιτείται η χρήση ενός στρατηγικά σχεδιασμένου πειράματος, το οποίο αναλύει τη διαδικασία σε διάφορα επίπεδα σχεδιασμού παραμέτρων.

Η προσέγγιση του Taguchi στο σχεδιασμό πειραμάτων είναι εύκολο να υιοθετηθεί και να εφαρμοστεί για χρήστες με περιορισμένη γνώση των στατιστικών· ως εκ τούτου έχει αποκτήσει μεγάλη δημοτικότητα στη μηχανική και επιστημονική κοινότητα. Ο Taguchi προσδιόρισε τρεις καταστάσεις:

Όσο μεγαλύτερο τόσο το καλύτερο (για παράδειγμα, γεωργική απόδοση).

Όσο μικρότερο τόσο το καλύτερο (για παράδειγμα, εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα). και

Επί του στόχου (on-target)- ελάχιστη παραλλαγή (για παράδειγμα, ένα ταιριαστό μέρος σε ένα κατασκεύασμα).

Η Taguchi έχει χρησιμοποιήσει το λόγο σήματος-θορύβου (S/N) ως το ποιοτικό χαρακτηριστικό επιλογής. Ο λόγος S/N χρησιμοποιείται ως μετρήσιμη τιμή αντί για τυπική απόκλιση λόγω του γεγονότος ότι, καθώς μειώνεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση επίσης υποχωρεί και αντίστροφα.

1.8.1 Οκτώ βήματα της Μεθοδολογίας Taguchi

1. Προσδιορισμός της κύριας λειτουργίας, των παραγόντων και τη λειτουργία αποτυχίας.
2. Προσδιορισμός των παραγόντων θορύβου, των συνθηκών δοκιμής και των ποιοτικών χαρακτηριστικών.

3. Προσδιορισμός της συνάρτησης στόχου που πρόκειται να βελτιστοποιηθεί
4. Προσδιορισμός των παραγόντων ελέγχου και τα εύρη τιμών τους
5. Επιλογή των πειραμάτων του ορθογώνιου πίνακα
6. Εκτέλεση των πειραμάτων
7. Ανάλυση των δεδομένων, πρόβλεψη των βέλτιστων επίπεδων και αποδόσεων
8. Εκτέλεση του πειράματος επαλήθευσης και σχεδιασμός των μελλοντικών ενεργειών⁵⁰

2. Πειραματικό μέρος:

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από υπολείμματα βύνης ζυθοβιομηχανίας (BSG) με χρήση πράσινων διαλυτών, όπως οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES), υποβοηθούμενη από υπερήχους, με στόχο την παραλαβή πλούσιων βιοδραστικών εκχυλισμάτων.

Η επιλογή των υπολειμμάτων BSG για χρήση ως πρώτη ύλη βασίστηκε στην περιορισμένη αξιοποίηση που πραγματοποιείται σε αυτά, καθώς στο μεγαλύτερο βαθμό χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή. Παρόλα αυτά το πλούσιο σε βιοδραστικές αυτό παραπροϊόν από την παραγωγή μπίρας μπορεί να φανεί χρήσιμο σε πολλούς άλλους σημαντικούς για τον άνθρωπο κλάδους.

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της διεργασίας με την διενέργεια του πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment) με τη μέθοδο Taguchi και την χρήση του εργαλείου Minitab για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος, από την εξαγωγή των βέλτιστων συνθηκών για την διεργασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα επιβεβαίωσης με στόχο την κρίση της σημαντικότητας του μοντέλου.

2.2 Πειραματική διαδικασία

Σε αυτή την ενότητα παρατίθενται τα βήματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν καθώς και οι πειραματικές μέθοδοι, οι πρώτες ύλες, ο εργαστηριακός εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια που επιλέχθηκαν για την εκτέλεση αυτής της έρευνας.

Όργανα και αντιδραστήρια:

Παρακάτω παρατίθενται τα κυριότερα υλικά, αντιδραστήρια, εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων στα εργαστήρια οργανικής χημείας.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

| Αντιδραστήριο | Μοριακός Τύπος |
|------------------|--|
| Απιονισμένο νερό | H ₂ O |
| Βεταΐνη | C ₅ H ₁₁ NO ₂ |

| | |
|--|----------------------|
| D-γλυκόζη | $C_6H_{12}O_6$ |
| Γαλακτικό οξύ (υδατικό διάλυμα 80-85%) | $C_3H_6O_3$ |
| Ουρία | CH_4N_2O |
| Γλυκερόλη | $C_3H_8O_3$ |
| Γαλλικό οξύ | $C_7H_6O_5$ |
| Καυστικό Νάτριο | NaOH |
| Ανθρακικό Νάτριο | Na_2CO_3 |
| Κατεχίνη | $C_{15}H_{14}O_6$ |
| Νιτρώδες Νάτριο | $NaNO_2$ |
| Ένυδρο χλωριούχο αργίλιο | $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ |
| Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu | - |

Πίνακας 3: Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων

| Όργανα και Συσκευές | Μοντέλο |
|------------------------------|------------------------------------|
| Ζυγός ακριβείας (μέχρι 110g) | Explorer |
| Συσκευή Λυοφιλοποίησης | Freeze Dryer Lablyo Mini |
| Φασματοφωτόμετρο UV-VIS | UV-VIS V-770 |
| Σύστημα υπερήχων probe | Vibra Cell probe sonicator (400 W) |
| Αναδευτήρας Vortex | ZX4 |
| Φυγόκεντρος | - |

2.2.1 Επεξεργασία πρώτης ύλης

Η παραλαβή της πρώτης ύλης έγινε από το μικρό ζυθοποιείο της Αθηναϊκής Ζυθοποιίας όπου ύστερα από επικοινωνία με την εταιρία συλλέχθηκε ανοιχτόχρωμη/ξανθιά και κόκκινη βύνη. Πρέπει να τονισθεί ότι η πρώτη ύλη είχε μόλις βγει από την παραγωγική διαδικασία που σημαίνει ότι περιείχε μεγάλο ποσοστό υγρασίας. Για την απομάκρυνση της υγρασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί μέθοδοι. Αρχικά μέσω της ξήρανσης με θέρμανση στους 70°C για 4 ώρες ενώ η άλλη μέθοδος η οποία και τελικά χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων είναι η λυοφιλοποίηση ή αλλιώς freeze drying.

2.2.2 Ξήρανση με Θέρμανση

Κατά τη ξήρανση με θέρμανση το δείγμα εισέρχεται σε φούρνο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας στους 70°C και παραμένει σε αυτόν για 4 ώρες. Στην συνέχεια απομακρύνεται και αποθηκεύεται έως τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του.

2.2.3 Ξήρανση με Λυοφιλοποίηση

Κατά τη ξήρανση με Λυοφιλοποίηση, το δείγμα BSG τοποθετείται σε κρυσταλλωτήρια και παραμένει σε καταψύκτη για 24 ώρες. Στην συνέχεια μεταφέρεται στην συσκευή λυοφιλοποίησης, στην οποία πραγματοποιείται εξάχνωση του νερού που περιέχεται στο δείγμα (ψύξη του δείγματος στους -50°C για 48 ώρες).

2.2.4 Κοκκομετρία

Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να επισημανθεί είναι η κοκκομετρία της πρώτης ύλης. Έγινε σύγκριση δύο διαφορετικά επεξεργασμένων δειγμάτων. Η βύνη μικρής κοκκομετρίας ήταν <1mm ενώ η μεγάλης >1mm όπως γίνεται κατανοητό και από τις ακόλουθες φωτογραφίες.



Εικόνα 9: Ανοιχτόχρωμη βύνη, μικρής κοκκομετρίας (<1mm)



Εικόνα 10: Ανοιχτόχρωμη βύνη, μεγάλης κοκκομετρίας (>1mm)



Εικόνα 11: Σκουρόχρωμη (κόκκινη) βύνη, μικρής κοκκομετρίας (<1mm)

2.2.4 Διαδικασία παρασκευής φυσικά Βαθέως ευτηκτικού διαλύτη NaDES

Για την παρασκευή του διαλύτη, χρησιμοποιείται η μεθοδολογία της θέρμανσης και ανάδευσης. Κατά την οποία σε σφαιρική φιάλη προστίθενται δύο επιμέρους για τον εκάστοτε διαλύτη συστατικά σε κατάλληλη αναλογία. Στην συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται σε ελαιόλουτρο για την ρύθμιση της θερμοκρασίας, με ταυτόχρονη μαγνητικά ελεγχόμενη ανάδευση. Η δημιουργία του διαλύτη NaDES ολοκληρωνόταν μόλις το διάλυμα διατηρούσε υψηλό ιξώδες, διαυγές χρώμα ακόμη και ύστερα από την διακοπή της θέρμανσής του.

2.2.4.1 Screening διαλυτών

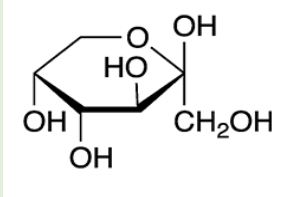
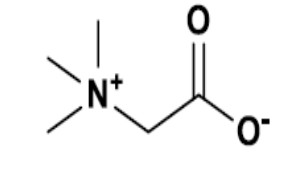
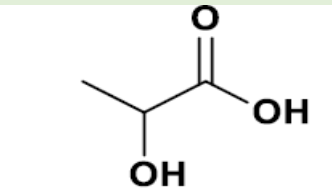
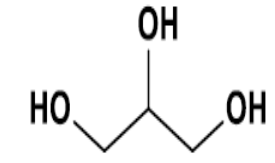
Οι διαλύτες που μελετήθηκαν για την επιλογή του καταλληλότερου ήταν οι εξής:

Πίνακας 4: Αναλογίες και συνθήκες παρασκευής διαλυτών

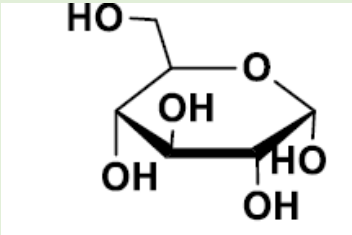
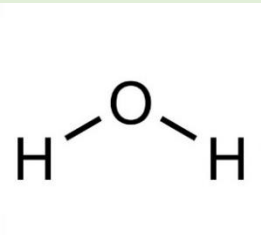
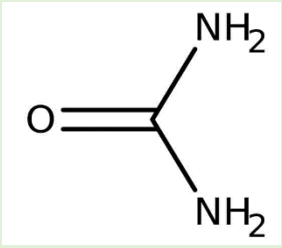
| | Όνομα NaDES | moles | Αναλογίες | Θέρμανση (°C) | Χρόνος θέρμανσης (ώρες) |
|-----|--------------------------|--------------------|-----------|---------------|-------------------------|
| FS1 | Γλυκόζη-Γαλακτικό οξύ | 0.022: 0.11 | 1:5 | 50 | 4 |
| FS2 | Βεταΐνη-γλυκερόλη | 0.034: 0.102 | 1:3 | 50 | 3 |
| FS3 | Φρουκτόζη-Γλυκερόλη-νερό | 0.022: 0.022: 0.11 | 1:1:5 | 60 | 2 |

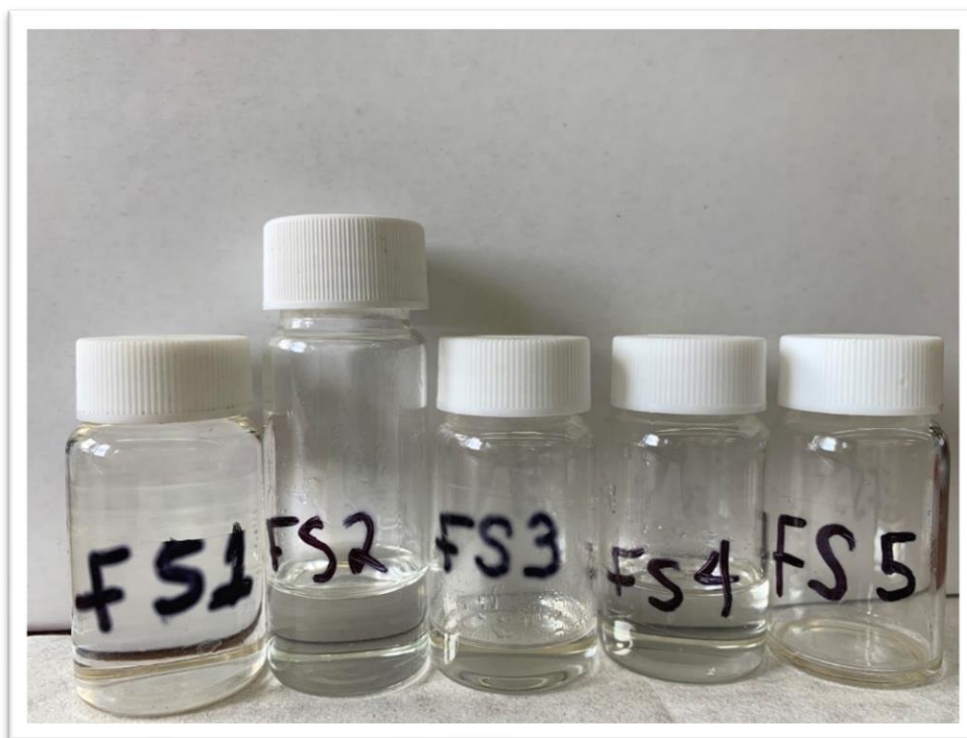
| | | | | | |
|-----|------------------------|---------------------|-------|----|-----|
| FS4 | Βεταΐνη-γλυκερόλη-νερό | 0.034: 0.102: 0.034 | 1:3:1 | 50 | 3 |
| FS5 | Βεταΐνη-ουρία-νερό | 0.034: 0.034: 0.102 | 1:1:3 | 60 | 1.5 |

Πίνακας 5: Επιμέρους ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυτών

| Φρουκτόζη | Βεταΐνη | Γαλακτικό Οξύ | Γλυκερόλη |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |

Πίνακας 6: Επιμέρους ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυτών

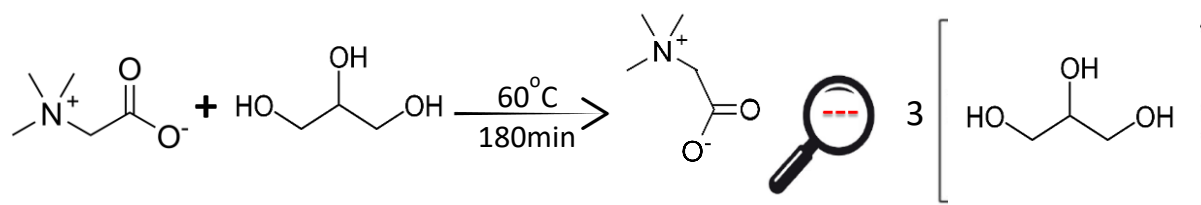
| Γλυκόζη | Νερό | Ουρία |
|---|---|---|
|  |  |  |



Εικόνα 12: Οι διαλύτες NaDES που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο οργανικής χημείας για την πραγματοποίηση της διερεύνησης του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από BSG

Ύστερα από το screening που πραγματοποιήθηκε για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, επιλέχθηκε ως προτιμότερος ο NaDES βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3).

Για την παρασκευή του NaDES βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3), πραγματοποιήθηκε προσθήκη 4g βεταΐνης και με αναλογία mol (1:3) προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα γλυκερόλης 9.39g. Συγκεκριμένα, 0.034mol βεταΐνης (s) και 0.102mol γλυκερόλης (l), με πυκνότητα $d=1.259\text{g/ml}$ τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη για θέρμανση σε εύρος 40-60 °C με ταυτόχρονη μαγνητική ανάδευση με ~350rpm. Η διαδικασία παρασκευής του διαλύτη έχει έρθει στο πέρας της, όταν το διάλυμα έχει λάβει την μορφή διαυγούς, ομοιογενούς και παραλαμβάνεται τελικά ο διαλύτης ως ένα άχρωμο και υψηλού ιξώδους υγρό.



Εικόνα 13: Αντίδραση παραγωγής NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη (1:3)



Εικόνα 14: Διαλύτης βεταΐνη-γλυκερόλη (1:3)

2.2.5 Εκχύλιση υπολειμμάτων βύνης με παρουσία NaDES και υπερήχων:

Για την μεθοδολογία εκχύλισης των BSG με υπερήχους σε διαλύτη NaDES, αρχικά, γίνεται η ζύγιση της πρώτης ύλης σε ζυγό ακριβείας. Στην συνέχεια σε μικρό φιαλίδιο γίνεται η προσθήκη του διαλύτη NaDES με την χρήση αυτόματης πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου για την ακριβή δοσολογία ml.

Στην συνέχεια εισέρχεται η υπολειπόμενη ποσότητα H₂O νερού που αντιστοιχεί στην σωστή αναλογία NaDES-H₂O του εκάστοτε προς μελέτη πειράματος. Τέλος, η πλέον ζυγισμένη πρώτη ύλη αναμιγνύεται με το σύστημα NaDES-H₂O και το τελικό μίγμα μεταφέρεται στην συσκευή υπερήχων με probe. Για την έλεγχο της θερμοκρασίας (αποφυγή υπερθέρμανσης του συστήματος) είναι αναγκαία η χρήση πάγου στον οποίο εμβαπτίζεται το εκάστοτε δείγμα. Αυτό οφείλεται στις υψηλές ισχύς που ορίζονται για πολλά από τα πειράματα καθώς και στο ότι ο όγκος των εκχυλισμάτων είναι σχετικά μικρός για εξοικονόμηση πόρων. Το όργανο των υπερήχων δίνει την δυνατότητα στον χρήστη τον καθορισμό των μεταβλητών για το κάθε πείραμα όσον αφορά την ισχύ της ακτινοβολίας, τον χρόνο, τον ρυθμό/παλμό ακτινοβολίας του δείγματος.

Μετά το πέρας της ακτινοβολίας το μείγμα μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια των 20ml και τοποθετούνται συμμετρικά στην φυγόκεντρο για 15 λεπτά στις 7000 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Συνέχεια έχει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων που έχουν σχηματισθεί στην φυγόκεντρο λόγω διαφορετικών πυκνοτήτων. Η υγρή φάση συλλέγεται και διηθείται υπό

κενό εάν κρίνεται αναγκαίο λόγω των εναπομεινάντων υπολειμμάτων βύνης στο εκχύλισμα. Τέλος, το πλέον καθαρό εκχύλισμα αποθηκεύεται σε μικρά γυάλινα φιαλίδια και αποθηκεύεται σε ψυχρό θερμοκρασιακά ελεγχόμενο περιβάλλον (~4°C) έως τον περεταίρω χαρακτηρισμό του.



Εικόνα 15: Συσκευή υπερήχων με probe

2.2.6 Χαρακτηρισμός Εκχυλισμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis

2.2.6.1 Μέτρηση Ολικού περιεχομένου Φαινολικών Ενώσεων (TPC)



Εικόνα 16: Εκχυλίσματα διαφορετικών συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ολικού περιεχομένου των φαινολικών συστατικών ονομάζεται Folin-Ciocalteu. Με αυτή την μέθοδο δεν μπορούμε να γνωρίζουμε ονομαστικά τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται μέσα στο εκχύλισμα αλλά γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ($C_7H_6O_5$) προς g πρώτης ύλης (αποξηραμένα BSG).

Αναλυτικότερα η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος για την προαναφερθείσα μέθοδο αποτελείται από τα εξής βήματα:

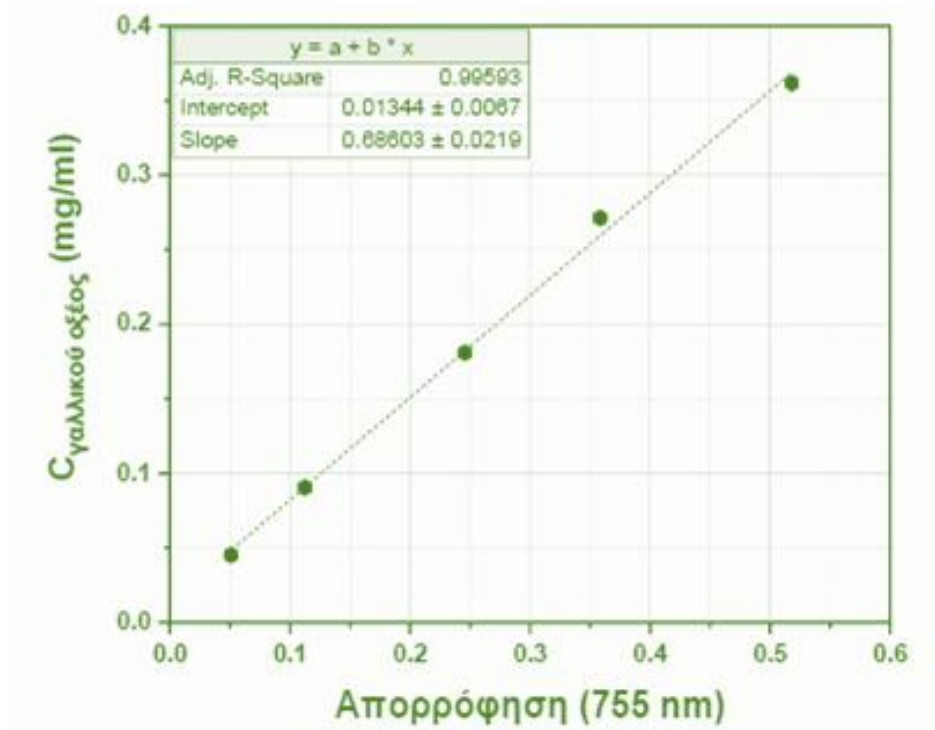
- Γίνεται χρήση 20μL από το εκχύλισμα προς μελέτη και τοποθετούνται σε φιαλίδιο Eppendorf των 1,5ml
- Προσθήκη 780μl απιονισμένου νερού
- Προσθήκη 50μl του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu Reagent (FCR), το περιεχόμενο του φιαλιδίου αποκτάει ένα κίτρινο χρώμα λόγω του τελευταίου αντιδραστηρίου και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο για 1' λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που εμφανίζει το FCR στο φως.

- Τέλος, ο όγκος του μείγματος μέσα στο Eppendorf φτάνει το 1ml με προσθήκη 150μl κορεσμένου άλατος Na_2CO_3 . Το άλας αυτό, συμβάλει στην ρύθμιση του pH του διαλύματος.
- Πραγματοποιείται ανάδευση του τελικού περιεχομένου με Vortex και διατηρείται σε σκιερό μέρος για 1h.
- Ακολουθεί μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 755nm.

Μετά το πέρας της 1h το διάλυμα έχει λάβει από κίτρινο χρώμα ένα μπλε, γεγονός που δηλώνει την αντίδραση του FCR με την περιεχόμενη ποσότητα φλαβονοειδών ενώσεων.

Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος συναρτήσει της απορρόφησης του σε μήκος κύματος 755 nm.

Η καμπύλη αναφοράς της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος παρουσιάζεται παρακάτω:



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος

➤ $C_{\text{gallic acid}} = 0,686 \times A_{\text{gallic acid}} + 0,0134$ με $R_2 = 0,99593$

Η επιλογή αυτού του μήκος κύματος είναι βασισμένη σε βιβλιογραφία όσον αφορά τις κορυφές απορρόφησης (peaks), οι οποίες προκύπτουν από την αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με το FCR.

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος:

$$\text{TPC} \left(\frac{\text{mg}_{\text{gal}}}{\text{g}_{\text{d.BSG}}} \right) = \frac{C_{\text{gal}_{\text{eq}}} \left(\frac{\text{mg}_{\text{gal}}}{\text{mL}} \right) \cdot V_{\text{extract}} (\text{mL}) \cdot D}{m_{\text{BSG}} (\text{g})} \quad (1)$$

όπου:

- $C_{\text{galic acid eq}}$: η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που υπολογίζεται από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προηγήθηκε (mg/ml)
- V_{ext} : ο όγκος του εκχυλίσματος (ml)
- D : Παράγοντας αραίωσης (Dilution factor) =1
- m_{BSG} : η μάζα ξηρών BSG που εκχυλίστηκαν (g)

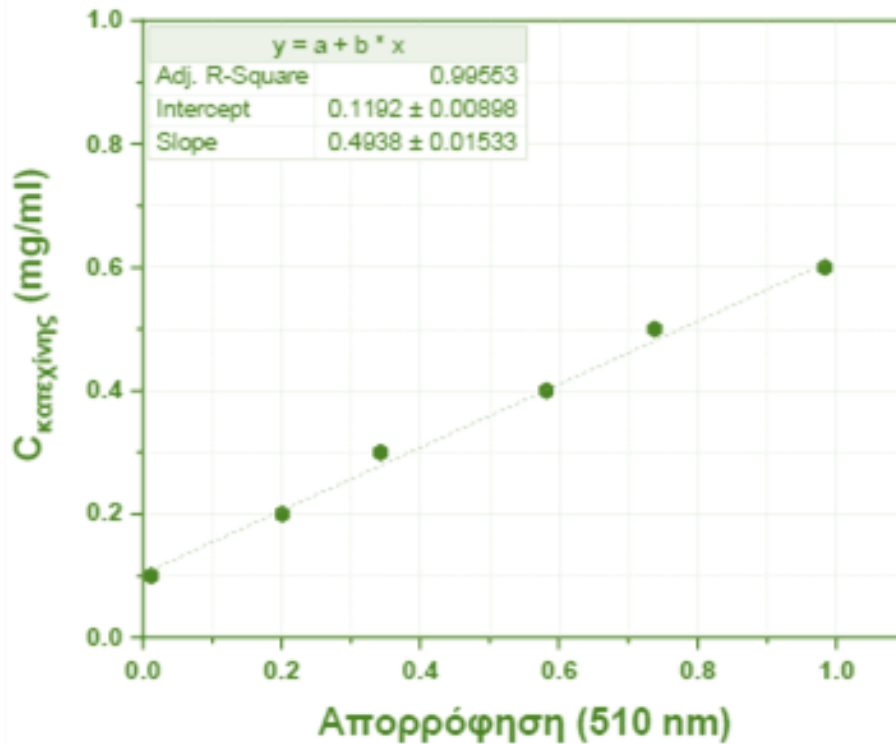
2.2.6.2 Μέτρηση ολικού περιεχομένου Φλαβονοειδών ενώσεων (TFC):

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του περιεχομένου των φλαβονοειδών συστατικών ονομάζεται χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου και αυτή τη φορά ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιείται η κατεχίνη.

Τα βήματα που πραγματοποιούνται για αυτή την μέθοδο είναι τα ακόλουθα:

- Γίνεται χρήση 50μL από το εκχύλισμα προς μελέτη και τοποθετούνται σε φιαλίδιο Eppendorf των 1,5ml
- Γίνεται προσθήκη 560 μL απεσταγμένου νερού
- Έπειτα, προστίθενται 30 μL NaNO_2 5% και αφήνεται για επώαση 6 min
- προστίθενται 60 μL AlCl_3 και αφήνεται για επώαση 5 min
- Τέλος, προστίθενται 300 μL NaOH
- Το σύστημα αναδεύεται σε Vortex και αφήνεται για επώαση 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Ακολουθεί μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 510nm.

Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης συναρτήσει της απορρόφησης της σε μήκος κύματος 510 nm.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κατεχίνης

➤ $C_{catechin} = 0,4938 \times A_{catechin} + 0,01533$ με $R^2 = 0,9955$

Παρασκευή απαραίτητων διαλυμάτων για την χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.

- 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 1g 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.

Μεσώ της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης, οι λαμβανόμενες απορροφήσεις μετατρέπονται σε ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης και τελικά, τα αποτελέσματα ανάγονται σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανά g πρώτης ύλης BSG μεσώ της παρακάτω εξίσωσης:

$$\rightarrow TFC \left(\frac{mg_{cat}}{g_{d.BSG}} \right) = \frac{C_{cat_{eq}} \left(\frac{mg_{cat}}{mL} \right) \cdot V_{extract} (mL) \cdot D}{m_{BSG} (g)} \quad (2)$$

οπού:

- Ccatechin,eq: η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που υπολογίζεται από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προηγήθηκε (mg/ml)
- Vext: ο όγκος του εκχυλίσματος (ml)
- D : Παράγοντας αραιώσης (Dilution factor) =1
- mBSG: μάζα ξηρών BSG που εκχυλίστηκαν (g)

2.2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός (Taguchi)

Ο πειραματικός σχεδιασμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα διπλωματική ήταν η στατιστική μέθοδος Taguchi. Η μέθοδος σχεδιασμού Taguchi χρησιμοποιεί ορθογώνιους πίνακες, οι οποίοι κατανέμουν τις μεταβλητές με ισορροπημένο τρόπο, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται και κατά συνέπεια τον χρόνο και κόστος των πρώτων υλών. Η μέθοδος Taguchi αποδείχθηκε ένα πολύτιμο εργαλείο για την βελτιστοποίηση πειραμάτων πολλαπλών παραγόντων.

Ως μεταβλητές βελτιστοποίησης ορίστηκαν:

- Η ισχύς των υπερήχων (%Watt ως ποσοστό της μέγιστης ισχύος του οργάνου, 400 Watt)
- Ο καθαρός χρόνος εκχύλισης, υποβοηθούμενη από το μηχάνημα των υπερήχων
- Η αναλογία NaDES:H₂O (ποσοστό περιεκτικότητας w/w% του NaDES προς την συνολική ποσότητα διαλύτη)

Επιπλέον, αξίζει να τονισθεί ότι θα μπορούσε να γίνει ορισμός και της μεταβλητής αναλογία στερεού : διαλύτη (S/L). Παρόλα αυτά, από προγενέστερες διπλωματικές που εκπονήθηκαν στα εργαστήρια οργανικής χημείας προέκυψε το αποτέλεσμα ότι η αναλογία 100:4 mgBSG/g NADES-H₂O είναι η προτιμότερη, γεγονός που καθιστά επιτρεπτή την αποφυγή της μελέτης αυτής της παραμέτρου, παίρνοντας την ίδια βέλτιστη σε όλα τα πειράματα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ένας αριθμός προκαταρκτικών πειραμάτων για την κατάλληλη επιλογή διαλύτη, τύπος και επεξεργασία πρώτης ύλης καθώς και τα όρια συνθηκών εκχύλισης.

Πίνακας 7: Συνθήκες εκτέλεσης προκαταρκτικών πειραμάτων

| Κωδικός Πειράματος | FS6 | FS7 | FS8 | FS9 | FS20 | FS21 | FS22 |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Χρόνος (min) | 60 | 60 | 20 | 20 | 15 | 15 | 15 |
| Θέρμανση (°C)/ Ισχύς υπερήχων (%W) | 50°C | 70°C | 50%W | 50%W | 35%W | 35%W | 35%W |
| Είδος Βύνης* | FS10 ⁽¹⁾ | FS10 ⁽¹⁾ | FS10 ⁽¹⁾ | FS11 ⁽²⁾ | FS12 ⁽³⁾ | FS14 ⁽⁵⁾ | FS13 ⁽⁴⁾ |
| NaDES: H ₂ O | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 |

*Τα είδη της βύνης αναλύονται στον Πίνακα 9

Πίνακας 8: Διαφορετικές ποικιλίες πρώτης ύλης BSG που μελετήθηκαν

| Είδος Βύνης | Μέθοδος ξήρανσης | Είδος κοκκομετρίας |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| FS10 ⁽¹⁾ | Ανοιχτόχρωμη/Ξανθιά | Θέρμανσης (60°C-4h) |
| FS11 ⁽²⁾ | Ανοιχτόχρωμη/Ξανθιά | Λυοφιλοποίησης |
| FS12 ⁽³⁾ | Ανοιχτόχρωμη/Ξανθιά | Θέρμανσης (60°C-4h) |
| FS13 ⁽⁴⁾ | Σκούρα/κόκκινη | Θέρμανσης (60°C-4h) |
| FS14 ⁽⁵⁾ | Σκούρα/κόκκινη | Λυοφιλοποίησης |

Όσον αφορά την θέρμανση των εκχυλισμάτων γίνεται σύγκριση αποτελεσμάτων της μεθόδου υποβοήθησης υπερήχων με συμβατική θέρμανση. Με την μέγιστη ισχύ του μηχανήματος υπερήχων τα 400 Watt το 50% θα σημαίνει λειτουργεία στα 200 Watt και αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πειραμάτων γίνεται η επιλογή της κατάλληλης πρώτης ύλης με την αντίστοιχη επεξεργασία και παροχή ενέργειας. Με τον τρόπο αυτό και βάσει το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου Taguchi θεωρήθηκαν 3 τιμές ως δεδομένα εισόδου για κάθε μια από τις τρεις ορισμένες μεταβλητές.

Τα δεδομένα για την κάθε μία μεταβλητή ορίστηκαν ως εξής:

- Μια ελάχιστη τιμή (min), η οποία ταυτίζεται με το κάτω όριο του επιλεγμένου εύρους

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

Αφού ορίστηκαν τα όρια τιμών για κάθε μια μεταβλητή προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας:

Πίνακας 9: Τιμές μεταβλητών (3 επίπεδα) του Πειραματικού Σχεδιασμού Taguchi

| Επίπεδα | | | | |
|------------|----------------|----|----|-----|
| Μεταβλητές | | 1 | 2 | 3 |
| | A: Time(min) | 15 | 20 | 25 |
| | B: Power(Watt) | 30 | 40 | 50 |
| | Γ: %NaDES(%) | 70 | 85 | 100 |

Με την χρήση του προγράμματος Minitab και τις τιμές του παραπάνω πίνακα προέκυψαν τελικά 9 πειράματα για τον πειραματικό σχεδιασμό Taguchi 9 επιπέδων (3x3).

Πίνακας 10: Αναλυτικός πίνακας δεδομένων Πειραματικού Σχεδιασμού Taguchi (9 επιπέδων)

| Μεταβλητές | | | | |
|-----------------------|---|--------------|----------------|---------------|
| | | A: Time(min) | B: Power(Watt) | Γ:%NaDES(%) |
| Αριθμός Πειράματος | 1 | A1=15min | B1= 30%W | Γ1= 70%NaDES |
| | 2 | A1=15min | B2= 40%W | Γ2= 85%NaDES |
| | 3 | A1=15min | B3= 50%W | Γ3= 100%NaDES |
| | 4 | A2= 20min | B1= 30%W | Γ1= 70%NaDES |
| | 5 | A2= 20min | B2= 40%W | Γ2= 85%NaDES |
| | 6 | A2= 20min | B3= 50%W | Γ3= 100%NaDES |
| | 7 | A3= 25min | B1= 30%W | Γ1= 70%NaDES |
| | 8 | A3= 25min | B2= 40%W | Γ2= 85%NaDES |
| | 9 | A3= 25min | B3= 50%W | Γ3= 100%NaDES |

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων εκχύλισης

3.1.1. Σχεδιασμός Φυσικά Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας 5 διαφορετικοί φυσικά βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Η επιλογή των επιμέρους συστατικών τους έγινε με στόχο τα τελικά εκχυλίσματα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τελικές εφαρμογές χωρίς περαιτέρω επεξεργασία σε τομείς όπως η φαρμακευτική και κοσμητολογία.

Ύστερα από την παρασκευή των 5 NaDES όπως αναλύθηκε στο πειραματικό μέρος έγινε σύγκριση αποτελεσμάτων για το εκχύλισμα του καθενός ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Επικρατέστερος διαλύτης είναι ο βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3) με τον οποίο πραγματοποιήθηκαν και οι εκχυλίσεις του πειραματικού σχεδιασμού.

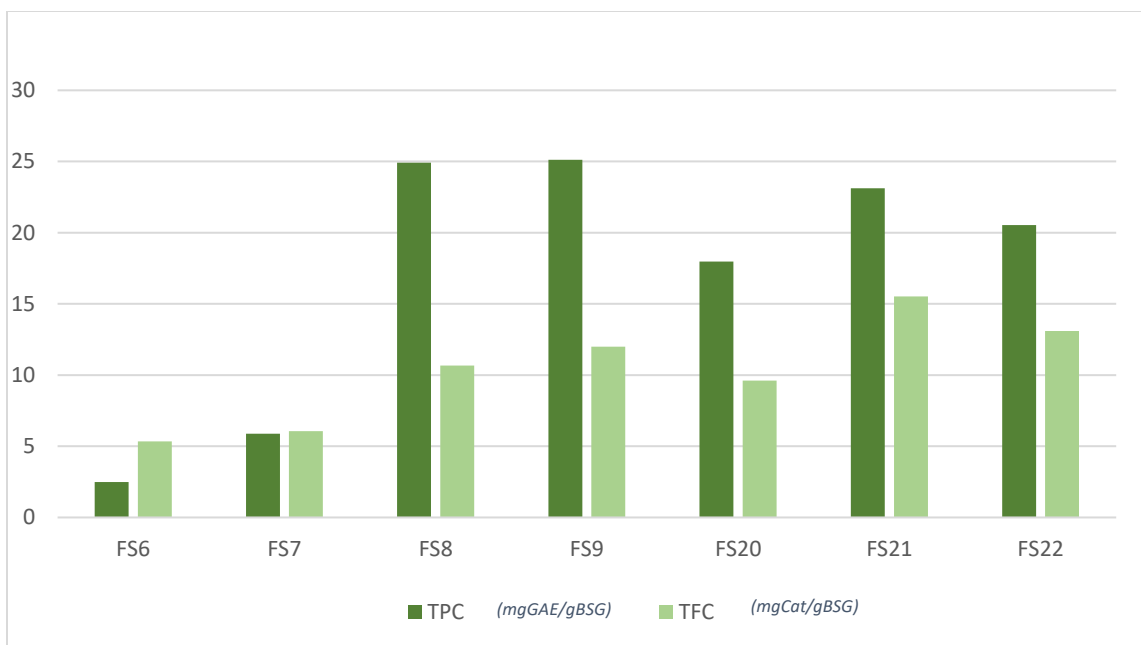
3.1.2. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων

Για την χρήση της μεθόδου Taguchi ήταν αναγκαία η πραγματοποίηση των αρχικών δοκιμαστικών πειραμάτων έτσι ώστε να μπορέσει να δημιουργηθεί μια εικόνα των ορίων των τιμών της κάθε μεταβλητής καθώς και για την επιλογή των κατάλληλων υλών και συνθηκών για τα πειράματα.

Τα αποτελέσματα των 7 προκαταρκτικών πειραμάτων ως προς το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, αφού καταχωρήθηκαν στο εργαλείο Minitab.

Πίνακας 11: Συνθήκες εκχύλισης προκαταρκτικών πειραμάτων

| Κωδικός Πειράματος | FS6 | FS7 | FS8 | FS9 | FS20 | FS21 | FS22 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Χρόνος | 60 | 60 | 20 | 20 | 15 | 15 | 15 |
| Θέρμανση (°C)/ Ισχύς υπερήχων (%W) | 50°C | 70°C | 50%W | 50%W | 35%W | 35%W | 35%W |
| Είδος Βύνης | FS10 | FS10 | FS10 | FS11 | FS12 | FS14 | FS13 |
| NaDES: H ₂ O | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 | 90:10 |



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων

○ Χρόνος Εκχύλισης:

Σχετικά με την παράμετρο του χρόνου έχει αποδειχθεί από προγενέστερα πειράματα ότι με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους λαμβάνονται υψηλότερες τιμές ολικών περιεχομένων σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, ενώ για την συμβατική θέρμανση τα αποτελέσματα δεν είναι το ίδιο ενθαρρυντικά. Με αυτά τα στοιχεία λοιπόν πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός μέσα στο εύρος των 15-25min για την εύρεση του βέλτιστου χρόνου.

○ Ισχύς Μηχανήματος Υπερήχων:

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα δοκιμαστικά πειράματα παρατηρείται ότι με την αύξηση της ισχύος της ακτινοβολίας τα αποτελέσματα των ποσοτήτων TPC και TFC που μπορούν να ανακτηθούν είναι σημαντικά καλύτερα. Παρόλα αυτά, τα όρια που επιλέχθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό για την ισχύ περιορίστηκαν μέχρι και το 50%(200W) λόγω των δυνατοτήτων του μηχανήματος, η οποία είναι και η μέγιστη ισχύς που μπορεί να λειτουργήσει. Για τα πειράματα FS8 και FS9 με την υψηλότερη τιμή ισχύος υπερήχων παραλαμβάνονται τα καλύτερα αποτελέσματα για την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων. Ενώ θετικές απολαβές για φλαβονοειδή ενώσεις επικρατούν και στα πειράματα FS21 και FS22 για χαμηλότερης ισχύος τιμές.

- **Αναλογία NaDES/H₂O:**

Για την αναλογία φυσικά βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ως προς νερό από βιβλιογραφικές μελέτες η προσθήκη νερού μπορεί να βελτιώσει ορισμένες ιδιότητες του διαλυτικού συστήματος, για παράδειγμα ευκολότερη χρήση λόγω πτώσης του ιξώδους. Παρόλα αυτά, από πειράματα έχει αποδειχθεί ότι σε υψηλότερη αναλογία NaDES:H₂O γίνεται παραλαβή υψηλότερων τιμών TPC και TFC, για τον λόγω αυτό τα όρια που επιλέχθηκαν για αυτή την μεταβλητή στον πειραματικό σχεδιασμό ήταν μεταξύ 70-100% NaDES. Η σύσταση των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τις χημικές και φυσικές ιδιότητες τους (ιξώδες, pH κ.ά.) και κατ' επέκταση επηρεάζει την αποτελεσματικότητα εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων από την πρώτη ύλη. Έτσι, απαιτείται η διερεύνηση ποικιλίας διαλυτών, ώστε να διακριθεί ο καταλληλότερος διαλύτης για την προκειμένη διεργασία που μελετάται.

- **Κοκκομετρία:**

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε κατά την εκτέλεση των δοκιμαστικών πειραμάτων είναι η επεξεργασία των BSG ως προς την κοκκομετρία. Εξετάστηκαν δύο τύποι κοκκομετρίας: (i) Μεγάλης διαμέτρου (>1mm) (ii) Μικρής διαμέτρου (<1mm). Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό για μικρότερη κοκκομετρία πρώτης ύλης είναι μεγαλύτερη η συλλογή σε ποσότητες φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Αυτό εξηγείται καθώς με την μικρότερη διάμετρο στα σωματίδια της πρώτης ύλης η διάχυση του διαλύτη μπορεί να επιτευχθεί πολύ πιο γρήγορα και εύκολα.

- **Είδος Βύνης:**

Το κύριο εξεταζόμενο στοιχείο κατά την πραγματοποίηση των δοκιμαστικών πειραμάτων ήταν το είδος βύνης. Κατά την συλλογή της πρώτης ύλης από την Αθηναϊκή Ζυθοποιία έγινε παραλαβή δύο ειδών BSG. Το πρώτο προερχόταν από ανοιχτόχρωμη βύνη για την παραγωγή «ξανθιάς» μπίρας ενώ το δεύτερο από πιο σκούρα βύνη, η οποία είχε δεχθεί περαιτέρω επεξεργασία καβουρδίσματος με σκοπό την παραγωγή κόκκινης μπίρας. Τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικά επεξεργασμένων BSG κατά την σύγκρισή τους εμφανίζουν αρκετά παραπλήσιες τιμές κατά την παραλαβή TPC και TFC, παρόλα αυτά για την σύγκριση αποτελεσμάτων καθώς υπάρχουν ήδη πειράματα προς μελέτη για την ανοιχτόχρωμη βύνη, επιλέχθηκε ως προτιμότερη πρώτη ύλη για τον πειραματικό σχεδιασμό η σκούρα «κόκκινη» βύνη.

3.2 Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού

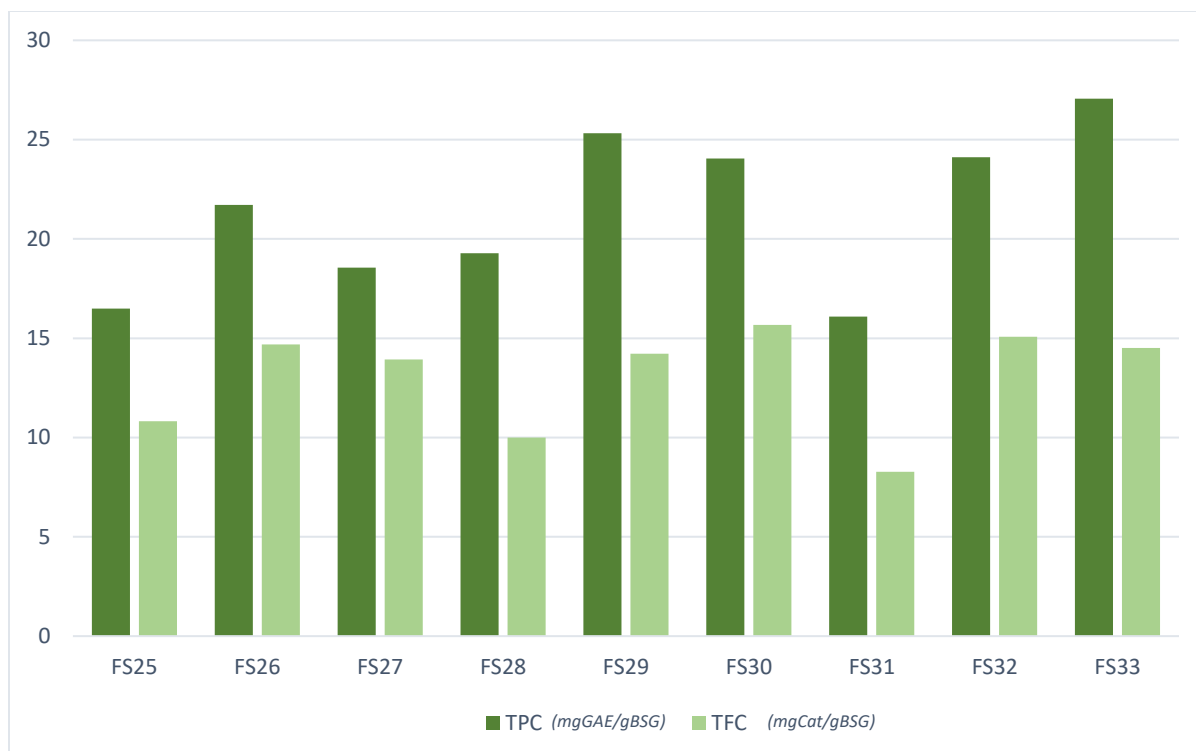
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προκαταρκτική μελέτη της διεργασίας εκχύλισης BSG με χρήση NaDES κατά την εκτέλεση των προκαταρκτικών πειραμάτων ο πειραματικός σχεδιασμός Taguchi πραγματοποιήθηκε με 3 ορισμένες μεταβλητές:

- Α: χρόνος (15-20-25min)
- Β: Ισχύς(30-40-50%Watt)
- Γ: Αναλογία NaDES:H₂O (70-85-100%NaDES)

Και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός 9 πειραμάτων, τα οποία υποδείχθηκαν μέσω του στατιστικού προγράμματος Minitab και τα αποτελέσματα για τις ποσότητες των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων δίνονται στην συνέχεια.

Πίνακας 12: Συνθήκες εκχύλισης πειραμάτων πειραματικού σχεδιασμού Taguchi

| Κωδικός Πειράματος | FS25 | FS26 | FS27 | FS28 | FS29 | FS30 | FS31 | FS32 | FS33 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Χρόνος(min) | 15 | 15 | 15 | 20 | 20 | 20 | 25 | 25 | 25 |
| Ισχύς(%) | 30 | 40 | 50 | 30 | 40 | 50 | 30 | 40 | 50 |
| NaDES:H ₂ O(%) | 70:30 | 85:15 | 100:0 | 70:30 | 85:15 | 100:0 | 70:30 | 85:15 | 100:0 |



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού Taguchi

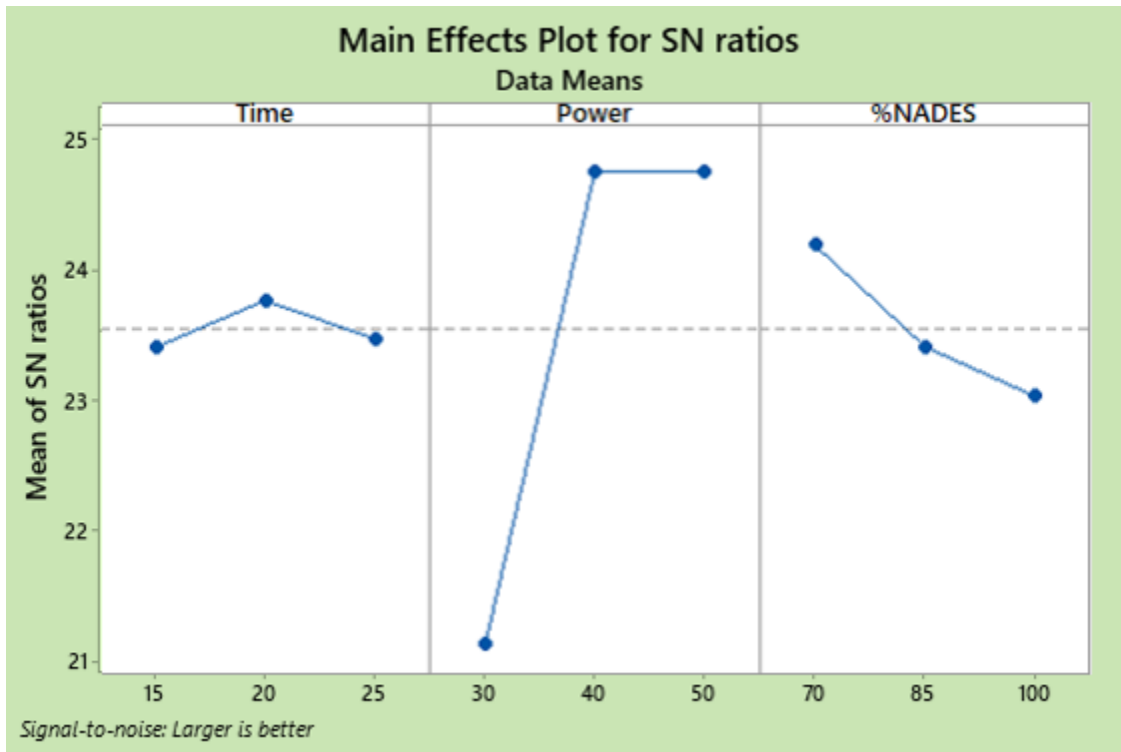
Σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου Taguchi, η οποία στηρίζεται στον υπολογισμό του λόγου σήματος/θορύβου (S/N) και δεδομένου ότι σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βέλτιστης Κύριας Επίδρασης (Main Effect) της κάθε παραμέτρου στο σύστημα που θα οδηγήσει στην ταυτόχρονη μεγιστοποίηση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

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

Όπου:

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

Στην συνέχεια με την έκδοση του παρακάτω διαγράμματος γίνεται μια δυσδιάστατη απεικόνιση των γραφημάτων S/N που προέκυψαν με την χρήση του εργαλείου Minitab για τις 3 μεταβλητές.



Διάγραμμα 6: Λόγοι S/N που προέκυψαν κατά την μελέτη της επίδρασης των μεταβλητών ελέγχου στην ανάκτηση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων

Στην συνέχεια παρουσιάζεται ο πίνακας με τον βαθμό επιρροής και τη σημαντικότητα της κάθε μεταβλητής που ορίστηκε για τη μέθοδο Taguchi.

Πίνακας 13: Βαθμοί επίδρασης και σημαντικότητας των ορισμένων μεταβλητών στην εκχύλιση

| Level | Time | Power | %NADES |
|-------|-------|-------|--------|
| 1 | 23.39 | 21.15 | 24.17 |
| 2 | 23.75 | 24.73 | 23.40 |
| 3 | 23.45 | 24.72 | 23.03 |
| Delta | 0.36 | 3.58 | 1.14 |
| Rank | 3 | 1 | 2 |

Δεδομένου ότι υψηλές τιμές S/N υποδηλώνουν και σημαντική επίδραση (Πίνακας 12), παρατηρείται ότι:

- Ισχύς Μηχανήματος Υπερήχων(Power):
Από τον πίνακα επιρροής γίνεται κατανοητό ότι αυτή η μεταβλητή έχει την μικρότερη σε σειρά από τις 3 δοθείσες σημαντικότητα ως προς το αποτέλεσμα συνολικών ποσοτήτων TFC και TPC (Delta= 3.58, Rank= 1). Αναλυτικότερα, για την χαμηλή τιμή ποσοστού ισχύος (30%W) ο λόγος S/N αλλάζει σε σημαντικό βαθμό πλησιάζοντας τις ενδιάμεσες τιμές για (40%W) ενώ στην συνέχεια για την μέγιστη τιμή των ορίων που τέθηκαν στην πειραματικό σχεδιασμό αλλά και που μπορεί να εφαρμοστεί στο όργανο υπερήχων δεν παρατηρείται σχεδόν καμία αλλαγή του λόγου ως προς την μεσαία τιμή (40%).Επιπλέον, λόγω της υψηλής ισχύος του μηχανήματος που είχε οριστεί για την μέγιστη τιμή (50%W) υπήρχαν δυσκολίες χειρισμού της εκχύλισης όπως θραύση του δοχείου με το εκχύλισμα και συχνή αλλαγή πάγου για την ρύθμιση της θερμοκρασίας.
- Χρόνος Εκχύλισης(time):
Παρατηρείται ότι είναι ο πρώτος παράγοντας επιρροής της διεργασίας λαμβάνοντας τιμές Delta= 0,36, Rank= 3. Ξεκινώντας από την χαμηλότερη δοσμένη τιμή (15min) παρατηρείται μικρή αλλαγή του λόγου S/N κατευθυνόμενοι προς τις μεσαίες τιμές της μεταβλητής (20min). Παρόλα αυτά, συνεχίζοντας προς την υψηλότερη τιμή χρόνου (25min) η περαιτέρω αύξηση είναι και πάλι αρκετά μικρή επηρεάζοντας η μεταβλητή του χρόνου πολύ λίγο την απόδοση της εκχύλισης.
- Η ποσότητες NaDES ως ποσοστό στο συνολικό μείγμα διαλύτη(%NaDES):
H₂O διαπιστώνεται από τους λόγους S/N ότι είναι ένας παράγοντας με δεύτερος στην σειρά σημαντικότητας μεταξύ των μεταβλητών (Delta= 1,148, Rank= 2). Κατευθυνόμενοι από την ελάχιστη δοθείσα τιμή (70%DES-30%H₂O) προς την μεσαία (85%DES-15%H₂O) παρατηρείται ότι η επίδραση της παραπάνω ποσότητας DES στην αναλογία NaDES:H₂O έχει σχεδόν αμελητέα επίδραση. Ενώ, συνεχίζοντας προς την μέγιστη ορισμένη τιμή (100%DES) η απόδοση της ταυτόχρονης παραλαβής ποσοτήτων φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων παραμένει πρακτικά ίδια.

Για την ολοκληρωμένη ανάλυση επιρροής των μεταβλητών στον πειραματικό σχεδιασμό, είναι ιδιαίτερα σημαντική η ανάλυση και της συνδυασμένης επίδρασης των τριών ορισμένων παραγόντων: time,power,%NaDES στην απόδοση της εκχύλισης για την μέγιστη ταυτόχρονο ανάκτηση TPC,TFC. Με την χρήση του εργαλείου Minitab συνοψίζονται παρακάτω οι συνδυασμοί που μελετήθηκαν μέσω διαγραμμάτων ισοϋψών καμπυλών.

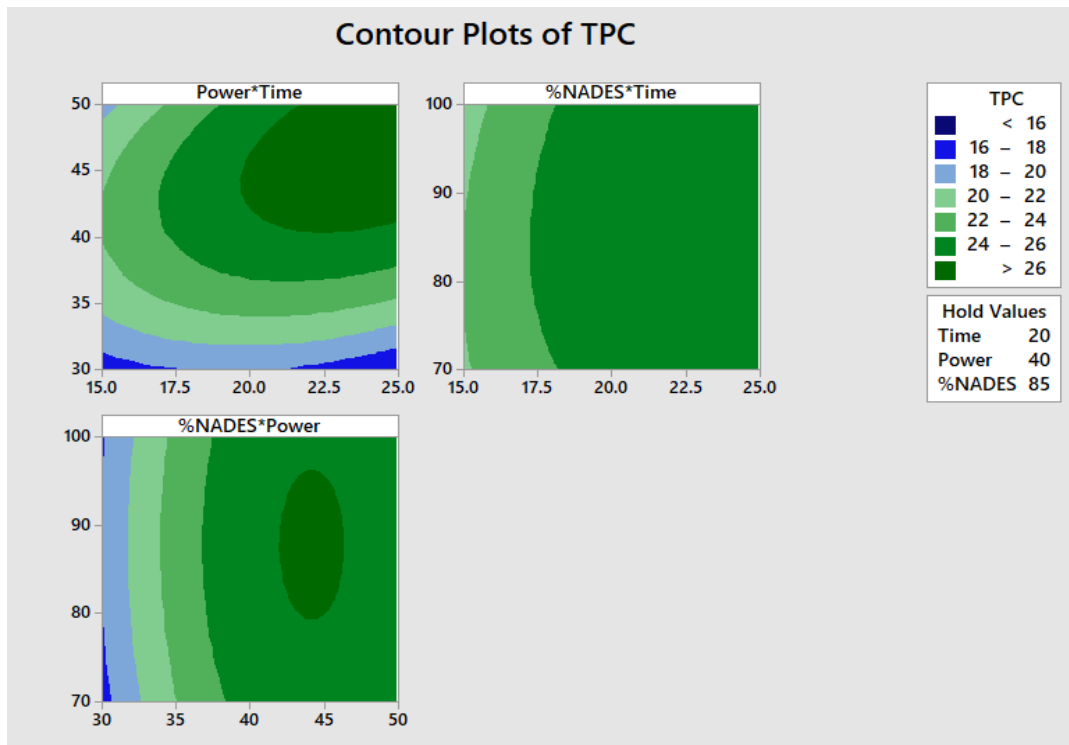
- Power · Time
- %DES · Time
- %DES · Power

Συσχετίσεις των σημαντικότερων για την εκχύλιση μεταβλητών ως προς την απόκριση TPC (Διάγραμμα 7):

Από το διάγραμμα συσχέτισης των όρων «**Power·Time**» παρατηρείται πως οι επιθυμητοί χρόνοι για μεγιστοποίηση των αποδόσεων της εκχύλισης είναι από τα 20 έως τα 25 min εκχύλισης, ενώ η παράμετρος της ισχύος των υπερήχων έχει αντίστοιχο εύρος για το οποίο λαμβάνονται τα καλύτερα αποτελέσματα TPC. Αυτά είναι για τις τιμές από ~40% έως 50% της συνολικής ισχύος του μηχανήματος. Γίνεται κατανοητό λοιπόν ότι η επίδραση της μεταβλητής Power είναι εξίσου σημαντική με αυτή του χρόνου. Τέλος, παρατηρείται μια μεγάλη διακύμανση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων πηγαίνοντας από τις χαμηλές προς τις μεγαλύτερες τιμές των δυο παραμέτρων.

Συνεχίζοντας με την συνδυαστική επίδραση για την συσχέτιση των «**%NaDES · Time**» δεν παρατηρούνται σημαντικές επιδράσεις των μεταβλητών για την απόδοση της εκχύλισης, λαμβάνοντας υψηλές τιμές φαινολικών για το εύρος τιμών της μεταβλητής του χρόνου 17-25min ενώ για τον παράγοντα περιεκτικότητας NaDES στον διαλύτη λαμβάνονται βέλτιστα αποτελέσματα σε όλο το εύρος τιμών που έχει οριστεί.

Τέλος, για την συσχέτιση των μεταβλητών «**%NaDES · Power**» ο παράγοντας περιεκτικότητας NaDES στον διαλύτη επιδρά σημαντικά στην μεταβολή τιμών ανάκτησης φαινολικών ενώσεων σε συνδυασμό με την ισχύ των υπερήχων οι οποίοι εμφανίζουν ένα πιο επιλεκτικό εύρος τιμών για τις βέλτιστες απολαβές TPC. Συγκεκριμένα, για τιμές ισχύος από ~42% έως 47% οι τιμές φαινολικών είναι οι προτιμότερες, ενώ η περιεκτικότητα NaDES από 80-95%. Η σημαντικότητα της μεταβλητής Power ως προς τις άλλες επαληθεύεται άλλη μια φορά από τα διαγράμματα καθώς ήδη από τον πίνακα με τα Ranks η ισχύς έχει την τιμή Rank= 1 ενώ η %NaDES ακολουθεί με Rank= 2.



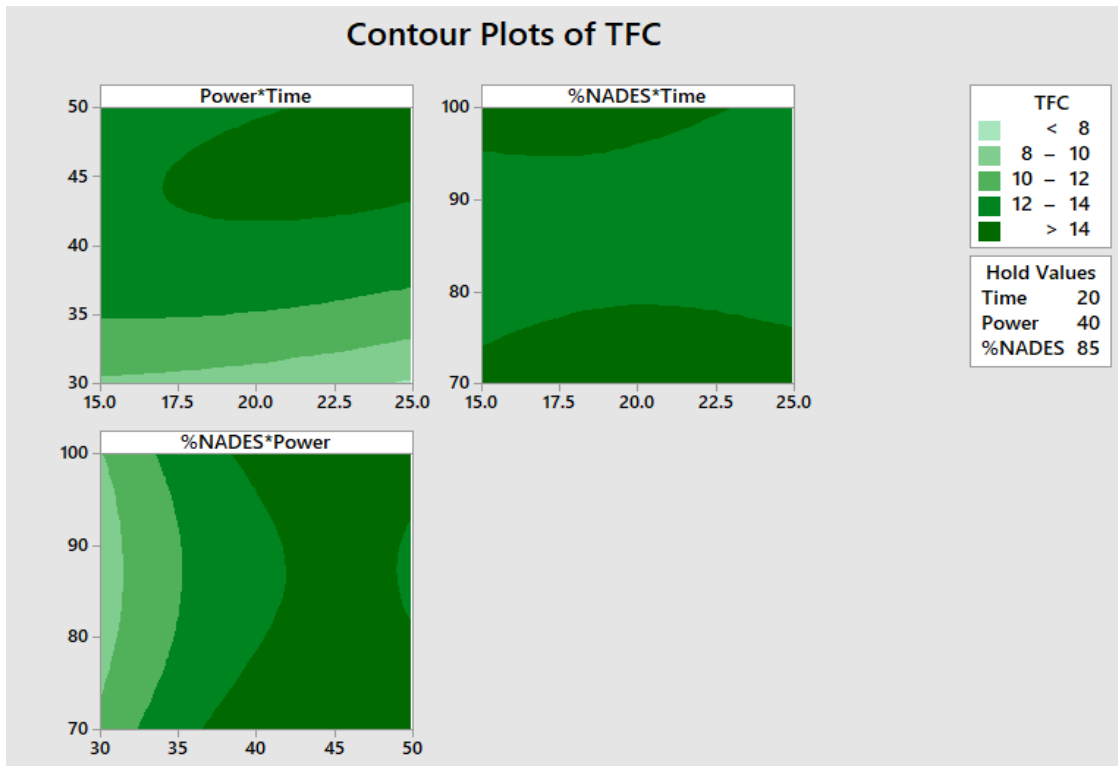
Διάγραμμα 7: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του πειραματικού σχεδιασμού κατά την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Συσχετίσεις των σημαντικότερων για την εκχύλιση μεταβλητών ως προς την απόκριση TFC (Διάγραμμα 8):

Αρχικά, από το διάγραμμα συσχέτισης των όρων «**Power·Time**» παρατηρείται πως οι επιθυμητοί χρόνοι για μεγιστοποίηση των αποδόσεων της εκχύλισης είναι από τα 17 έως τα 25 min εκχύλισης, ενώ η παράμετρος της ισχύος των υπερήχων έχει ακόμη μικρότερο εύρος για το οποίο λαμβάνονται τα καλύτερα αποτελέσματα TFC. Αυτά είναι για τις τιμές από ~42% έως 50% της συνολικής ισχύος του μηχανήματος. Γίνεται κατανοητό λοιπόν, ότι η επίδραση της μεταβλητής Power είναι σημαντικότερη από αυτή του χρόνου. Μελετώντας ξανά τον πίνακα με την σειρά σημαντικότητας κάθε μεταβλητής, παρατηρείται ότι η ισχύς των υπερήχων έχει Rank= 1 σε αντίθεση με τον χρόνο εκχύλισης, Rank= 3, επηρεάζοντας δηλαδή, σε μεγαλύτερο βαθμό την απόδοση της διεργασίας.

Συνεχίζοντας με την συνδυαστική επίδραση για την συσχέτιση των «**%NaDES · Time**» δεν παρατηρούνται σημαντικές επιδράσεις των μεταβλητών για την απόδοση της εκχύλισης, λαμβάνοντας υψηλές τιμές φλαβονοειδών για όλο το εύρος τιμών της μεταβλητής του χρόνου ενώ για τον παράγοντα περιεκτικότητας NaDES στον διαλύτη κατευθυνόμενοι προς τις οριακές τιμές που είχαν οριστεί παρατηρούνται και τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Τέλος, για την συσχέτιση των μεταβλητών «%NaDES · Power ο παράγοντας περιεκτικότητας NaDES στον διαλύτη δεν επιδρά σημαντικά στην μεταβολή τιμών ανάκτησης φλαβονοειδών ενώσεων σε αντίθεση με την ισχύ των υπερήχων η οποία εμφανίζει ένα πιο επιλεκτικό εύρος τιμών για τις βέλτιστες απολαβές TFC. Συγκεκριμένα, για τιμές ισχύος από ~40% έως 50% οι τιμές φλαβονοειδών είναι οι προτιμότερες. Η σημαντικότητα της μεταβλητής Power ως προς τις άλλες επαληθεύεται άλλη μια φορά από τα διαγράμματα καθώς ήδη από τον πίνακα με τα Ranks η ισχύς έχει την τιμή Rank= 1 ενώ η %NaDES ακολουθούσε με Rank= 2.



Διάγραμμα 8: Διαγράμματα ισοϋψών καμπυλών επίδρασης των παραμέτρων του πειραματικού σχεδιασμού κατά την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων

3.3 Επιβεβαίωση Μοντέλου και Βελτιστοποίηση διεργασίας

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων στο εργαλείο Minitab και την μελέτη των 3 παραγόντων (A:Time,B:Power,Γ:%NaDES) δημιουργήθηκαν τα θεωρητικά μοντέλα πρόβλεψης ξεχωριστά για φαινολικά και φλαβονοειδή.

3.3.1 Ανάλυση Μοντέλου ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών

Ανάλυση Παλινδρόμησης TPC ως προς time, Power, %NaDES:

Πίνακας 14: Ανάλυση παλινδρόμησης για ολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε Φαινολικές ενώσεις

| | F-Value | P-Value |
|--------------------|---------|---------|
| Regression | 91.92 | 0.000 |
| Time | 1.44 | 0.261 |
| Power | 56.91 | 0.000 |
| %NaDES | 1.60 | 0.237 |
| Time*Time | 33.49 | 0.000 |
| Power*Power | 133.15 | 0.000 |
| NaDES*NaDES | 2.96 | 0.119 |
| Time*Power | 41.23 | 0.000 |
| Time*%NaDES | 2.54 | 0.145 |

Σύνοψη Μοντέλου:

Πίνακας 15: Σύνοψη μοντέλου

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------------|--------|-----------|------------|
| 0.598182 | 98.79% | 97.72% | 95.16% |

Σχόλια:

Από τον πίνακα σύνοψης μοντέλου που προκύπτει από το εργαλείο Minitab παρατηρείται ότι το μέγεθος απόκλισης του προβλεπόμενου R-sq(pred) και του R-sq(adj) είναι κοντά στην τάξη του 2%. Γεγονός που καθιστά καλή την προσαρμογή του μοντέλου ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών.

Συντελεστές Μεταβλητών για σχηματισμό εξίσωσης παλινδρόμησης:

Πίνακας 16: Συντελεστές μεταβλητών εξίσωσης παλινδρόμησης

| Παράγοντες | Συντελεστές | SE Coefficients | T-Value | P-Value | VIF |
|----------------|-------------|-----------------|---------|---------|--------|
| Σταθερά | -58,7 | 14.4 | -4.07 | 0.003 | |
| Time | 0,711 | 0.593 | 1.20 | 0.261 | 294.78 |

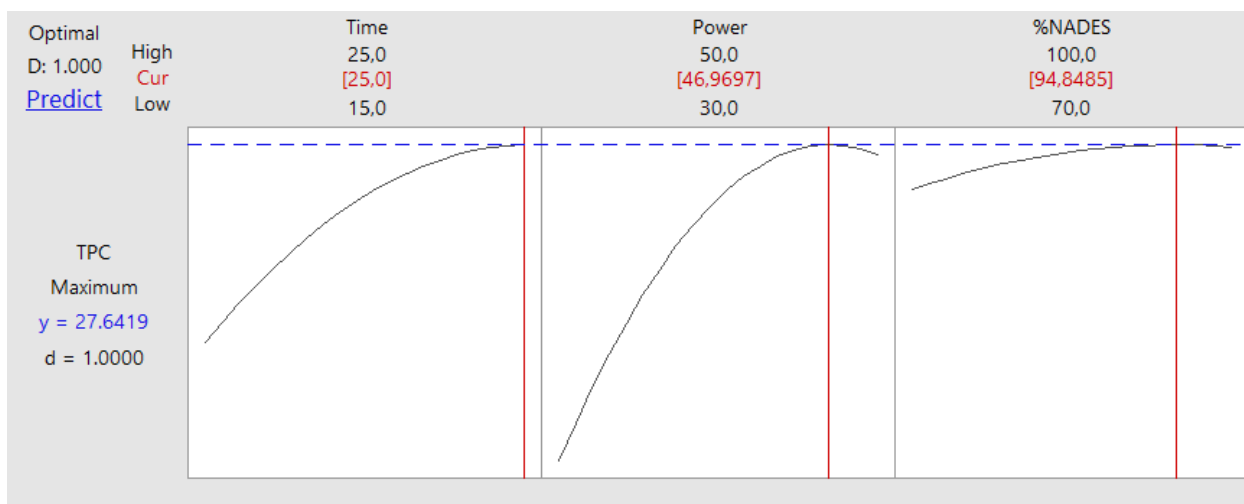
| | | | | | |
|----------------------|----------|---------|--------|-------|--------|
| Power | 2,638 | 0.350 | 7.54 | 0.000 | 410.00 |
| %NaDES | 0,317 | 0.251 | 1.27 | 0.237 | 474.44 |
| Time*Time | -0,0692 | 0.0120 | -5.79 | 0.000 | 193.00 |
| Power*Power | -0,03985 | 0.00345 | -11.54 | 0.000 | 257.33 |
| %NaDES*%NaDES | -0,00264 | 0.00153 | -1.72 | 0.119 | 515.11 |
| Time*Power | 0,04435 | 0.00691 | 6.42 | 0.000 | 130.67 |
| Time*%NaDES | 0,00734 | 0.00460 | 1.59 | 0.145 | 195.11 |

Εξίσωση Παλινδρόμησης:

$$\text{TPC} = -58,7 + 0,711 \text{ Time} + 2,638 \text{ Power} + 0,317 \text{ \%NADES} - 0,0692 \text{ Time*Time} - 0,03985 \text{ Power*Power} - 0,00264 \text{ \%NADES* \%NADES} + 0,04435 \text{ Time*Power} + 0,00734 \text{ Time* \%NADES}$$

Όπου:

- TPC: Ολικό περιεχόμενο φαινολικών, εκφρασμένο σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος / g ξηρών BSG.
- Power: Η ισχύς των υπερήχων εκφρασμένη ως ποσοστό της συνολικής ισχύος του οργάνου (%).
- %DES: Η περιεκτικότητα του DES Bet-Gly 1:3 στον διαλύτη, εκφρασμένη σε ποσοστό (%)
- Time: Η διάρκεια εκχύλισης, σε λεπτά (min).



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την βελτιστοποίηση των τιμών TPC

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που δίνονται για την μελέτη μεγιστοποίησης του ολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις (TPC) γίνεται κατανοητό ότι για τις οριακές τιμές που ορίστηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό δίνονται και τα καλύτερα αποτελέσματα φαινολικών.

Αναλυτικότερα, για την μεταβλητή «Time» προκύπτει ότι βέλτιστος χρόνος εκχύλισης εντός του πεδίου μελέτης είναι τα $Time_{opt} = 25\text{min}$ το οποίο ταυτίζεται με το ανώτατο όριο που έχει οριστεί. Στην συνέχεια ο παράγοντας Power με $Power_{opt} = 46.97\%$ παρουσιάζει σε εκείνο το σημείο μέγιστη ανάκτηση φαινολικών ενώ συνεχίζοντας προς μεγαλύτερες τιμές μέχρι 50% ισχύος αρχίζει να παρατηρείται μια μείωση της απόδοσης εκχύλισης για παραλαβή TPC. Αντίστοιχη συμπεριφορά με αυτή της ισχύος των υπερήχων (Power) εμφανίζει η μεταβλητή περιεκτικότητας %NaDES στο διαλύτη με $\%NaDES_{opt} = 94.85\%$ για βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης ως προς τα φαινολικά, ενώ συνεχίζοντας προς την οριακή τιμή του 100%NaDES για διαλύτη της εκχύλισης τείνει να σταθεροποιείται η ποσότητα φαινολικών που μετριοούνται.

3.3.2 Ανάλυση Μοντέλου ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών συστατικών

Ανάλυση Παλινδρόμησης TFC ως προς time, Power, %NaDES:

Πίνακας 17: Ανάλυση παλινδρόμησης για Φλαβονοειδή ενώσεις

| | F-Value | P-Value |
|-------------------|---------|---------|
| Regression | 24.05 | 0.000 |
| Time | 0.12 | 0.732 |

| | | |
|--------------------|-------|-------|
| Power | 13.11 | 0.006 |
| %NaDES | 5.69 | 0.041 |
| Time*Time | 0.77 | 0.402 |
| Power*Power | 23.76 | 0.001 |
| NaDES*NaDES | 6.40 | 0.032 |
| Time*Power | 3.70 | 0.086 |
| Time*%NaDES | 0.75 | 0.408 |

Σύνοψη Μοντέλου:

Πίνακας 18: Σύνοψη μοντέλου

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) |
|-----------------|-------------|------------------|-------------------|
| 0.598182 | 95.53% | 91.56% | 82.13% |

Σχόλια:

Από τον πίνακα σύνοψης μοντέλου που προέκυψε από το εργαλείο Minitab παρατηρείται ότι το μέγεθος απόκλισης του προβλεπόμενου R-sq(pred) και του R-sq(adj) είναι κοντά στην τάξη του 9%.

Συντελεστές Μεταβλητών για σχηματισμό εξίσωσης παλινδρόμησης:

Πίνακας 19: Συντελεστές μεταβλητών εξίσωσης παλινδρόμησης

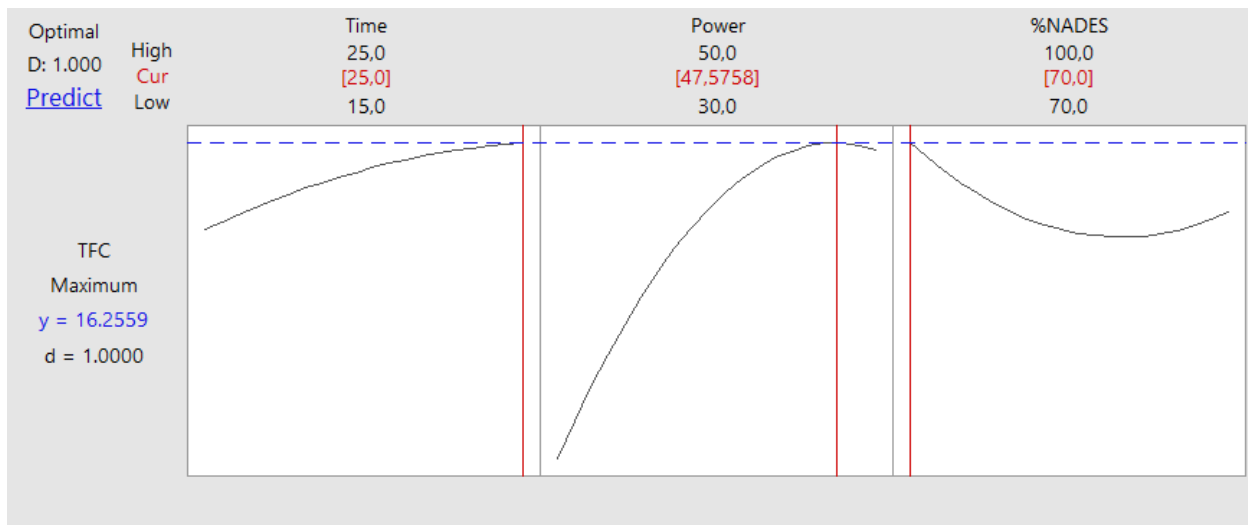
| Παράγοντες | Συντελεστές | SE Coefficients | T-Value | P-Value | VIF |
|----------------------|--------------------|------------------------|----------------|----------------|------------|
| Σταθερά | 7.5 | 18.6 | 0.40 | 0,696 | - |
| Time | 0.270 | 0.767 | 0.35 | 0.732 | 294.78 |
| Power | 1.638 | 0.452 | 3.62 | 0.006 | 410.00 |
| %NaDES | -0.774 | 0.324 | -2.39 | 0.041 | 474.44 |
| Time*Time | -0.0136 | 0.0155 | -0.88 | 0.402 | 193.00 |
| Power*Power | -0.02177 | 0.00447 | -4.87 | 0.001 | 257.33 |
| %NaDES*%NaDES | 0.00502 | 0.00199 | 2.53 | 0.032 | 515.11 |
| Time*Power | 0.01719 | 0.00893 | 1.92 | 0.086 | 130.67 |
| Time*%NaDES | -0.00517 | 0.00596 | -0.87 | 0.408 | 195.11 |

Εξίσωση Παλινδρόμησης:

$$\begin{aligned} \text{TFC} = & 7,5 + 0,270 \text{ Time} + 1,638 \text{ Power} - 0,774 \% \text{NADES} - 0,0136 \text{ Time} * \text{Time} \\ & - 0,02177 \text{ Power} * \text{Power} + 0,00502 \% \text{NADES} * \% \text{NADES} + 0,01719 \text{ Time} * \text{Power} \\ & - 0,00517 \text{ Time} * \% \text{NADES} \end{aligned}$$

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 (%).
- %NaDES: Η περιεκτικότητα του DES Bet-Gly 1:3 στον διαλύτη, εκφρασμένη σε ποσοστό (%).



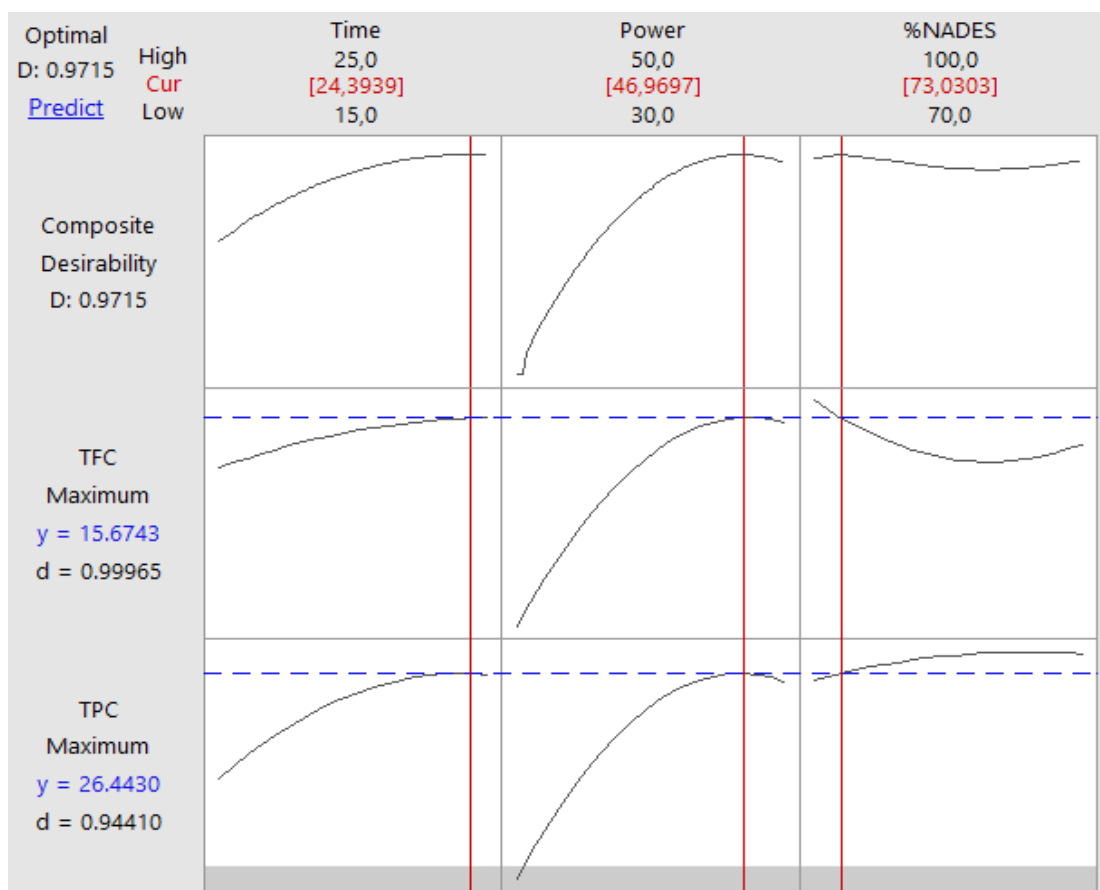
Διάγραμμα 10: : Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με απόκριση την βελτιστοποίηση των τιμών TFC

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που δίνονται για την μελέτη μεγιστοποίησης του ολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή ενώσεις (TFC) γίνεται κατανοητό ότι για τις οριακές τιμές που ορίστηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό δίνονται και τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τις τιμές της παραμέτρου TFC. Αναλυτικότερα, για την μεταβλητή «Time» μέσω του προγράμματος Minitab ισχύει ότι $\text{Time}_{\text{opt}} = 25 \text{ min}$ το οποίο ταυτίζεται με το ανώτατο όριο που είχε οριστεί. Στην συνέχεια ο παράγοντας Power με $\text{Power}_{\text{opt}} = 46.97\%$

παρουσιάζει σε εκείνο το σημείο μέγιστη ανάκτηση φαινολικών ενώ συνεχίζοντας προς μεγαλύτερες τιμές μέχρι 50% ισχύος αρχίζει να παρατηρείται μια μείωση της απόδοσης εκχύλισης για παραλαβή TFC. Αντίστοιχη συμπεριφορά με αυτή της ισχύος των υπερήχων (Power) εμφανίζει η μεταβλητή περιεκτικότητας %NaDES στο διαλύτη με $\%NaDES_{opt} = 94.85\%$ για βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης ως προς τα φλαβονοειδή, ενώ συνεχίζοντας προς την οριακή τιμή του 100%NaDES για διαλύτη της εκχύλισης τείνει να σταθεροποιείται η ποσότητα φλαβονοειδών που μετριούνται.

3.3.3 Ταυτόχρονη βελτιστοποίηση

Για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των ολικών περιεχομένων φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων έγινε χρήση της εντολής «Response Optimizer» και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 11: Διάγραμμα βελτιστοποίησης των παραμέτρων ελέγχου με ταυτόχρονη βελτιστοποίηση της διεργασίας ως προς τις τιμές TPC και TFC.

Από το παραπάνω διάγραμμα βελτιστοποίησης δίνονται οι τιμές για την κάθε μια μεταβλητή που ορίστηκε στο εργαλείο Minitab για την μέγιστη απόδοση TPC και TFC.

Αναλυτικότερα, για τον πρώτο παράγοντα A (Time) παρατηρείται ότι για την αύξηση του χρόνου εκχύλισης βελτιώνονται και οι τιμές των ζητούμενων ποσοτήτων. Συγκεκριμένα, από το δοσμένα διαγράμματα για μια κρίσιμη τιμή στην οποία εμφανίζουν και μέγιστο οι καμπύλες **Time_{opt}= 24,39min** έπειτα αρχίζουν να παραμένουν σταθερά τα αποτελέσματα των TPC και TFC συμπεραίνοντας ότι επιτυγχάνεται μέγιστο πλατό μέχρι και τα 25min εκχύλισης.

Στην συνέχεια, όσον αφορά την μεταβλητή της ισχύος λειτουργείας του μηχανήματος των υπερήχων, η βέλτιστη τιμή τείνει προς το μέγιστο όριο που είχε οριστεί κατά την διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού **Power_{opt}= 46.96%(187.94Watt)**. Ύστερα από παρατήρηση των διαγραμμάτων για μέγιστη απόδοση φαινολικών και φλαβονοειδών ξεχωριστά διακρίνεται ότι από την βέλτιστη τιμή και έπειτα οι συγκεντρώσεις τους φθίνουν. Συνεπώς, για την μεταβλητή της ισχύος και του χρόνου οι καμπύλες των TPC και TFC συμπεριφέρονται παρόμοια.

Τέλος, σχετικά με την παράμετρο της αναλογίας NaDES:H₂O διακρίνεται ότι οι καμπύλες βελτιστοποίησης παραλαβής συγκεντρώσεων TPC και TFC διαφέρουν ως προς την αύξηση του λόγου. Συγκεκριμένα, για τα φαινολικά πηγαίνοντας σε υψηλότερες τιμές πέρα από το **%NaDES_{opt}= 73.03%** μπορούν να επιτευχθούν καλύτερες αποδόσεις για εκχυλίσεις με στόχο την παραλαβή TPC προσεγγίζοντας μία τελική τιμή πλησιάζοντας στο ανώτατο όριο %NaDES που είχε δοθεί για τον πειραματικό σχεδιασμό. Σε αντίθεση η καμπύλη των φλαβονοειδών επιτυγχάνει τα βέλτιστα αποτελέσματα για τις μικρότερες αναλογίες %NaDES φτάνοντας ελάχιστο στην περιοχή του 90%NaDES και στην συνέχεια παρουσιάζει μια αύξηση πλησιάζοντας στο 100% NaDES.

Πίνακας 20: Τιμές μεταβλητών και αποτελέσματα βέλτιστων συνηθικών πειραματικού σχεδιασμού

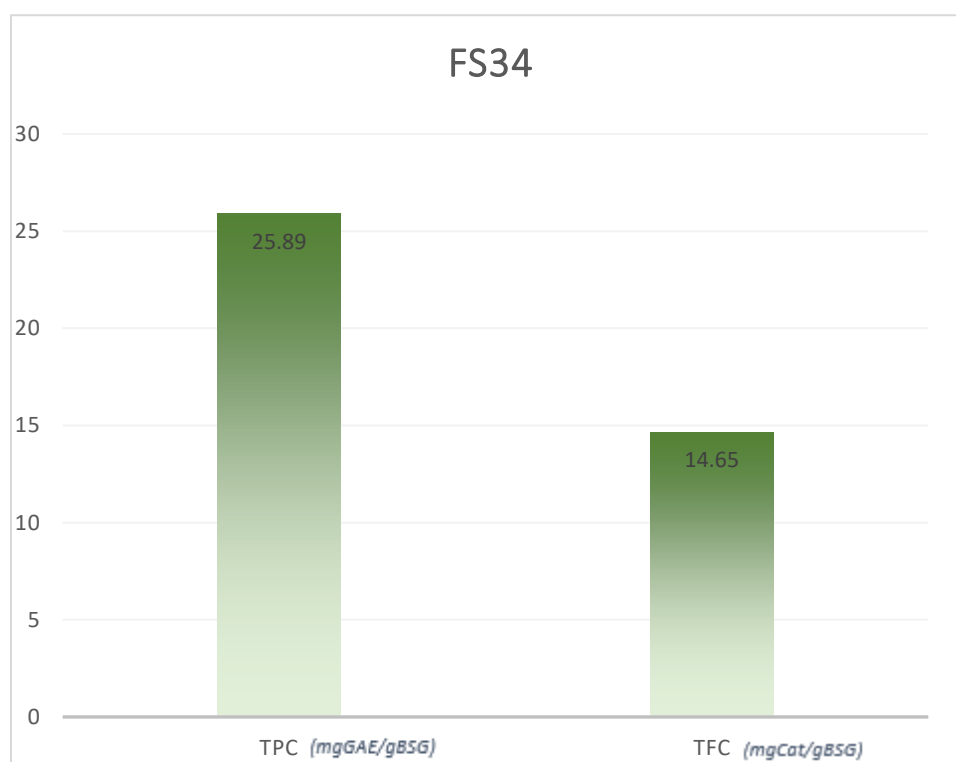
| | Time (min) | Power (%) | %NaDES | TPC (predicted) | TFC (predicted) |
|---------------------------|------------|-----------|--------|-----------------|-----------------|
| Βέλτιστες Συνθήκες | 24.39 | 46.97 | 73.03 | 26.44 | 15.67 |
| SE Fit | - | - | - | 0.32 | 0.41 |

Πίνακας 21: Εύρος επιτρεπτών ορίων αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού

| | TPC (predicted) | TFC (predicted) |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 95%CI | 26.44 ± 0.714 | 15.67 ± 0.92 |
| 95% PI | 26.44 ± 1.53 | 15.67 ± 1.98 |

3.3.4 Επιβεβαίωση και σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων

Με αφορμή την επιβεβαίωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων του μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα στις συνθήκες οι οποίες από το στατιστικό πρόγραμμα Minitab ορίστηκαν ως βέλτιστες για την ταυτόχρονη παραλαβή φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Τα αποτελέσματα που παραλήφθηκαν από το εκχύλισμα στις ιδανικές συνθήκες ως προς TPC και TFC παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 12: Ολικό περιεχόμενο TPC και TFC για το εκχύλισμα βέλτιστων συνθηκών ($Time_{opt}=24.39min$, $Power_{opt}=46.97\%$, $\%NaDES_{opt}=73\%$)

Σχόλια:

- Τα αποτελέσματα των τιμών του πειράματος για τις φαινολικές ενώσεις είναι εντός των περιθωρίων σφάλματος από τις θεωρητικές τιμές. Γεγονός που καθιστά ικανοποιητική την απόκλιση που παρατηρείται, καθώς και την προσαρμογή του μοντέλου που σχηματίστηκε

- Αντίστοιχα για την συνολική ποσότητα φλαβονοειδών που υπολογίστηκαν στο εκχύλισμα το μέγεθος της απόκλισης είναι μέσα στα όρια δοσμένα από τον λογισμικό Minitab.
- Οι τυχόν διαφορές των πειραματικών αποτελεσμάτων από τις θεωρητικές τιμές είναι πιθανό να οφείλονται στη δυσκολία χειρισμού του οργάνου των υπερήχων με ανάγκη για διαρκή αλλαγή πάγου για την ρύθμιση της θερμοκρασίας λόγω της λειτουργίας σε υψηλές τιμές ισχύος.

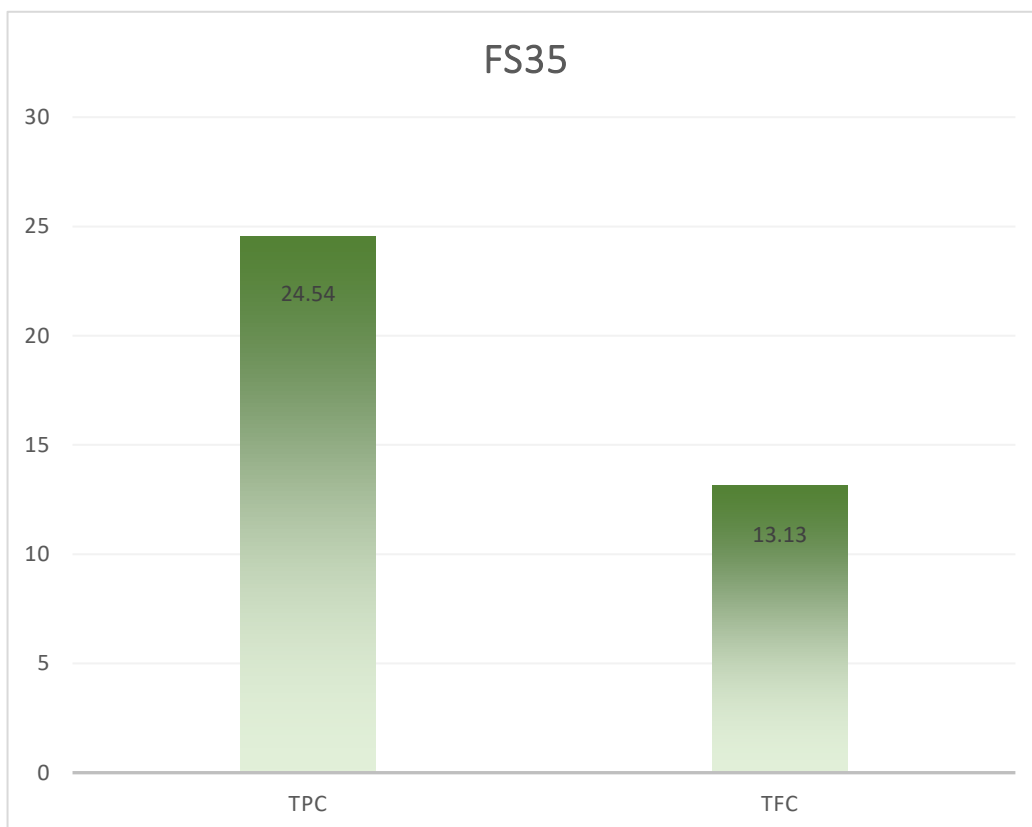
Ο αριθμός μελετών που εστιάζουν στην εκχύλιση υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας υποβοηθούμενη από υπερήχους και μικροκύματα είναι περιορισμένος. Παρόλα αυτά παρακάτω παρατίθενται μερικά αποτελέσματα μελετών, με στόχο αντίστοιχο της παρούσας διπλωματικής.

Γενικά το σκούρο (κόκκινο) BSG έχει υψηλότερα επίπεδα τιμών TPC από το ανοιχτόχρωμο BSG λόγω της παρουσίας μελανοϊδινών υψηλού μοριακού βάρους οι οποίες συσσωρεύονται ως παραπροϊόντα της αντίδρασης Maillard. Οι μελανοϊδίνες αποτελούνται κυρίως από προϊόντα αποικοδόμησης σακχάρων και αμινοξέα που μπορούν επίσης να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteau FC κατά την μέτρηση των φαινολικών και έτσι να δώσουν ψευδώς αυξημένο TPC.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μελετών δέσμευσης φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο της εκχύλισης

| Δείγμα BSG | TPC (mg GAE/g BSG) | | |
|---|--------------------|--------------|--------------|
| | BSG Light | BSG Dark | BSG Mix |
| Ακατέργαστο | 2.84 ± 0.11 | 2.81 ± 0.26 | 3.85 ± 0.04 |
| Αλκοολούχο | 16.67 ± 0.87 | 17.27 ± 0.41 | 19.20 ± 0.40 |
| Αλκοολούχο EtOAc | 4.67 ± 0.27 | 3.08 ± 0.15 | 4.71 ± 0.28 |
| Αλκοολούχο υποβοηθούμενο από μικροκύματα (MAE) | 15.42 ± 1.16 | 15.55 ± 0.56 | 16.94 ± 1.84 |
| Αλκοολούχο MAE EtOAc | 3.85 ± 0.19 | 3.01 ± 0.19 | 4.24 ± 0.22 |
| Αλκοολούχο UAE | 15.76 ± 0.72 | 16.72 ± 0.96 | 16.99 ± 0.32 |
| Αλκοολούχο με υπερήχους (UAE) EtOAc | 4.17 ± 0.21 | 3.43 ± 0.46 | 4.62 ± 0.27 |

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πειράματος που πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια οργανικής χημείας χρησιμοποιώντας ανοιχτόχρωμη/ξανθιά βύνη από προγενέστερη διπλωματική μελέτη ως πρώτη ύλη για την σύγκριση αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 13: Αποτελέσματα TPC και TFC για ανοιχτόχρωμη βύνη στις βέλτιστες συνθήκες ($Time_{opt}= 24.39min$, $Power_{opt}= 46.97\%$, $\%NaDES_{opt}= 73\%$)

Σχόλια:

Από τα αποτελέσματα ολικών περιεχομένων φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων παρατηρούνται παραπλήσιες τιμές με αυτές του μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού με τις βέλτιστες συνθήκες για ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των TPC και TFC.

4. Συμπεράσματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην περαιτέρω μελέτη και στην βελτιστοποίηση αξιοποίησης των υπολειμμάτων βύνης ζυθοβιομηχανίας. Ένα παραπροϊόν το οποίο συναντάται σε εκατομμύρια τόνους ετησίως με υπεράριθμες προοπτικές αξιοποίησης και το οποίο δυστυχώς παραμένει ανεκμετάλλευτο μέχρι και σήμερα στο μεγαλύτερο ποσοστό του. Τα κύρια χαρακτηριστικά των BSG που έχουν τραβήξει την προσοχή αρκετών επιστημονικών κλάδων τα τελευταία χρόνια, είναι το χαμηλό κόστος τους, η υψηλή περιεκτικότητα τους σε ουσίες που μπορούν να φανούν σημαντικά χρήσιμες σε τομείς όπως κοσμητολογία, φαρμακευτική και πολλών άλλων καθώς παρουσιάζουν αφθονία σε βιοδραστικές ενώσεις, έτσι ώστε σε συνδυασμό με την άνοδο της πράσινης χημείας να καθίσταται επιτακτική ανάγκη πλέον η άμεση αξιοποίησή τους. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που αξίζει να αναφερθεί σχετικά με τον όρο Πράσινη Χημεία είναι οι Φυσιικοί Βαθέως Ευτηκτικοί διαλύτες. Η παρασκευή και χρήση του NaDES βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3) ως διαλύτη στη υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για τις μελλοντικές χρήσεις των υπολειμμάτων βύνης.

Ξεκινώντας με την συντήρηση της πρώτης ύλης από την στιγμή της παραλαβής της, απευθείας από την μονάδα παραγωγής της Αθηναϊκής Ζυθοποιίας, η μέθοδος ξήρανσης λυοφιλοποίησης (Freeze drying) αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματική. Καθώς με διατήρηση σε σκιερό περιβάλλον και σε χαμηλές θερμοκρασίες (~-10°C) η περιεκτικότητα των BSG σε υγρασία ήταν τόσο μικρή που ακόμη και μετά από μήνες δεν υπήρξε αλλοίωση στην ποιότητα τους, με τα βιοδραστικά συστατικά να διατηρούνται σε εξαιρετικό βαθμό. Παρόλα αυτά, η χρήση της μεθόδου σε μεγαλύτερης κλίμακας βιομηχανίες είναι αμφισβητήσιμη λόγω της οικονομικής της βιωσιμότητας.

Από την εκτέλεση των δοκιμαστικών πειραμάτων για την επιλογή των ευρών τιμών των μεταβλητών καθώς και άλλων παραγόντων διεξήχθησαν σημαντικές πληροφορίες. Αρχικά, στην σύγκριση των διαλυτών NaDES ως εκχυλιστικά μέσα σε σταθερές συνθήκες, τις καλύτερες αποδόσεις εκχυλίσεων έδειξε ο διαλύτης βεταΐνη- γλυκερόλη (1:3) με ελάχιστα χαμηλότερες τιμές από τον διαλύτη γλυκόζη- γαλακτικό οξύ (1:5).

Παρόλα αυτά, η καταλληλική επιλογή διαλύτη έγινε βάσει και άλλων κριτηρίων όπως οι χημικές ιδιότητές τους και η επιθυμία σύγκρισης αποτελεσμάτων σε TPC και TFC για διαφορετικό είδος βύνης από προγενέστερη μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο οργανικής χημείας. Επιπροσθέτως, ο διαλύτης γλυκόζη- γαλακτικό οξύ (1:5) λόγω των χαμηλών τιμών pH που παρουσιάζει πιθανώς να αποτελέσει περιορισμό για την πιθανή χρήση του ως διαλύτη σε τομείς όπως η κοσμητολογία.

Στην συνέχεια, εξετάστηκαν οι διαφορετικές μορφές κοκκομετρίας της πρώτης ύλης και προέκυψαν καλύτερες αποδόσεις εκχυλίσεων για την μικρή κοκκομετρία (<1mm).

Τέλος, η συμβολή των δοκιμαστικών πειραμάτων στην επιλογή ορίων για τους τρεις παράγοντες A: χρόνος εκχύλισης (Time), B: ισχύς υπερήχων (Power) και Γ: ποσοστιαία περιεκτικότητα NaDES στον διαλύτη (%NaDES) ήταν μεγάλη καθώς μέσω αυτών υπήρξε μια πρώτη εικόνα ανάκτησης ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων κατά την εκχύλιση.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον πειραματικό σχεδιασμό βασίζεται στην συνέχεια η κατάστρωση του πειραματικού σχεδιασμού 9 επιπέδων. Καθοριστικό ρόλο στην ευκολία εξαγωγής αποτελεσμάτων με ταυτόχρονη εξοικονόμηση χρόνου και πόρων διαδραματίζει η μέθοδος Taguchi, καθώς χωρίς την χρήση της, ο αριθμός πειραμάτων που είναι απαραίτητος να εκτελεσθούν για την μελέτη τριών διαφορετικών τιμών για τρεις παράγοντες στην αποδοτικότητα της εκχύλισης θα ήταν ίσος με $3^3 = 27$ σε αντίθεση με τα 9 που πραγματοποιήθηκαν. Γίνεται κατανοητό λοιπόν, ότι μέσω του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιείται το 1/3 του αρχικού αριθμού πειραμάτων.

- Μελετώντας τα αποτελέσματα της μεθόδου Taguchi προκύπτει ένα μοντέλο το οποίο περιγράφει ικανοποιητικά το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Η συσχέτιση των προβλεπόμενων (θεωρητικών) τιμών από το μοντέλο με τις πειραματικές είναι πολύ καλή. Τέλος προκύπτουν εξισώσεις για την περιγραφή της κάθε απόκρισης (TPC και TFC αντίστοιχα).
- Πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των τιμών TPC και TFC με βέλτιστες τιμές των δοθεισών παραμέτρων να είναι για τον χρόνο εκχύλισης Time,opt= 24.34min, για την ισχύ λειτουργίας του μηχανήματος των υπερήχων Power,opt= 46.97Watt και για την περιεκτικότητα NaDES μέσα στον διαλύτη %NaDES= 73.03% και με βέλτιστες προβλεπόμενες τιμές αποκρίσεων TPC= 26.44 mg GAL/g BSG και TFC= 15.67 mg CAT/g BSG
- Από την ανάλυση Taguchi παρατηρήθηκε ότι ο σημαντικότερος παράγοντας που εκ των τριών που επηρέαζε την απόδοση των εκχυλίσεων ήταν η ισχύς των υπερήχων (Power) με Rank= 1 ενώ στην συνέχεια ακολουθούσαν η επί της εκατό περιεκτικότητα του διαλύτη σε NaDES (%NaDES), Rank= 2 και τέλος ο χρόνος εκχύλισης (Time) με Rank= 3.
- Το μοντέλο που προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκε ως προς την σημαντικότητά του, με την πραγματοποίηση ενός επιπλέον πειράματος στις βέλτιστες συνθήκες ύστερα από την μελέτη βελτιστοποίησης. Τα αποτελέσματα των TPC και TFC που προέκυψαν ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων απόκλισης, γεγονός που επιβεβαιώνει την σημαντικότητα του πειραματικού σχεδιασμού.

5. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Από την παρούσα μελέτη γίνεται κατανοητό ότι υπάρχουν ενδιαφέρουσες προοπτικές αξιοποίησης των υπολειμμάτων βύνης της ζυθοβιομηχανίας με χρήση υπερήχων και παρουσίας φυσικά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αρκετά ελπιδοφόρα οδηγώντας σε νέα ερευνητικά μονοπάτια εκ των οποίων προτείνονται ορισμένες δυνατότητες βελτιστοποίησης και εξέλιξης αυτού του τόσο πολλά υποσχόμενου και ανερχόμενου τομέα.

1. Δοκιμή χρήσης διαφορετικών πράσινων διαλυτών στις ίδιες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης για να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων, με σκοπό την εύρεση ικανότερων NaDES για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από τα BSG
2. Εξέταση της επίδρασης διαφορετικών τρόπων επεξεργασίας της πρώτης ύλης πριν την εκχύλιση (ξήρανση, κοκκομετρία) στην απόδοση των μεθόδων.
3. Μελέτη δειγμάτων συλλεγμένα από διαφορετικές παραγωγικές μονάδες που χρησιμοποιούν πρώτη ύλη σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες με διαφορετικούς τρόπους συγκομιδής, έτσι ώστε να διακριθεί η βέλτιστη περιοχή για την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων.
4. Εξέταση, σύγκριση και βελτιστοποίηση εναλλακτικών υψηλής απόδοσης διεργασιών εκχύλισης. Όπως η υποβοηθούμενη από μικροκομματική ακτινοβολία για την παροχή υψηλής ενέργειας στο εκχύλισμα. Καθώς και ο συνδυασμός των τεχνικών των υπερήχων και των μικροκυμάτων.
5. Εξέταση και σύγκριση εναλλακτικών μεθόδων υπολογισμού ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων.
6. Περαιτέρω μελέτη για τους κλάδους στους οποίους μπορεί να φανεί χρήσιμη η περιεκτικότητα των BSG σε βιοδραστικές ενώσεις.
7. Μελέτη της διάρκειας ζωής των εκχυλισμάτων και του τρόπου συντήρησής τους σε μικροβιακό επίπεδο καθώς και όσον αφορά την διατήρηση των προς μελέτη ενώσεών τους.
8. Διερεύνηση εφικτότητας για ανακλιμάκωση της διεργασίας σε βιομηχανικό επίπεδο για την εξέταση της οικονομικής βιωσιμότητας της.

6. Βιβλιογραφία

- 1) Cappa, C., & Cappa, C. (2017). Brewer's spent grain valorization in fiber-enriched fresh egg pasta production: Modelling and optimization study. *LWT*, 82, 464–470.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.04.068>
- 2) Chemical composition of brewer's spent grain (BSG) | Download Table. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from https://www.researchgate.net/figure/Chemical-composition-of-brewers-spent-grain-BSG_tbl1_309542845
- 3) The history of beer, | Craft Beer & Brewing. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from <https://beerandbrewing.com/dictionary/UqfrcsPoAI/>
- 4) Learn the Step-by-Step Process Of Brewing Beer. | First We Feast. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from <https://firstwefeast.com/drink/learn-how-to-brew-beer-with-these-fun-animated-gifs>
- 5) Brewing; beer production process - Online Biology Notes. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from <https://www.onlinebiologynotes.com/brewing-beer-production-process/>
- 6) Chetrariu, A., & Dabija, A. (2020). Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 5619, 10(16), 5619.
<https://doi.org/10.3390/APP10165619>
- 7) del Río, J. C., Prinsen, P., & Gutiérrez, A. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2013.07.001>
- 8) Main component composition of BSG as calculated from a meta-analysis of... | Download Table. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from https://www.researchgate.net/figure/Main-component-composition-of-BSG-as-calculated-from-a-meta-analysis-of-6-studies_tbl2_325313119
- 9) Lech, M., & Labus, K. (2022). The methods of brewers' spent grain treatment towards the recovery of valuable ingredients contained therein and comprehensive management of its

- residues. *Chemical Engineering Research and Design*, 183, 494–511.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.05.032>
- 10) Karlsen, F., & Skov, P. v. (2022). Review – Potentials and limitations of utilising brewer’s spent grain as a protein source in aquaculture feeds. *Journal of Cleaner Production*, 357.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131986>
- 11) Barley Seed Cross-section – Jonathan Reich Art. (n.d.). Retrieved September 15, 2022, from <https://jonathanreich.art/barley-seed-final/>
- 12) Ikram, S., Zhang, H., Ming, H., & Wang, J. (2020). Recovery of major phenolic acids and antioxidant activity of highland barley brewer’s spent grains extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(1). <https://doi.org/10.1111/JFPP.14308>
- 13) Brewer’s Spent Grains as A New Food Resource
https://www.researchgate.net/publication/325313119_Brewer's_Spent_Grains_as_A_New_Food_Resource Accessed: 2022-09-16
- 14) Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers’ spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1016/J.JCS.2005.06.001>
- 15) Mussatto, S. I. (2014). Brewer’s spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1264–1275.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.6486>
- 16) Guido, L. F., & Moreira, M. M. (1947). Techniques for Extraction of Brewer’s Spent Grain Polyphenols: a Review. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1913-4>
- 17) Macias-Garbett, R., Serna-Hernández, S. O., Sosa-Hernández, J. E., & Parra-Saldívar, R. (2021). Phenolic Compounds From Brewer’s Spent Grains: Toward Green Recovery Methods and Applications in the Cosmetic Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 196. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.681684/BIBTEX>
- 18) Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7.

<https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.00060>

- 19) Almeida, B., Valli, E., Bendini, A., & Gallina Toschi, T. (2017). Semi-industrial ultrasound-assisted virgin olive oil extraction: Impact on quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1). <https://doi.org/10.1002/EJLT.201600230>
- 20) Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- 21) Vernès, L., Vian, M., & Chemat, F. (2019). Ultrasound and microwave as green tools for solid-liquid extraction. *Liquid-Phase Extraction*, 355–374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8>
- 22) Esclapez, M. D., García-Pérez, J. v., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108–120. <https://doi.org/10.1007/S12393-011-9036-6>
- 23) Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- 24) Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y. W., Wang, L. T., Niu, L. J., Liu, Z. M., & Fu, Y. J. (2019). Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction. *Food Chemistry*, 296, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.196>
- 25) Alonso-Riaño, P., Diez, M. T. S., Blanco, B., Beltrán, S., Trigueros, E., & Benito-Román, O. (2020). Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration. *Antioxidants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030265>

- 26) Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158.
<https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2013.02.015>
- 27) Hong, J., Deng, M., & Zhao, L. (2022). Natural deep eutectic solvent combined with ultrasonic enhancement: A green extraction strategy for solanesol in tobacco leaves. *Industrial Crops and Products*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115355>
- 28) Santana, A. P. R., Mora-Vargas, J. A., Guimarães, T. G. S., Amaral, C. D. B., Oliveira, A., & Gonzalez, M. H. (2019). Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111452.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111452>
- 29) Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082.
https://doi.org/10.1021/CR300162P/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2012-00162P_0004.JPEG
- 30) Savi, L. K., Dias, M. C. G. C., Carpine, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H., & Haminiuk, C. W. I. (2019). Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 898–907. <https://doi.org/10.1111/IJFS.14013>
- 31) Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, 81(3), 679–690.
- 32) Mulia, K., Putri, S., & Krisanti, E. (2017). Natural deep eutectic solvents (NADES) as green solvents for carbon dioxide capture ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN. 1823, 20022.
<https://doi.org/10.1063/1.4978095>
- 33) Monteiro, H., Paiva, A., Duarte, A. R. C., & Galamba, N. (2022). Structure and Dynamic Properties of a Glycerol-Betaine Deep Eutectic Solvent: When Does a DES Become an Aqueous Solution? *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(11), 3501–3512.
<https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C07461>

- 34) Lomba, L., García, C. B., Ribate, M. P., Giner, B., & Zuriaga, E. (2021). Applications of Deep Eutectic Solvents Related to Health, Synthesis, and Extraction of Natural Based Chemicals. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 10156, 11(21), 10156. <https://doi.org/10.3390/APP112110156>
- 35) Bajkacz, S., & Adamek, J. (2017). Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 168, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.065>
- 36) Hooshmand, S. E., Afshari, R., Ramón, D. J., & Varma, R. S. (2020). Deep eutectic solvents: cutting-edge applications in cross-coupling reactions. *Green Chemistry*, 22(12), 3668–3692. <https://doi.org/10.1039/D0GC01494J>
- 37) Almendinger, M., Rohn, S., & Pleissner, D. (2020). Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2020.100282>
- 38) Birsan, R. I., Wilde, P., Waldron, K. W., & Rai, D. K. (2019). Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8090380>
- 39) ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΑΣ: Πράσινη Χημεία και εφαρμογές της.
- 40) Anastas, P. T., Kirchhoff, M. M., & Williamson, T. C. (2001). Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Applied Catalysis A: General*, 221(1–2), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00793-1](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00793-1)
- 41) Hooshmand, S. E., Afshari, R., Ramón, D. J., & Varma, R. S. (2020). Deep eutectic solvents: cutting-edge applications in cross-coupling reactions. *Green Chemistry*, 22(12), 3668–3692. <https://doi.org/10.1039/D0GC01494J>
- 42) Mammino, L. (2022). Computational chemistry and green chemistry: Familiarizing chemistry students with the modes and benefits of promising synergies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100743>
- 43) Hanrahan, G. (2012). Green Chemistry and Sustainable Chemical Processes. *Key Concepts in Environmental Chemistry*, 297–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374993-2.10010-X>
- 44) (*Principles of Green Chemistry - Sustainable Chemistry*, n.d.) Kennedy, S. A., & Chapman, R. M. (2019). Green chemistry as the inspiration for impactful and inclusive teaching

- strategies. *Integrating Green and Sustainable Chemistry Principles into Education*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817418-0.00001-2>
- 45) *Principles of Green Chemistry - Sustainable Chemistry*. (n.d.). Retrieved September 17, 2022, from <https://www.priyamstudycentre.com/2022/03/principles-of-green-chemistry.html>
- 46) Lapkin, A., & Constable, D. J. C. (2009). Green Chemistry Metrics: Measuring and Monitoring Sustainable Processes. *Green Chemistry Metrics: Measuring and Monitoring Sustainable Processes*, 1–324. <https://doi.org/10.1002/9781444305432>
- 47) Lewandowski, T. A. (2014). Green Chemistry. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 798–799. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01020-4>
- 48) Mammino, L. (2022). Computational chemistry and green chemistry: Familiarizing chemistry students with the modes and benefits of promising synergies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100743>
- 49) Nasrollahzadeh, M., & Sajjadi, M. (2021). An introduction to green chemistry. *Biopolymer-Based Metal Nanoparticle Chemistry for Sustainable Applications: Volume 1: Classification, Properties and Synthesis*, 3–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822108-2.00001-6>
- 50) Jankovic, A., Chaudhary, G., & Goia, F. (2021). Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy and Buildings*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>